Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Acetatos trinucleares de rutênio coordenados a ligantes fenazínicos: estudos sobre síntese, reatividade, interações com DNA e avaliação do potencial tripanocida

Pedro Branco Hauch Chrispim

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**.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

PEDRO BRANCO HAUCH CHRISPIM

Acetatos trinucleares de rutênio coordenados a ligantes fenazínicos: estudos sobre síntese, reatividade, interações com DNA e avaliação do potencial tripanocida

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: Prof. Dr^a. Sofia Nikolaou

Versão corrigida

(A versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-Graduação)

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

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 a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Chrispim, Pedro Branco Hauch

Acetatos trinucleares de rutênio coordenados a ligantes fenazínicos: Estudos sobre síntese, propriedades, interações com DNA e avaliação do potencial tripanocida. Ribeirão Preto, 2020.

142 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. Complexos trinucleares de rutênio. 2. Ligantes fenazínicos. 3. Síntese. 4. Espectroscopia. 5. *Trypanosoma cruzi*. 6. DNA.

Nome: Pedro Branco Hauch Chrispim

Título: Acetatos trinucleares de rutênio coordenados a ligantes fenazínicos: Estudos sobre síntese, propriedades, interações com DNA e avaliação do potencial tripanocida

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

Aprovado em: 11 de maio de 2020 (Defesa remota via *Google Meet*)

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sofia Nikolaou (Presidente)

Instituição: FFCLRP-USP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal (Titular)

Instituição: FCFRP-USP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Fábio Gorzoni Doro (Titular)

Instituição: UFTM

Julgamento: Aprovado

*A meus pais, Wilma e Rodolfo,
e a meus sobrinhos,
Gabrielle, Giulia, Guilherme, Letícia e Victória,
meus bens mais valiosos.*

Agradecimentos

Agradeço

Aos meus pais, Wilma e Rodolfo, por fazerem sempre, sempre, o possível e impossível para que eu chegasse até aqui, desde antes de eu me entender por gente. Sempre depois de um dia puxado, tinha a certeza de que estaria tudo bem, por estar no lugar certo, e por estar com vocês. Este trabalho é o retorno de todo o amor concedido. À minha família: irmãos Felipe, Karina e Kátia, sobrinhos Gabrielle, Giulia, Guilherme, Letícia e Vitória, avós Isabel (*in memoriam*) e Osvaldo, por tudo, tudo.

À Professora Dr^a. Sofia Nikolaou, um agradecimento especial. Professora, sob sua orientação, aprendi muito mais do que apenas Química. Gerenciar um grupo de pesquisa, ministrar aulas e lidar com alunos são mesmo tarefas árduas. Ainda assim, sempre havia tempo para um cafezinho em sua sala, pra divagar sobre séries, livros, filmes, tatuagens, ou mesmo quando nos dava a oportunidade de discutir Química, pedindo nossa visão sobre um tema e nos dando a confiança de falar sem medo. Educar é um ato que vai além de dominar um conteúdo e repassá-lo: é instigar o aluno a trilhar seu caminho. Orientar, e nunca desamparar ou reduzir o outro. E todas estas tarefas você executa com muita maestria. Sempre terei estas características como referências profissionais e pessoais. Por aguentar minhas (muitas!) preocupações e dúvidas, e por ter me guiado até este trabalho ser concluído, principalmente quando nem eu mesmo acreditava que isto seria possível: obrigado.

Ao pessoal do Laboratório de Atividade Biológica e Química Supramolecular de Compostos de Coordenação (LABIQSC²): aos que já passaram por aqui (Bruna, Camila, Felipe, Gaby, Natacha, Natália e Ricardo) e aos integrantes atuais: Ana Paula, Amanda, Carol, Bruno (Viana), Daiane (Dani), Douglas (Rabicho), Gabriel (Shifu), Ingrid, Israel (Palê), Luis (Kiwi), Nicolle (Bonsai), Pedro Nazar (Gandhi), Renato Polins, Renato (Curupira, o agregado!) e Sâmia por todo esse tempo que compartilhamos. Vocês são o pano de fundo deste trabalho. Tive a sorte (sorte?) de ser muito bem acolhido neste grupo desde que entrei, e também de acolher os membros novos e, da minha maneira, tentar repassar a eles a segurança e confiança que recebi quando cheguei aqui. Meus agradecimentos e reconhecimento à Dr^a. Camila Neves, por estar do meu lado quando eu apenas começava minha jornada como graduando, sendo sempre uma referência profissional e pessoal. O mesmo à Dr^a. Bruna Possato, pelas ajudas neste trabalho, pelos animados dias de experimentos e por entender tão bem meus conflitos, minhas alegrias

e minha visão de mundo. Queridos, eu sei que nem sempre demonstro o que sinto, mas fico super feliz com cada conquista de vocês, com cada experimento bem sucedido, cada momento de felicidade. Compartilhar com vocês este percurso é muito motivante. Desejo, de coração, que tenham sucesso e muitas conquistas em todos os caminhos que percorrerem, e que a passagem de vocês pelo LABiQSC² seja lembrada sempre com carinho.

Aos amigos, de vários círculos, que guardo sempre - e que tenho uma sorte imensa de serem muitos! Aos amigos de infância de minha cidade, por estarem sempre próximos, ainda que, algumas vezes, não fisicamente. Obrigado por me levantarem quando eu mais precisava de estímulo pra prosseguir. Aos amigos que fiz durante a Graduação, da Turma 51 de Bacharelado em Química, da Filô, da USP Ribeirão e agregados. Se fosse citá-los nome a nome, precisaria de bem mais espaço. Queridos, muitíssimo obrigado por tudo: todos os momentos de companheirismo, de tensão, de estudos, laboratórios, provas, festas, loucuras, viagens, bares, caronas, almoços, amizades, dias, tardes, noites, madrugadas. Sou muito feliz e grato por ter vocês nesta jornada, e o que vivi com vocês será sempre lembrado com muito carinho. Obrigado por aguentarem minha personalidade às vezes complicada, meus dramas, minhas alegrias, por compartilhar as experiências comuns a todos nós e, acima de tudo, por fazerem meus dias bem mais leves.

Ao pessoal do Departamento de Química: técnicos, professores, funcionários. À Dr^a. Ivana Borin, por ser sempre extremamente solícita e amigável conosco, nos ajudando em qualquer situação. À funcionária Rose, por ter sempre um bom humor contagiante, um sorriso e uma conversa. Aos técnicos Me. Vinícius Palaretti, pelas análises de RMN; Me. Eduardo Crevelin pelo ESI-MS²; Profs. Drs. Adalgisa, Ana Paula, Antônio, Arthur, Caiut, Grégoire, José Toledo, Pietro, Roberto S. e Yassuko, por permitirem o uso de equipamentos e instalações; o mesmo ao pessoal do Laboratório de Síntese Orgânica (LSO). Ao Prof. Dr. Fábio Doro, pelas primeiras aulas na Química Geral e pelas oportunidades de ensinamentos sobre a química de rutênio. À Prof. Dr^a Rose Naal, por aceitar compor a banca avaliadora deste trabalho e por ter tanto apreço pelos trabalhos desenvolvidos por nós. À Prof^a. Dr^a Hosana Debonsi (FCFRP), pela orientação em minha primeira Iniciação Científica. À Dra. Gisele Bulhões, pelos experimentos de atividade tripanocida, e também por ter uma didática incrível, me ajudando a interpretar os resultados e tentando me fazer entender um pouco do mundo da parasitologia e da doença de Chagas; e a seu supervisor, Prof. Dr. Sérgio Albuquerque (FCFRP). À Dra.

Juliana Moraes e ao Prof. Dr. José C. Toledo Jr., pelas contribuições na Qualificação. Ao pessoal dos laboratórios dos Profs. Dr. Maurício Caiut e Dr. Grégoire, não apenas pelo uso dos laboratórios, como também pela convivência nesse período. Obrigado pelas conversas sobre ciência e pelos momentos de descontração.

A todos aqueles que insistem nos caminhos da Ciência e Educação no Brasil. Nos tempos onde o obscurantismo e as inverdades ameaçam reinar, a luta de cada um de nós é vital. Persistamos.

Às agências de fomento à pesquisa CNPq, pela bolsa concedida (processo nº 130160/2018-0), CAPES e Fapesp pelo financiamento deste e de outros trabalhos.

*“Vamos pro ponto, pegar o ônibus pro bandeirão”
 “E se chover?”
 “Se chover, a gente dança na chuva”*

- (Trecho de conversa com amigos da graduação, numa tarde chuvosa antes do almoço. 2015)

“A minha vida, a mais verdadeira, é irreconhecível, extremamente interior e não tem uma só palavra que a signifique.”

- Clarice Lispector. In: A Hora da Estrela

*“Make sure there’s a river in the painting,
 even if it’s a painting of a room*

*Make sure there’s a child in the room
 floating on her back, humming,
 gazing at the stars on the ceiling
 (also painted by you)*

*Look at her! Refusing to get out,
 To get dry, to get old, to die*

Make sure the child is you.”

- Tatjana Bulovic. In: Poem For Your Inner Child

CHRISPIM, Pedro Branco Hauch. **Acetatos trinucleares de rutênio coordenados a ligantes fenazínicos: Estudos sobre síntese, propriedades, interações com DNA e avaliação do potencial tripanocida.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2020. 141 p.

RESUMO

Este trabalho trata da síntese, reatividade e atividade antiparasitária de uma classe de complexos trinucleares de rutênio, combinados a ligantes de natureza fenazínica e fenantrolínica, coordenados por ortometalação. Um complexo inédito desta classe, de fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, onde 4-pic = 4-picolina (4-metipiridina) e dppz = dipiridofenazina foi sintetizado e caracterizado por técnicas espectroscópicas, confirmando sua estrutura. Algumas propriedades do ligante dppz em solução foram exploradas, sendo elas o empilhamento π em solução através de absorção e emissão eletrônica, e solvatocromismo. O empilhamento π também foi explorado para o complexo inédito. Cinco complexos desta classe, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(\text{py})_2(\text{L})]\text{PF}_6$, onde L = dppn (benzodipiridofenazina, **1**), dppz (dipiridofenazina, **2**), dppz-CH₃ (metildipiridofenazina, **3**), dppz-Cl (clorodipiridofenazina, **4**) e phen (fenantrolina, **5**) foram estudados em relação às suas capacidades de intercalar a molécula de DNA, através da técnica de deslocamento de sonda fluorescente (brometo de etídio). Os complexos tiveram uma ordem de grandeza de 10^6 M^{-1} para a constante aparente de intercalação, K_{app} , com exceção do complexo **1** que atingiu 10^7 M^{-1} e o complexo **5** que mostrou-se um intercalador fraco, sendo melhor descrito como um *groove binder*. Também é avaliada a atividade dos complexos **2-5** e de seus ligantes livres frente a linhagens celulares de *Trypanosoma cruzi*, agente da Doença de Chagas, nas formas amastigotas (intracelular) e epimastigotas (livres), e também a citotoxicidade em células saudáveis epiteliais de rim de macaco LLC-MK2 não infectadas. Os complexos mostraram ser muito ativos em concentrações na escala sub-micromolar, tendo valores de IC_{50} na faixa de 0,2 μM até menores que 10 μM para ambas as fases, sendo mais ativos do que a droga de referência, benznidazol. A avaliação da atividade dos ligantes fenazínicos também é inédita. Estes mostraram-se ativos, porém menos do que os complexos e com menores Índices de Seletividade (IS). Dois complexos, **2** e **4**, se destacam por valores de IC_{50} na ordem de 0,2 μM em ambas as formas e com IS próximo a 10. A análise da ordem de grandeza da intercalação com DNA e da atividade tripanocida mostra que o aumento do tamanho do ligante fenazínico tem impacto na atividade biológica.

Palavras-Chave: Complexos trinucleares de rutênio, ligantes fenazínicos, síntese, espectroscopia, *Trypanosoma cruzi*, DNA.

CHRISPIM, Pedro Branco Hauch. **Trinuclear ruthenium acetates coordinated to phenazine-like ligands: synthesis, reactivity, interactions with DNA and evaluation of trypanocidal activity.** Dissertation (Master of Science). Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2020. 141 p.

ABSTRACT

This work presents the synthesis, reactivity and antiparasitic activity of a class of trinuclear ruthenium complexes, combined with phenantroline and phenazine-like ligands, coordinated by orthometalation. A new complex of this class, with formula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, where 4-pic = 4-picoline (4-methylpyridine) and dppz = dipyridophenazine, was synthesized and its characterization was assessed by spectroscopic techniques, thereby confirming its structure. Some properties of the dppz ligand were explored, as π -stacking in solution through electronic absorption and emission spectroscopy, and also solvatochromism, and π -stacking was also explored for the newly synthesized complex. Five orthometallated complexes with general formula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(\text{py})_2(\text{L})]\text{PF}_6$, where L = dppn (benzodipyridophenazine, **1**), dppz (dipyridophenazine, **2**), dppz-CH₃ (methyldipyridophenazine, **3**), dppz-Cl (chlorodipyridophenazine, **4**) e phen (phenantroline, **5**) were evaluated regarding their ability to intercalate DNA molecule, through the fluorescent probe, ethidium bromide, displacement technique. The complexes showed a magnitude of 10^6 M^{-1} for the apparent intercalation constant, K_{app} , except for complex **1** which reached a 10^7 M^{-1} order and for complex **5**, which is a weak intercalator and was better described as a groove binder. The trypanocidal activity toward *Trypanosoma cruzi*, the agent causing Chagas Disease, was evaluated for complexes **2-5** and their free ligands, in both amastigotes (intracellular) and epimastigotes cell forms, and also the cytotoxicity in LLC-MK2 monkey kidney epithelial healthy, non-infected cells. The complexes were exceptionally active in concentrations within a sub-micromolar range, showing IC₅₀ values of 0.2 μM up to less than 10 μM for both phases of the parasite, being even more active than the reference drug, benznidazole. The assessment of the ligands' activity is also unprecedented. The ligands were also active, although lesser than the complexes, and also had smaller Selectivity Index (SI). Two complexes, **2** and **4**, are highlighted for showing IC₅₀ values of around 0,2 μM in both parasite forms and SI values near 10. The overall order of K_{app} values for DNA interaction and the order for trypanocidal activity shows that an increase in the size of ligands has an impact on biological activity.

Keywords: trinuclear ruthenium complexes, phenazine-like ligands, synthesis, spectroscopy, *Trypanosoma cruzi*, DNA.

Estruturas dos complexos utilizados neste trabalho

Complexo 1: L = dppn - MM = 1249,95 g mol⁻¹

Complexo 2: L = dppz - MM = 1199,89 g mol⁻¹

Complexo 3: L = dppzCH₃ - MM = 1213,92 g mol⁻¹

Complexo 4: L = dppzCl - MM = 1234,45 g mol⁻¹

Complexo 5: L = phen - MM = 1097,80 g mol⁻¹

Lista de figuras

Figura 1. Preço, em dólares americanos, de importação por quilograma de cada metal do grupo da platina ao longo dos anos (barras) e consumo de rutênio nos Estados Unidos, em toneladas, por ano (linha).....	25
Figura 2. A) Equilíbrio de espécies mediante reação redox e complexação de O ₂ , na hemeproteína hemeritrina. B) Estruturas de clusters de Fe-S presentes em ferredoxinas.....	27
Figura 3. A) Estrutura do complexo [Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (PPh ₃)] ⁺ , a primeira imagem obtida por Cotton a partir de dados de difração de raios-X. B) Estrutura genérica de carboxilatos trinucleares de rutênio, [Ru ₃ O(RCOO) ₆ (L) ₃] ⁿ , com ponte μ ₃ -oxo (vermelho), μ ₂ -RCOO (verde), ligantes periféricos L (azul) e carga n ^{+/-}	28
Figura 4. Número de publicações recuperadas da busca na base Scopus, utilizando como palavras-chaves “trinuclear ruthenium carboxylate”, de 1970 a 2018.	29
Figura 5. Esquema ilustrativo de supermoléculas. A) Dímero, B) trímero e C) tetrâmero inorgânicos contendo múltiplas unidades trinucleares (representadas pelos triângulos), unidas por ligantes em ponte (P). É possível crescer estruturas com menor ou maior número de meros, utilizando esta propriedade.	31
Figura 6. Estruturas de complexos trinucleares com cinco acetatos e ligante N-heteroaromático quelante e em ponte. Modos de coordenação: A) μ-η ¹ (C),η ² (N,N); B) μ-η ¹ (N),η ² (N,N).	33
Figura 7. Diagrama ilustrativo do número de publicações científicas, até 2016, dos metais de transição em estudos contra cânceres. Vermelho: > 4000; laranja: entre 4000 e 1000; amarelo: entre 500 e 1000; verde: entre 500 e 200; azul: entre 200 e 100; violeta: abaixo de 100, e branco: produção insignificante.	33
Figura 8. Fármacos à base de platina atualmente em uso no mercado. A) cis-platina; B) carboplatina; C) oxaliplatina.	35
Figura 9. Estruturas de alguns ligantes N-heteroaromáticos comumente utilizados em síntese de complexos intercaladores de DNA.....	38
Figura 10. Estruturas dos dois metalofármacos de rutênio a atingirem fase clínica. A) NAMI-A; B) KP1019.	39
Figura 11. A) Complexo com ligantes piridínicos substituídos (R) e ligante lábil CO ou NO. Quando L = CO, a carga n é zero; quando L = NO, a carga é +1. B) Complexo	

com três ligantes azanaftalenos substituídos, promissor candidato a metalofármaco anticâncer e antiparasitário.	40
Figura 12. Ciclo de vida do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Figura 13. Estruturas dos dois fármacos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas. A) Nifurtimox (racemato e mistura E-Z); B) Benznidazol.	45
Figura 14. Esquema geral de reação de cetonas com aminas, para formação de iminas.....	59
Figura 15. Mecanismo de reação proposto para a formação da imina.....	60
Figura 16. Esquema geral de formação do ligante dppz a partir da diamina e da dicetona.....	61
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do ligante dppz em CD_2Cl_2 , 300 MHz, 298 K, 20 mM.	62
Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante dppz em CD_2Cl_2 , 300 MHz, 298 K, 20 mM.	62
Figura 19. Espectro de FT-IR para o ligante dppz em pastilha de KBr, 40 acumulações.	64
Figura 20. Espectro eletrônico qualitativo para o ligante dppz em CHCl_3	65
Figura 21. Espectros eletrônicos de absorção para os ligantes fenazínicos deste trabalho, em DMSO.....	67
Figura 22. Espectros de absorção eletrônica do ligante dppz em concentrações crescentes, em ACN, 298 K.	69
Figura 23. Espectros de emissão do ligante dppz, λ_{exc} 271 nm, em acetonitrila, em concentrações crescentes.....	70
Figura 24. Diferenças entre máximos de onda para absorção do ligante dppz na região diaza, em metanol e tolueno.	71
Figura 25. Correlação entre o parâmetro ET_{30} e a energia de transição eletrônica para a banda de menor energia do ligante dppz, para diversos solventes.....	73
Figura 26. Correlação entre o parâmetro SPP e a energia de transição eletrônica para a banda de menor energia do ligante dppz, para diversos solventes.....	73
Figura 27. Espectros de absorção para o ligante dppz em 1-propanol e em solução alcohólica acidificada com HCl para pH 1,0.	74
Figura 28. Esquema de reação para formação do precursor (1)	75
Figura 29. Espectro eletrônico do precursor (1) e deconvolução calculada.	76

Figura 30. Sistema de coordenadas adotado para a construção do DOM. O sobrescrito linha (') indica coordenada local.	77
Figura 31. Diagrama de orbitais moleculares proposto para complexos trinucleares com ponte μ_3 -oxo	78
Figura 32. Esquema de reação para formação do precursor (2).....	80
Figura 33. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para os precursores (1) reduzido e (2), em MeOH.....	81
Figura 34. Esquema de reação para formação do precursor 3.....	82
Figura 35. Interação sigma (ligação química, seta vermelha) e interação π (retrodoação), esta última se dando entre um dos LUMOs do ligante pirídínico e o orbital $d\pi$ do metal.	83
Figura 36. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para o precursor 3.....	83
Figura 37. Esquema de reação para formação do precursor (4).....	85
Figura 38. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para os precursores (3) e (4).	86
Figura 39. Esquema de reação para formação do novo complexo.	86
Figura 40. Ativação da ligação C-H no ligante fenazínico e ortometalação.	87
Figura 41. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para o novo complexo em acetonitrila e seu precursor (4) em metanol.	89
Figura 42. Modos de coordenação de um ligante acetato a um ou mais metais.....	91
Figura 43. Espectro de absorção no infravermelho (FT-IR) para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$	91
Figura 44. Ilustração representando modos vibracionais possíveis para o íon acetato. Preto: C; Vermelho: O; Cinza: H.	92
Figura 45. Efeito da corrente de anel sobre o campo magnético externo aplicado, B_0 , nos hidrogênios paralelos ao plano do anel.	93
Figura 46. Numeração para os hidrogênios do complexo sintetizado.	95
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H para o complexo sintetizado, CD_3CN , 500 MHz, 100 mM, 298 K.	96
Figura 48. Espectro de MS por ESI no modo positivo do complexo sintetizado.	99
Figura 49. Distribuição isotópica para o íon molecular do complexo sintetizado. ...	100
Figura 50. Espectro de fragmentação MS^2 por ESI^+ do íon de m/z 1082,9774.....	101
Figura 51. Espectro eletrônico dos complexos ortometalaados 1-5, em diclorometano.	103

Figura 52. Estrutura dos complexos 1-5 utilizados neste trabalho. O núcleo fenantrolínico em comum é mostrado em azul. O contra-íon é PF_6^-	104
Figura 53. Estruturas do par de enantiômeros para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, com cinco acetatos e ligante dppz, geradas através do software Chem3D. O contra-íon foi omitido. Vinho: Ru; azul: N; vermelho: O; cinza: C; branco: H.....	105
Figura 54. Espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, em concentrações crescentes, a 298 K, em acetonitrila.	106
Figura 55. Espectros eletrônicos de absorção dos complexos 1-5 (A-E) submetidos a diferentes tempos de borbulhamento de gás oxigênio em solução de diclorometano.	107
Figura 56. Estabilidade do complexo 2 em solução de acetonitrila em solução de ACN por 28 dias.....	108
Figura 57. Estrutura do brometo de etídio.....	109
Figura 58. Espectros de fluorescência do brometo de etídio em DNA em concentrações crescentes dos complexos 1-5 (A-E) (uma replicata de cada está mostrada). F) Espectro de emissão do brometo de etídio em solução na ausência (vermelho) e na presença (azul) de DNA.	110
Figura 59. Três conformações possíveis para a molécula de DNA.....	112
Figura 60. A) Comparação entre Concentração Citotóxica (CC50) para células saudáveis (LLC-MK2) e Concentração Inibitória (IC50) para formas amastigotas, do complexo 2 e seu ligante. B) Citotoxicidade para células saudáveis LLC-MK2 para o complexo 2 e seu ligante em diferentes concentrações. C) Atividade tripanocida para amastigotas para o complexo 2 e seu ligante, em diferentes concentrações. Controle = poços onde nenhum composto foi aplicado. L = ligante e C = complexo.....	116
Figura 61. Gráfico de dose-resposta dos complexos 2-5 e ligantes livres para a forma epimastigota (uma replicata). (L = ligante).	120
Figura 62. Espectro HMQC (^1H - ^{13}C) do ligante dppz, 10^{-2} mol L^{-1} , 500 MHz, CDCl_3	135
Figura 63. Espectro HMBC do ligante dppz, 10^{-2} mol L^{-1} , 500 MHz, CDCl_3	135
Figura 64. Espectro COSY (^1H - ^1H) do ligante dppz, 10^{-2} mol L^{-1} , 500 MHz, CDCl_3 .	136
Figura 65. Espectros eletrônicos de absorção do ligante dppz em diferentes solventes.	136

Figura 66 . Retas de absorbância em função da concentração de dppz em três bandas, em ACN.....	137
Figura 67 . Curvas obtidas da titulação do aduto EB-DNA com os complexos 1-5 (A-E) ajustadas para uma equação logarítmica.....	138
Figura 68 . A) Citotoxicidade dos complexos 2-5 e seus respectivos ligantes frente à linhagem celular saudável LLC-MK2 em diferentes concentrações. B) Atividade tripanocida contra amastigotas dos complexos 2-5 e seus respectivos ligantes em diferentes concentrações. A faixa de concentrações foi de 10 a 0,078 μ M. L = ligante. Uma das replicatas está mostrada.	140
Figura 69 . Gráficos de dose-resposta para o benznidazol contra T. cruzi nas formas celulares A) amastigota e B) epimastigota. A faixa de concentrações foi de 100 a 0,078 μ M.	141

Lista de tabelas

Tabela 1. Características taxonômicas do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Tabela 2. Valores de massas e número de mols dos reagentes e produtos e rendimentos de cada síntese do precursor 3.	51
Tabela 3. Dados de RMN e atribuição para o ligante dppz.	63
Tabela 4. Bandas observadas, transições associadas e coeficientes de absorvidade molar calculados para o dppz em CHCl ₃	67
Tabela 5. Atribuições de bandas de absorção para o precursor (1) em DMSO.	79
Tabela 6. Atribuição do espectro eletrônico para o novo complexo.	89
Tabela 7. Atribuição dos picos observados no espectro de ESI ⁺ -MS ² para a fragmentação do íon molecular de m/z 1081,9751, do complexo sintetizado.	102
Tabela 8. Valores de [Q] médio observados e K _{app} médio calculados para os complexos 1-5.	111
Tabela 9. Valores (μmol L ⁻¹) de CC ₅₀ para células saudáveis LLC-MK2 e IC ₅₀ para amastigotas, obtidos por três experimentos independentes, médias dos valores com desvio padrão e índice de seletividade dos complexos 2-5, seus ligantes e benznidazol.	118
Tabela 10. Valores de IC ₅₀ , obtidos por três experimentos independentes, para os complexos 2-5, seus ligantes e benznidazol, e média com desvio-padrão, para a forma epimastigota.	120
Tabela 11. Composição química do meio de cultura RPMI.	139

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

4-ampy	4-aminopiridina
4-pic	4-picolina (4-metilpiridina)
ACN	Acetonitrila
ACN-D₃	Acetonitrila deuterada
BZ	Benznidazol
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% da população celular
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Correlação ¹ H- ¹ H)
DCE	1,2-Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DCM-d₂	Diclorometano deuterado
dd	Duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DOM	Diagrama de Orbitais Moleculares
dppn	benzo[i]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
dppz	dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
dppz-CH₃	7-metildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
dppz-Cl	7-clorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
ESI-MS² (ou ESI-MS/MS)	<i>Electrospray Ionization with Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas Sequencial com Ionização por <i>Electrospray</i>)
E_T(30)	Energia de transição eletrônica molar, em kcal mol ⁻¹ , baseada no corante-referência de Reichardt, em CNTP
EtOH	Etanol
EtOAc	Acetato de etila
fs-DNA	<i>Fish sperm DNA</i> (DNA de esperma de peixe)
FT-IR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)

	<i>Heteronuclear Multiple-bond Correlation Spectroscopy</i>
HMBC	(Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de Ligações Múltiplas)
	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i>
HMQC	(Espectroscopia Heteronuclear de Correlações Quânticas Múltiplas)
	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular ocupado de maior energia)
HOMO	
IC	Transição de transferência de carga Intra-Cluster
IC₅₀	Concentração inibitória para 50% da população de células
IL	Transição Intra-ligante
	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular vazio de menor energia)
LUMO	
MeOH	Metanol
MM	Massa molar (g mol ⁻¹)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF	Nifurtimox
OAc	Acetato
	<i>Pan-American Health Organization</i> (Organização Pan-Americana de Saúde)
PAHO	
phen	Fenantrolina (1,10-fenantrolina)
phen-diona	1,10-fenantrolina-5,6-diona
py	Piridina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura celular)
	<i>Singly Occupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular unicamente ocupado)
SOMO	
	<i>Solvent Polarity Parameter</i> (Parâmetro de Polaridade de Solvente)
SPP	
IS	Índice de Seletividade
TCCL	Transição de transferência de carga cluster-ligante
TMS	Tetrametilsilano (Si(CH ₃) ₄)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
	<i>Ultraviolet-Visible-Near-Infrared</i> (Ultravioleta-Visível-Infravermelho Próximo)
UV-Vis-NIR	

δ	Deslocamento químico (ppm)
ϵ	Coeficiente de absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
η	Rendimento (%)
ν	Número de onda (cm^{-1})
$\nu_{\text{sim}} / \nu_{\text{as}}$	Estiramento simétrico/assimétrico
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

Sumário

1. Introdução	23
1.1. Rutênio: origens, histórico e impactos econômicos	23
1.2. Carboxilatos polinucleares de rutênio com ponte μ_3 -oxo	26
1.3. Propriedades e aplicações	29
1.4. Metalodrogas e suas interações com biomoléculas: intersecções da química inorgânica com a farmacologia.....	33
1.5. O parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	40
2. Objetivos	46
3. Parte experimental.....	47
3.1. Procedência dos solventes e reagentes	47
3.2. Procedimentos experimentais	48
3.2.1. Síntese do ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz): $C_{18}H_{10}N_4$..	48
3.2.2. Síntese dos complexos trinucleares precursores	49
3.2.3. Síntese do complexo inédito	52
3.3. Equipamentos utilizados para caracterizações.....	53
3.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis-NIR.....	53
3.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	53
3.3.3. Espectroscopia de absorção vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	53
3.3.4. Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI-MS ²)	54
3.4. Ensaio de atividade tripanocida.....	54
3.4.1. Ensaio de inibição de crescimento da forma epimastigota	54
3.4.2. Ensaio da inibição de crescimento da forma amastigota intracelular	55
3.4.3. Citotoxicidade em células mamíferas	55
3.4.4. Análise estatística	56
3.5. Interação dos complexos com DNA pelo deslocamento de brometo de etídio.....	56
3.6. Reatividade dos complexos frente a borbulhamento de oxigênio molecular e estabilidade em solução.....	57
3.7. Empilhamento π do ligante dppz e do complexo 2	58
3.8. Solvatocromismo do ligante dppz.....	58
4. Resultados e discussão	59
4.1. Síntese e caracterização do ligante dppz e algumas propriedades espectroscópicas.....	59

4.2. Síntese dos complexos precursores e inéditos: discussões simultâneas às atribuições dos espectros eletrônicos de absorção.....	74
4.2.1. Precursor (1), “cluster-mãe”: $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$	75
4.2.2. Precursor (2): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_2\text{CO}]^0$	79
4.2.3. Precursor (3): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{CO}]^0$	81
4.2.4. Precursor (4): $\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{MeOH})\text{PF}_6$	84
4.3. Complexo: $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$	86
4.3.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IV).....	90
4.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	93
4.3.3. Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i> (ESI-MSMS ²).....	97
4.4. Reatividade, estabilidade e propriedades dos complexos ortometalados	103
4.5. Interação dos ligantes e complexos com <i>fsDNA</i> : Deslocamento de brometo de etídio (EB) por fluorescência.....	109
4.6. Avaliação da atividade tripanocida dos complexos 2-5	115
5. Conclusões	123
6. Perspectivas futuras.....	124
7. Referências	125
8. ANEXO	135

1. Introdução

1.1. Rutênio: origens, histórico e impactos econômicos

No ano de 1796, na cidade de Dorpat (antigo Império Russo e atual região da Estônia), nascia Karl Karlovich Klaus, cientista responsável pela descoberta do elemento químico de número 44, o rutênio. O entusiasmo pelas ciências naturais fez com que o jovem Klaus desenvolvesse aptidão para trabalho em laboratórios, mudando-se em 1811 para São Petersburgo, onde iniciou seus estudos e sua carreira científica na área de química. A Rússia do século XIX mantinha uma forte economia baseada em sua rica reserva de minérios na região de Ural - a “espinha de ferro” do país - a partir do qual o imperador Alexander I ordenava uma mineração em massa em busca de platina para cunhagem de moedas. Havia muito esforço e interesse na extração deste metal das ricas minas russas; entretanto, o resíduo deste processo era acumulado sem uso. Em 1841, já atuando como professor e pesquisador na Universidade de Kazan, Klaus obteve amostras deste resíduo de “platinoides” - como eram chamados os elementos irídio, ródio, ósmio e paládio existentes no extrato bruto da mineração de platina. A ele é atribuída a frase: *“meu objetivo não era descobrir... novos corpos, mas preparar os novos compostos. A propósito, eu acidentalmente descobri a presença de um novo corpo, mas não conseguia separá-lo nas primeiras tentativas”*¹. O intuito inicial de Klaus era preparar compostos destes elementos já conhecidos a partir deste resíduo, utilizando um método de precipitação dos metais (primeiramente, na forma de óxidos) e depois adicionando fontes de cloreto (HCl, KCl) para formar sais mistos contendo os ânions cloreto e óxido. Ao fazer uma redução química dos “sais duplos” de cloreto de rutênio e de potássio (presumivelmente contendo espécies K_3RuCl_6 , K_2RuCl_6 e RuO_xCl_y) com sulfeto de hidrogênio, o que ele observava, agora, era que alguns precipitados deste isolado eram muito diferentes daqueles dos metais conhecidos. *“Uma cor densa, azul-safira se formava. Nem o irídio, nem o ródio, nem qualquer outro metal poderiam reagir desta maneira”*¹. Após isolar os sólidos obtidos e continuar um tratamento analítico, Klaus conseguiu obter generosas quantidades de um pó cinza de um novo elemento, conferindo a este a massa atômica de 104,2 u.m.a.

“Eu nomeei o novo corpo, em honra de minha terra natal, rutênio”^{1,2} (...)”

¹ Traduções livres e diretas de trechos extraídos integralmente do trabalho de Pitchkov, 1996.

² A palavra em latim para regiões eslávicas é *Ruthenia*, daí a etimologia do nome.

O anúncio do novo elemento, de símbolo Ru, foi então reportado para a Academia de Ciências de São Petersburgo, em 1844. Não apenas Klaus descrevia a obtenção de um metal novo, mas também algumas propriedades como reatividade e aspectos morfológicos de cristais, observados em microscópio, de compostos de halogênios, óxidos, aminas e sulfetos de rutênio. A avidez para explorar a nova descoberta era tamanha que Klaus chegava a testar o gosto e cheiro de seus compostos, conferindo um sabor “apimentado” ao tetróxido de ósmio, e um gosto “cáustico” às aminas de rutênio. Na tentativa de explicar a reatividade dos óxidos de platinoides, ele propunha uma hipótese de que a capacidade de “saturação” destes compostos com o íon amônio dependia da natureza do óxido metálico reagente. Na época, ainda não haviam sido desenvolvidas teorias de ligações químicas que explicassem a estrutura da matéria, mas Klaus especulava que o íon amônio poderia combinar-se de alguma forma com o metal ou seu óxido, guardando uma relação quantitativa. Anos mais tarde, o químico suíço Alfred Werner desenvolvia a Teoria da Coordenação, que foi o molde para descrever o que se conhece hoje por complexos ou compostos de coordenação (TOMA, 2014). De certa forma, as ideias lançadas pelo químico russo ganharam credibilidade à luz da teoria de Werner. “*As visões de Werner representam uma nova modificação (...) da teoria de combinações feita por Klaus*”³. Estas descobertas renderam a Klaus o Prêmio Demidov em 1886, o prêmio russo mais prestigioso para Ciências Naturais, pela descoberta do elemento químico rutênio e pelas contribuições à química de platinoides (PITCHKOV, 1996).

O material *Mineral Commodity Summaries (MCS) 2019*, publicado pela *US Geological Survey (USGS)*, cataloga uma série de variáveis econômicas acerca dos metais do grupo da platina (*platinum-group metals, PGMs*), bem como de outros processos de interesse à indústria de mineração norte-americana. Os gráficos a seguir (figura 1) mostram algumas tendências da utilização do rutênio e preços de importação dos *PGMs* para os Estados Unidos da América nos últimos anos (USGS, 2019).

³ Tradução livre e direta de trecho extraído integralmente do trabalho de Pitchkov, 1996.

Figura 1. Preço, em dólares americanos, de importação por quilograma de cada metal do grupo da platina ao longo dos anos (barras) e consumo de rutênio nos Estados Unidos, em toneladas, por ano (linha).

Fonte própria.

Observa-se um salto no crescimento da importação de rutênio nos EUA no começo do milênio, seguida por uma diminuição e estabilização a partir do começo da última década. Segundo a fonte dos dados, o crescimento inicial é devido principalmente à necessidade de fabricação de catalisadores automobilísticos para redução de CO₂ e na indústria petrolífera para refinamento de petróleo, sendo o rutênio um dos primeiros metais a encontrar aplicação nestas áreas (USGS, 2019). Atualmente, a compra de PGMs nos EUA destina-se ao uso de catalisadores, componentes eletrônicos e microeletrônicos, capacitores, vidros, cerâmicas e aparelhos médicos, e, nestes casos, o rutênio acaba sendo substituído por metais com diferentes propriedades ou mesmo utilizado em conjunto a eles, em menor quantidade. A quantidade de reserva destes minerais é estimada em um milhão de toneladas, encontrando-se distribuídas em países do sul do continente africano, Rússia e EUA (USGS, 2019). Quando se compara o preço de importação por quilo, o rutênio mostrou-se o metal mais barato em praticamente todos os anos. A platina mostra-se a mais cara (com exceção do ródio, que foi omitido dos gráficos por ter um

preço médio de importação muito acima dos demais), e isto é surpreendente, pois a platina é o carro-chefe atual da pesquisa com metalofármacos, sobretudo anticâncer, e é usada amplamente em escala hospitalar há 40 anos (MARLOYE et al., 2016). Com a análise dos dados, é possível demonstrar que é financeiramente viável manter e ampliar a pesquisa com base em rutênio em diferentes ramos, incluindo a química inorgânica medicinal.

1.2. Carboxilatos polinucleares de rutênio com ponte μ_3 -oxo

É sabido, já há algum tempo, que compostos de coordenação podem formar estruturas contendo mais de um centro metálico, utilizando ligantes em ponte que conectam dois ou mais metais, ou mesmo através de ligações diretas entre os elementos metálicos (COTTON et al., 1965; RADIUS et al., 2006). A utilização de ligantes bi-, tri- ou polidentados para formação de complexos polimetálicos, do ponto de vista de síntese, resulta numa grande gama de obtenção de estruturas, combinando núcleos do mesmo metal ou de elementos diferentes (BRAZ et al., 2020; LESCOP, 2017). Moléculas deste tipo podem possuir a característica de comunicação eletrônica e magnética entre os íons metálicos em diferentes sítios, além de acesso a conformações, configurações, geometrias moleculares e cargas formais diferentes dos complexos mononucleares (CASTELLANO et al., 2015; LOW et al., 2005). A própria natureza é fonte de belos exemplos de complexos polimetálicos: a hemeritrina é uma hemoproteína encontrada em algumas espécies de invertebrados marinhos. Semelhante à hemoglobina, liga-se reversivelmente ao oxigênio molecular, sendo responsável pelo transporte deste. Sua estrutura consiste em dois núcleos de ferro, cujos estados de oxidação variam entre +2 e +3 (processos redox regulados por enzimas), a depender da coordenação de O_2 . Os ligantes em ponte são carboxilatos de glutamato (Glu) e aspartato (Asp), e os ligantes monodentados são resíduos de histidina (His) (COATES et al., 2016). Já em mitocôndrias e cloroplastos, é comum encontrar *clusters* de ferro-enxofre onde íons $Fe^{2+/3+}$ são ligados por pontes de sulfeto, de fórmula Fe_xS_y (x, y variando de 1 a 4) e assumem diversas conformações (ZHANG et al., 2014). Estas estruturas são essenciais para geração de energia e pela catálise enzimática, sendo cofatores de uma classe de enzimas envolvidas em processos redox e fosforilação oxidativa, chamadas ferredoxinas (MOTOMURA et al., 2019; TOMA, 2015a).

Figura 2. **A)** Equilíbrio de espécies mediante reação redox e complexação de O_2 , na hemeproteína hemeritrina. **B)** Estruturas de clusters de Fe-S presentes em ferredoxinas.

Fonte própria.

Em relação aos complexos polimetálicos de rutênio (especificamente, os combinados com o ânion acetato) deve-se muito ao químico Alfred Mond, que reportou suas descobertas em 1930. Ao aquecer $RuCl_3$ com álcali e depois tratar os produtos com ácido acético, Mond observava a formação de espécies contendo ligantes água, hidróxido, oxo e acetato, sendo estes dois últimos presumivelmente em ponte conectando dois íons rutênio (MOND, 1930). Nesta época, a análise elementar permitia saber a composição dos sólidos isolados, mas a estrutura exata e valência dos íons era desconhecida. Alguns anos depois, em 1960, a primeira estrutura de fórmula $[M_3O(CH_3COO)_6(H_2O)_3]^+$ (onde $M = Cr^{3+}$) foi obtida por Leslie Orgel e resolvida por difração de raios-X de monocristal. Esta publicação confirmou o modo atípico de coordenação do ânion O^{2-} aos três íons metálicos na forma de ponte μ_3 -oxo, o que era até então questionado (ORGEL, 1960). Mais recentemente, o levantamento feito por Santos e colaboradores mostra dados publicados sobre esta classe de compostos para praticamente toda a primeira série e vários metais da segunda e terceira séries de transição (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Nb, Mo, Ru, Rh, W, Re e Ir), além de Mg^{2+} , Al^{3+} e Gd. Também são reportadas espécies heteropolimetálicas, com dois metais diferentes (M e M'), de fórmula $[M_2M'O(CH_3COO)_6(Solv)_3]$ (Solv = solvente) (SANTOS et al., 2010).

No início da década de 70, Spencer e Wilkinson deram continuidade às observações descritas por Mond, estudando novamente os acetatos de rutênio; agora, propondo uma nova rota sintética, envolvendo o refluxo de RuCl_3 com ácido acético glacial e acetato de sódio. Eles então obtiveram a espécie trinuclear conforme descrito acima, agora onde $\text{M} = \text{Ru}^{3+}$ (SPENCER et al., 1972). Semelhante à estrutura-base já descrita para outros metais, Cotton e colaboradores resolveram, por difração de raios-X, a estrutura da espécie $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu_2\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{PPh}_3)]^+$ (PPh_3 = trifenilfosfina), sendo a primeira espécie de rutênio desta classe a ser estudada estruturalmente. Um extenso artigo de revisão publicado pelo Prof. Henrique Toma e colaboradores mostra também espécies de rutênio descritas com variedades nos grupos R dos carboxilatos, obtendo-se os complexos com formiato, acetato, lactato, benzoato e outros (TOMA et al., 2001).

Figura 3. **A)** Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{PPh}_3)]^+$, a primeira imagem obtida por Cotton a partir de dados de difração de raios-X. **B)** Estrutura genérica de carboxilatos trinucleares de rutênio, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^n$, com ponte μ_3 -oxo (vermelho), μ_2 -RCOO (verde), ligantes periféricos L (azul) e carga $n^{+/-}$.

A) Fonte: reprodução direta de COTTON et al., 1971. **B)** Fonte própria.

Desde então, as moléculas que contêm esta estrutura-base, e análogos desta, têm sido objeto de extensos estudos na área da Química de Coordenação. A figura 4, a seguir, mostra o número de publicações acerca desta classe de complexos de rutênio entre os anos de 1970 a 2018. A base de dados usada foi a plataforma online Scopus, e as palavras-chaves usadas foram “*trinuclear ruthenium carboxylate*”. O

conteúdo destes trabalhos publicados será exemplificado, de maneira geral, na próxima sessão.

Figura 4. Número de publicações recuperadas da busca na base Scopus, utilizando como palavras-chaves “trinuclear ruthenium carboxylate”, de 1970 a 2018.

Fonte própria.

1.3. Propriedades e aplicações

A fórmula geral desta classe de complexos é descrita como $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu_2\text{-RCOO})_6(\text{L})_3]^{n+}$, sendo que neste trabalho serão abordados os complexos com acetato ($\text{R} = \text{CH}_3$). A geometria da molécula consiste num arranjo triangular, onde *i*) o núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}]$ está num plano, formando um triângulo com o ânion O^{2-} no centro e os íons Ru^{n+} nos vértices; *ii*) os acetatos ligam os núcleos metálicos de dois a dois (em ponte); e *iii*) a esfera de coordenação é completada por ligantes L , periféricos, em posição *trans* ao óxido central (DIKHTIARENKO et al., 2017a; TOMA et al., 2001). L representa ligantes que se coordenam, por exemplo, por nitrogênio, carbono, oxigênio, enxofre, fósforo e ânions halogênios; os ligantes comumente são N-, S- ou O-heterociclos aromáticos, fosfinas e moléculas de solvente. A depender da rota sintética adotada, pode-se obter complexos onde todos os ligantes L são iguais, ou com menor grau de simetria (onde dois ou os três ligantes L são diferentes). Já a carga n pode variar em até cinco valores acessíveis eletroquimicamente, (de -2 a +2), alguns deles isoláveis (0 e +1) (NIKOLAOU et al., 2010; TOMA et al., 2001); quando

$n > 0$ (um complexo-cátion), os contra-íons mais comuns são RCO_2^- , Cl^- , PF_6^- , BF_4^- e ClO_4^- . É descrito que os íons Ru^{n+} interagem fortemente com o ânion óxido central, existindo uma intensa deslocalização eletrônica ao longo dos orbitais dos íons rutênio e óxido (NIKOLAOU et al., 2010), além de evidências de que os acetatos (PEREZ, 2018) e ligantes periféricos com extensão de orbitais π (POSSATO et al., 2017b) também contribuam para a este fenômeno. Consequência deste fato é que a unidade central se comporta como sendo um único núcleo metálico, abordado como $[\text{Ru}_3\text{O}]^n$, e suas propriedades físico-químicas (e biológicas, como será abordado ao longo deste trabalho) podem ser moduladas em função dos ligantes periféricos L – e é justamente este o princípio de diversos trabalhos com estas moléculas.

Com base no exposto acima, os acetatos trinucleares de rutênio mostram propriedades eletroquímicas, magnéticas, espectroscópicas e catalíticas muito interessantes, e que vêm sendo estudadas continuamente. A citar exemplos, na área de fotoquímica e fotofísica, um trabalho recente do grupo mostra que a junção de unidades de naftalimida a um centro trinuclear de rutênio permite formar um filme eletrocromico na superfície de eletrodos (BRAZ et al., 2020), tendo possíveis aplicações na construção de dispositivos fotoeletrônicos. Na catálise, o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]^0$, de fácil obtenção sintética, foi capaz de promover reações de hidratação de nitrilas em meio aquoso com ótimos rendimentos, além da isomerização estereosseletiva de álcoois alílicos (DIKHTIARENKO et al., 2017b), o que é muito motivador para a síntese orgânica, e pode inclusive substituir os catalisadores de paládio com carvão ativado, de custo muito alto. No campo da eletroquímica, foi descrito um filme eletroativo de complexos combinados a um ligante π -conjugado, surfactante, para aplicação em dispositivo eletrocromico, uma vez que estes complexos respondem rapidamente à variações de potencial elétrico, e a absorção de luz é modulada num largo espectro, atingindo até o infravermelho próximo e com alto coeficiente de absorvidade molar (NAIDEK et al., 2014). Além disso, estes complexos podem ser usados como as chamadas *unidades de montagem*, obtendo-se estruturas oligoméricas estendidas, de interesse da Química Supramolecular. Esta área da química trata tanto das interações covalentes (ligações químicas de fato) e interações não-covalentes (chamadas interações “fracas”) entre um número discreto de átomos, moléculas ou íons, e o conjunto dessas interações pode ser significativo para que haja formação de agregados de espécies em solução, transmissão de sinais químicos, estabilização de estruturas e reconhecimento

molecular por um sistema químico (LEIGH, 2016). Estes fenômenos estão muito presentes em sistemas biológicos envolvendo macromoléculas - como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos de membrana - uma vez que vários processos bioquímicos (reconhecimento e transporte de drogas por biomoléculas, mobilidade e estabilidade de membranas, compactação de macromoléculas, etc) se dão por interações não-covalentes e equilíbrios de forças atrativas e repulsivas (BARREIRO, 2008). Assim, os oligômeros de complexos trinucleares de rutênio são ótimos *building blocks* explorados dentro de vários contextos na química supramolecular, formando *supermoléculas*, como as descritas na figura 5 (BRAZ et al., 2020; NIKOLAOU et al., 2010; TOMA et al., 2011, 2012).

Figura 5. Esquema ilustrativo de supermoléculas. **A)** Dímero, **B)** trímero e **C)** tetrâmero inorgânicos contendo múltiplas unidades trinucleares (representadas pelos triângulos), unidas por ligantes em ponte (P). É possível crescer estruturas com menor ou maior número de meros, utilizando esta propriedade.

Fonte própria.

É comum encontrar na literatura a denominação *cluster* para estes complexos. A definição de *cluster* segundo a *IUPAC Gold Book* é, em tradução livre, “*um número de centros metálicos agrupados proximamente que podem ter ligações metálicas diretas ou interações através de um ligante em ponte*” (IUPAC, 2019). Como já citado, os ligantes em ponte permitem sim interações significativas entre os centros metálicos, sendo aceitável a denominação *cluster*. Tanto é que, quando se compara os complexos análogos contendo íons ferro ($[\text{Fe}_3\text{O}]^n$), muda-se totalmente as

propriedades espectroscópicas e eletroquímicas em relação aos de rutênio (KUMAR et al., 2013). Isso porque os orbitais 3d do ferro, assim como os dos metais da primeira série de transição, não são grandes o suficiente para que haja uma sobreposição efetiva entre os orbitais d-d dos metais e nem entre os orbitais 2p do oxigênio, o que diminui a extensão da deslocalização eletrônica entre os íons metálicos - propriedade esta que é muito presente nos complexos de Ru, já que os orbitais 4d são maiores e portanto existe uma maior mistura entre os orbitais mencionados, um dos fatores que dita a rica química destas moléculas e que as faz tão interessantes no cenário de coordenação.

Na maioria das condições de síntese e manipulação destes complexos, considera-se que o núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ seja inerte e estável, conservado nas reações, e que as substituições ocorram exclusivamente nas posições axiais, substituindo-se as moléculas de solvente (Solv) por ligantes N-, O- ou S-heterocíclicos monodentados (designados "L") (TOMA et al., 2001). De fato, complexos assim são bastante estáveis, tanto em solução quanto em estado sólido, e de modo geral a cinética da reação reversa é extremamente lenta ($k \approx 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ para a troca de piridina em $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_3]$ por acetonitrila) (TOMA et al., 2001). Ainda assim, existe uma classe de *clusters* que foge às estas observações. Quando se tem um complexo-precursor assimétrico, de fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{Solv})]$, e faz-se reagir este com um ligante N-heterocíclico aromático **bidentado**, L', o produto é um complexo com cinco acetatos: $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(\text{L})_2(\text{L}')]$. O ligante L' coordena-se de modo bidentado a um rutênio, pelos dois nitrogênios, e monodentado a outro rutênio, por uma ligação C-Ru. Assim, o ligante age como quelante e ponte, com modo de coordenação descrito como $\mu\text{-}\eta^1(\text{C}), \eta^2(\text{N}, \text{N})$ (η é a hapticidade do átomo coordenante). Este processo é conhecido como ortometalação (GHOSH et al., 2015; KUMAR et al., 2016a).

Existem poucos estudos acerca de acetatos trinucleares de rutênio com ligantes ortometalados. O primeiro trabalho data de 2005, quando Chen e colaboradores reportaram alguns complexos ortometalados com bipyridina ou fenantrolina, com estruturas resolvidas por dados cristalográficos; já trabalhos mais recentes mostram também outros ligantes N-heteroaromáticos com modo de coordenação $\mu\text{-}\eta^1(\text{N}), \eta^2(\text{N}, \text{N})$ (CHEN et al., 2005; COCKERTON et al., 1992; DAI et al., 2011; YE et al., 2006). No grupo de pesquisa da professora Sofia Nikolaou, começou-se recentemente uma investigação de propriedades físico-químicas e

biológicas destes complexos (estas últimas nunca antes relatadas) (DA SILVA, 2019). Desta forma, o conjunto de informações sobre estas moléculas ainda é novo e a literatura, escassa, o que impulsiona o desenvolvimento de trabalhos deste tipo.

Figura 6. Estruturas de complexos trinucleares com cinco acetatos e ligante N-heteroarômico quelante e em ponte. Modos de coordenação: **A)** $\mu\text{-}\eta^1(\text{C}),\eta^2(\text{N},\text{N})$; **B)** $\mu\text{-}\eta^1(\text{N}),\eta^2(\text{N},\text{N})$.

Fonte própria.

1.4. Metalodrogas e suas interações com biomoléculas: intersecções da química inorgânica com a farmacologia

Progressivamente, a pesquisa em ciências farmacêuticas tem encontrado bases farmacológicas no universo da química inorgânica, não mais se moldando unicamente no domínio dos compostos orgânicos. O uso de metais de transição como fármacos traz a vantagem de que estes têm propriedades físico-químicas que estão ausentes ou não são tão pronunciadas nas moléculas orgânicas, tais como carga formal dos complexos, acessibilidade de vários estados de oxidação *in vivo*, variedade de geometrias moleculares e propriedades eletrônicas e magnéticas (BARRY et al., 2013, 2014), que podem melhorar fatores como interação fármaco-receptor, internalização celular, biodisponibilidade e seletividade (BARREIRO, 2008; BARREIRO et al., 2011; MEDICI et al., 2015). Trabalhos de revisão mostram que, logo atrás da platina, o rutênio e o cobre lideram o *ranking* dos metais mais pesquisados na área de metalofármacos para cânceres (MARLOYE et al., 2016).

Figura 7. Diagrama ilustrativo do número de publicações científicas, até 2016, dos metais de transição em estudos contra cânceres. Vermelho: > 4000; laranja: entre 4000 e 1000; amarelo: entre

500 e 1000; verde: entre 500 e 200; azul: entre 200 e 100; violeta: abaixo de 100, e branco: produção insignificante.

21 Sc Scandium 44.956	22 Ti Titanium 47.867	23 V Vanadium 50.942	24 Cr Chromium 51.996	25 Mn Manganese 54.938	26 Fe Iron 55.845	27 Co Cobalt 58.933	28 Ni Nickel 58.693	29 Cu Copper 63.546	30 Zn Zinc 65.38
39 Y Yttrium 88.906	40 Zr Zirconium 91.224	41 Nb Niobium 92.906	42 Mo Molybdenum 95.95	43 Tc Technetium 98.907	44 Ru Ruthenium 101.07	45 Rh Rhodium 102.906	46 Pd Palladium 106.42	47 Ag Silver 107.868	48 Cd Cadmium 112.414
57-71	72 Hf Hafnium 178.49	73 Ta Tantalum 180.948	74 W Tungsten 183.84	75 Re Rhenium 186.207	76 Os Osmium 190.23	77 Ir Iridium 192.217	78 Pt Platinum 195.085	79 Au Gold 196.967	80 Hg Mercury 200.592

Fonte: reprodução direta de MARLOYE et al.

O exemplo mais clássico de metalofármaco⁴ anticâncer é a cisplatina, $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{Cl})_2]$, cuja autorização para uso clínico já completa quatro décadas (FISCHER et al., 2010). Embora ela esteja enquadrada na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS (World Health Organization, 2015) e seja um fármaco de primeira escolha para uma enorme variedade de tumores, como cabeça, bexiga, baço, próstata e útero, existem uma série de efeitos colaterais muito graves associados ao seu uso, como nefro-, neuro- e hepatotoxicidade, anemia hemolítica e desequilíbrios hidroeletrólíticos (DASARI et al., 2014; MILOSAVLJEVIC et al., 2010). Além disso, determinadas linhagens de células tumorais podem apresentar uma resistência, intrínseca ou adquirida, contra esta droga (HANIF et al., 2018). A cisplatina é um pró-fármaco, o que significa que quando a droga é administrada no paciente, o complexo sofre reações de aquação dentro das células, trocando os ligantes cloro por água, formando a espécie ativa $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (MAKOVEC, 2019). Esta espécie metabolizada sofre um ataque das bases guaninas (dGTP) do DNA, que atuam como bases de Lewis, deslocando os ligantes aquo e formando o aduto complexo-DNA $[\text{Pt(NH}_3)_2(\text{dGTP})_2]^{2+}$, impossibilitando o trabalho da maquinaria de replicação celular (DASARI et al., 2014; PAGES et al., 2017; WANG et al., 2005). Na busca de melhorar o índice terapêutico da droga, novas moléculas análogas à cisplatina foram sintetizadas, variando-se os ligantes, o estado de oxidação do metal e a geometria

⁴Aqui faz-se uma pequena distinção entre *droga* e *fármaco*: o primeiro refere-se a qualquer substância, natural ou sintética, que cause uma perturbação no funcionamento metabólico normal em um organismo, seja maléfica ou benéfica. O segundo entende-se como a substância que tem o princípio de manter ou reestabelecer a homeostase, sendo estritamente usada para fins terapêuticos, cujos efeitos benéficos se sobressaem sob os efeitos adversos. Apesar disso, estes termos são frequentemente intercambiáveis na literatura de química inorgânica medicinal.

molecular, das quais se destacam a oxaliplatina e a carboplatina, que completaram todas as fases clínicas (HANIF et al., 2018; LAZAREVIĆ et al., 2017).

Figura 8. Fármacos à base de platina atualmente em uso no mercado. **A)** cis-platina; **B)** carboplatina; **C)** oxaliplatina.

Fonte própria.

Num contexto de Química Medicinal, Hanif e Hartinger discorrem se há mesmo a necessidade de insistir unicamente em fármacos com platina, em detrimento de outros metais. Primeiro, diferentes metais possuem diferentes estruturas eletrônicas e, portanto, diferentes reatividades. Os derivados da cisplatina (figura 8) são desenhados pensando em modular a farmacocinética da droga, diminuindo sua taxa cinética de aquação; entretanto, o mecanismo de ação continua sendo a inibição irreversível da molécula de DNA (BERGAMO et al., 2015; BRABEC et al., 2017). Isso implica, quase que mandatoriamente, que seus complexos sofrerão hidrólise, e a partir daí servirão ou como carreador de um ligante-fármaco, ou que o complexo aquo, metabólito, se ligará covalentemente a uma biomolécula, em especial o DNA. Em contrapartida, o mecanismo de ação dos dois fármacos de rutênio (explorados mais ao final desta seção) não é totalmente conhecido, mas sabe-se que a molécula-alvo nem sempre é o DNA e sim alvos extracelulares (COVERDALE et al., 2019). Segundo, os complexos não precisam ser meros carreadores de ligantes-fármacos, e uma ligação covalente metal-biomolécula não necessariamente é a melhor opção, visto que isso pode inativar a droga antes mesmo dela atingir seu(s) alvo(s), além de favorecer processos irreversíveis (HANIF et al., 2018; LAZAREVIĆ et al., 2017). É claro que a perspectiva de novos agentes (para câncer ou outras moléstias) pode se

basear em moléculas com a mesma farmacodinâmica da cisplatina, mas considerar interações não-covalentes é uma alternativa a ser pensada - e neste ramo ganha muito destaque os complexos de Ru combinados a ligantes aromáticos.

Tendo em vista o sucesso atingido pelas drogas de platina nas fases clínicas, ainda que estejam repletas de efeitos indesejáveis, viu-se não só uma necessidade de descoberta de novos fármacos (anticâncer ou para outros usos), mas também um respaldo para se trabalhar com metais de transição nesta área. De maneira geral, a premissa dos metalofármacos é utilizar-se de um efeito sinérgico das propriedades dos metais e dos fragmentos orgânicos farmacofóricos, aumentando a eficácia e seletividade da droga e/ou diminuindo sua toxicidade sistêmica e resistência celular (BRABEC et al., 2017; COVERDALE et al., 2019; HANIF et al., 2018; KOMEDA et al., 2012; NIKOLAOU et al., 2018). Outras doenças além do câncer são também contempladas pelo estudo de metalofármacos como agentes terapêuticos. Complexos de ouro são promissores para tratamento *in vivo* da doença de Chagas (LOPES et al., 2019); vanádio e cromo são estudados para tratamento de diabetes, pois se mostraram hipoglicemiantes (REHDER, 2013); já para complexos carreadores de ligantes de interesse, o nitroprussiato sódico é um exemplo de complexo de ferro liberador de NO, um potente vasodilatador usado em nível hospitalar em casos graves de hipertensão arterial (MJOS et al., 2014).

Como a molécula-alvo da cisplatina é o DNA, vem crescendo também o número de estudos acerca de complexos desenhados para interagir com o mesmo. Além da formação de ligações covalentes, é possível desenhar moléculas que tenham interações fracas com o DNA, como forças dispersivas de van der Waals, interações íon-dipolo com o esqueleto negativamente carregado dos grupos fosfatos ou empilhamento π com as bases nitrogenadas (CARDIN et al., 2017; ERKKILA et al., 1999; KOMOR et al., 2013; LIU et al., 2011). Com estas últimas, ocorre a interação com o DNA que se entende por *intercalação*: a molécula intercaladora ocupa espaços entre as bases nitrogenadas, causando uma perturbação no arranjo espacial da dupla-hélice (BRABEC et al., 2018; HUANG et al., 2016; LIU et al., 2011; TURRO, 2011). Assim, os processos que envolvem uso da molécula de DNA são prejudicados e isso pode levar à morte celular.

Dentre as melhores moléculas candidatas para intercalação de DNA, estão aquelas cuja estrutura seja rígida, planar e π -conjugada – características dos ligantes N-heterocíclicos poliaromáticos, como as quinolinas, fenantrolinas e fenazinas. Esse

tipo de interação é tão significativo que este é mesmo o mecanismo de ação de alguns fármacos orgânicos, já em uso clínico, que interagem com DNA: a doxorubicina e a daunomicina são dois exemplos de fármacos anticâncer que atendem as descrições feitas para a estrutura de intercaladores na molécula de DNA, impedindo a replicação celular (JAWAD et al., 2019). A literatura de complexos de rutênio (e eventualmente outros metais da segunda série de transição, como Rh e Pd) combinados a derivados fenazínicos é bastante extensa e já são há muito reportados na literatura, sendo que estas moléculas são estudadas como bons intercaladores de DNA. Complexos mono- ou polinucleares de rutênio, cujas geometrias mais comuns são octaedro e tetraedro (este último geralmente para metalocenos) podem servir como receptor de estímulo luminoso e atuar na fotoclivagem de DNA (AROUNAGUIRI S., 1997; BRABEC et al., 2018; FRIEDMAN et al., 1990; MI et al., 2019; SUN et al., 2008), além de serem sondas luminescentes em estudos de interação com DNA na forma de dupla-hélice (ERIK HOLMLIN et al., 1995; LIM et al., 2009; LUTTERMAN et al., 2008; MCKINLEY et al., 2011; TURRO et al., 1995) ou mesmo intercaladores clássicos, independentes de excitação por um fóton (FU et al., 2003; LIANG et al., 2017; LIU et al., 2011; TURRO, 2011). Do ponto de vista químico, estas classes de moléculas são muito utilizadas em sínteses de complexos, já que os nitrogênios são ótimos para promover ataque básico a um metal (ácido de Lewis), além de alguns funcionarem como ligantes quelantes, cuja cinética de formação e estabilidade termodinâmica são favorecidos em detrimento de ligantes monodentados (TOMA, 2015b). Em trabalhos de atividade biológica, é comum que o ligante livre apresente pouca ou nenhuma atividade biológica, assim como os complexos precursores. Entretanto, quando se coordena os ligantes a um centro metálico, obtendo-se o complexo de interesse, a atividade biológica pode ser aumentada consideravelmente (CORREA et al., 2015; DEMORO et al., 2013; LAI-FUNG CHAN et al., 2011; POSSATO et al., 2017a, 2020).

Figura 9. Estruturas de alguns ligantes N-heteroaromáticos comumente utilizados em síntese de complexos intercaladores de DNA.

Fonte própria.

Num cenário de drogas que substituíssem a cisplatina, o rutênio merece destaque por dois complexos, dentre alguns outros, que atingiram fases clínicas para tratamento de câncer: o NAMI-A ([ImH]trans-[RuCl₄(DMSO-S)(Im)], onde ImH = imidazólio, Im = imidazol), que atingiu fase II, e o KP1019, seu análogo com indazol/indazólio, que atingiu fase I; ambos, entretanto, foram descontinuados por apresentarem toxicidade renal crônica (ALESSIO, 2017). Desde sua descoberta até o começo de fases clínicas (no final dos anos 90) se passaram 30 anos, tempo o suficiente para motivar diversos trabalhos acerca destes compostos. Diferentemente da cisplatina, estas duas drogas agem não como agentes citotóxicos para tumores sólidos, e sim como antiproliferativos de células tumorais, atuando na fase de metástase e inibindo a neoplasia (BERGAMO et al., 2015). Além disso, os complexos possuem internalização celular quase negligenciável, sugerindo interação com proteínas de membrana ou do meio extracelular (AITKEN et al., 2012; GROESSL et al., 2011). Isto não deve de forma alguma ser encarado como desmotivador, e sim visto como uma quebra no pensamento de que um candidato a metalofármaco precisa, obrigatoriamente, ser muito citotóxico (NIKOLAOU et al., 2018).

Figura 10. Estruturas dos dois metalofármacos de rutênio a atingirem fase clínica. **A)** NAMI-A; **B)** KP1019.

Fonte própria.

A investigação sistemática das propriedades biológicas dos acetatos trinucleares de rutênio ainda é recente, mas traz resultados bastante promissores. Na avaliação da atividade anticâncer *in vitro*, contra melanoma murino, uma série de complexos simétricos combinados a ligantes azanaftalenos mostrou-se eficaz, tendo valores de CC₅₀ na ordem de 20 μ M (POSSATO et al., 2020). Também existem contribuições destas moléculas na pesquisa sobre as chamadas *photoCORMs* (*CO-Releasing Molecules*, ou moléculas liberadoras de CO). O monóxido de carbono e o de nitrogênio (NO) são ligantes de relevância farmacológica, pois podem servir de marcadores em vários processos fisiológicos e como vasodilatadores. A liberação controlada destes, usando clusters trinucleares de rutênio, pode ser modulada por processos redox, irradiação de luz e/ou variação em ligantes piridínicos (CACITA et al., 2015; DA SILVA et al., 2018; MOREIRA et al., 2016). Ainda sobre os ligantes azanaftalenos, esta série de complexos foi também desenhada e estudada quanto às suas atividades antiparasitárias em células infectadas com *Trypanosoma cruzi* (POSSATO et al., 2017a), com alto índice de seletividade. Já para complexos ortometalados, estes se mostraram muito ativos frente à linhagem celular cancerosa (DA SILVA, 2019b) - o que acabou impulsionando o estudo dos complexos ortometalados como candidatos a fármacos para a doença de Chagas, que será apresentada na seção a seguir.

Figura 11. **A)** Complexo com ligantes piridínicos substituídos (R) e ligante lábil CO ou NO. Quando L = CO, a carga n é zero; quando L = NO, a carga é +1. **B)** Complexo com três ligantes azanaftalenos substituídos, promissor candidato a metalofármaco anticâncer e antiparasitário.

Fonte própria.

1.5. O parasita *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A doença de Chagas (também chamada tripanossomíase americana) é uma enfermidade crônica que atinge os sistemas cardíaco e intestinal, causada pela infecção com o protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi*, cujos principais vetores biológicos são insetos do gênero *Triatoma*, especialmente o *T. infestans* (popularmente conhecido como “barbeiro”) (MARTINS-MELO et al., 2012). A doença recebe este nome em honra de seu descobridor, o médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas, que a descobriu em 1909; o parasita tem seu nome derivado do cientista que o observou em insetos pela primeira vez, Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2019). Esta doença afeta não apenas humanos, como outros mamíferos domésticos (cães e gatos) e silvestres (tatus, macacos e gambás) (KIRCHHOFF, 2011; TENÓRIO et al., 2014). Os modos de transmissão incluem também a ingestão de alimentos contaminados, transfusão de sangue e transmissão vertical da mãe para o feto (US National Library of Medicine, 2020). Os dados de epidemiologia retirados da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), agência vinculada à Organização Mundial da Saúde (OMS), estimam que oito milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* no mundo, a maioria concentrada em território latino-americano; cerca de dez mil pessoas morrem todos os anos devido à doença em si ou complicações decorrentes desta (WHO, 2019), sendo que o Brasil representa aproximadamente 43% deste número. Como desafio de saúde pública, a doença de Chagas pode agravar problemas de saúde secundários, trazendo invalidez e um inconveniente

estigma social ao portador do parasita (Secretaria da Vigilância em Saúde, 2019). São também relatados números crescentes de casos na Europa e Estados Unidos, devido a movimentos migratórios (KIRCHHOFF, 2011).

A doença possui duas fases: a aguda se dá logo depois da infecção com o parasita, e é caracterizada por sintomas como coceira e dor no local da picada, febre, dor de cabeça e inflamação dos nódulos linfáticos, além da característica inflamação nas pálpebras, chamado sinal de Romaña (TEIXEIRA et al., 2011). De dois a três meses após a infecção, ocorre a fase crônica. Nesta, de 60 a 70% dos infectados tornam-se totalmente assintomáticos; o restante pode desenvolver sintomas muito tardiamente, até 30 anos depois. Neste estágio, porém, as complicações são graves e incluem cardiomegalia, falência cardíaca e aumento do esôfago, cólon e fígado, que são fatais (RASSI et al., 2012).

O principal fator de risco para a doença de Chagas é, primordialmente, o fator socioeconômico. Esta enfermidade faz parte do grupo chamado Doenças Tropicais Negligenciadas, um conjunto de doenças que afeta regiões pobres dos trópicos da América, África e Ásia, totalizando 74% dos países do mundo, e são assim chamadas por receberem pouca atenção governamental e pouco investimento das indústrias farmacêuticas quanto ao seu tratamento e prevenção (MOLYNEUX et al., 2017). Recentemente, um artigo publicado pelo veículo *The Lancet* trouxe dados sobre o desenvolvimento de novos fármacos para Doenças Negligenciadas (DNs). Uma das metas da OMS é acabar com a epidemia de DNs no mundo até 2030, seja por meio de vacinas ou tratamento medicamentoso. Apesar dos avanços nos estudos nesta área, ainda são baixos os números relativos ao desenvolvimento de tratamentos. No final do século XX, pouco mais de 1% das drogas aprovadas foi destinado ao tratamento das DNs. Este número sobe levemente para 4,3%, no começo do milênio, mas regride para 3,1% entre 2012-2018, quando apenas oito dos 256 novos fármacos inseridos do mercado visavam terapia para as DNs. Muitos destes fármacos são reposicionados, ou seja, utilizados primeiramente para outras doenças (como câncer) e agora testados nas NDs, ou então preparados em novas formulações farmacêuticas – o que significa que ainda se requer muito trabalho na descoberta de novas moléculas candidatas a combater estas enfermidades (FERREIRA et al., 2019).

O Boletim Epidemiológico da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de janeiro de 2019, traz algumas estatísticas da prevalência da doença em território brasileiro: estima-se que até 100 milhões de pessoas no mundo estão em situação de

risco de contrair a doença, principalmente por questões de moradia inadequada. Não se sabe com precisão quantas pessoas possuem Chagas no Brasil, mas dados de 2012 mostram que, até esta data, de 2 a 3 milhões de brasileiros possuíam a forma crônica da doença, sendo que destes, 1 milhão sofrem da forma cardíaca e / ou digestiva, os estágios altamente incapacitantes e mortais. Somente poucos casos são de fato reportados na fase aguda, e isso contribui para a dificuldade de um mapeamento efetivo e o insucesso no tratamento no país (SAÚDE, 2019). De forma geral, as áreas mais afetadas são aquelas de origem rural ou periurbana, sobretudo em casebres de palha e pau-a-pique, que são ótimos locais de reprodução do inseto vetor da doença (NEVES, 2004). Neste contexto, as regiões de maior risco e onde há mais casos registrados são aquelas que compreendem a Amazônia Legal e a Mata Atlântica. No Brasil, os estados de maior prevalência são os da região Norte (maior no Pará) e Nordeste (maior no Maranhão), mas também ocorre número significativo de novas infecções no MT, MS e Goiás (COURA et al., 2009).

Parte importante no design de novas drogas antiparasitárias é conhecer a biologia do parasita em questão, porque diferentes formas podem ter diferentes respostas a uma droga ou tratamento. Um esquema simplificado da taxonomia do agente etiológico da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) é descrito na tabela a seguir (NEVES, 2004).

Tabela 1. Características taxonômicas do parasita *Trypanosoma cruzi*.

Classificação taxonômica	Descrição
Reino: Protista	Protozoários, seres unicelulares e eucariotos
Sub-filo: Mastigophora	Movimentação por meio de flagelos
Classe: Kinetoplastea	Presença de cinetoplasto, organela presente no flagelo, rica em DNA mitocondrial
Família: Trypanosomatidae	Parasitas obrigatórios, heterotróficos, tendo um único flagelo. Dois gêneros de interesse clínico: <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i>
Gênero: <i>Trypanosoma</i>	Nome derivado do grego <i>trypano-</i> (broca) e <i>-soma</i> (corpo)
Espécie: <i>Trypanosoma cruzi</i>	Parasita heteróximo (possui dois hospedeiros): intermediário (inseto barbeiro) e definitivo (mamíferos)

Fonte: NEVES, 2004.

O parasita *T. cruzi* é capaz de apresentar alternância em suas formas celulares, como uma forma de adaptação ao ambiente onde se encontra, de acordo com seu ciclo biológico. Um esquema deste ciclo está representado a seguir.

Figura 12. Ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi*.

Fonte própria. Figura gerada com auxílio do site SMART - disponível em <smart.servier.com>.

Em **(A)**, ocorre a penetração do parasita na célula hospedeira. A forma mais infectante é a tripomastigota, que apresenta um flagelo longo e membrana ondulante e fluida, e por isso, maior mobilidade. É a forma mais abundante no meio extracelular do hospedeiro. As primeiras células infectadas nos mamíferos são macrófagos, que fagocitam o parasita na tentativa de neutralizá-lo, ou mesmo fibroblastos (TEIXEIRA et al., 2011). Uma vez dentro da célula, o parasita sofre diferenciação para a forma celular amastigota, **(B)**. Essa forma é circular, e o flagelo não exterioriza, por isso apresenta baixa mobilidade; entretanto, é a forma onde se dá mais rapidamente o processo de multiplicação por fissão binária, aumentando a população de parasitas, como em **(C)**, sendo a forma predominante dentro da célula infectada. Uma vez que a célula hospedeira encontra-se contaminada, há nova diferenciação de volta para a forma tripomastigota **(D)**, seguida por lise da célula hospedeira **(E)** (NEVES, 2004). Os novos parasitas formados podem infectar outras células do mesmo tecido ou de outros, especialmente na fase aguda da doença onde a parasitemia (nível de parasitas do sangue) é bastante alta; o ciclo é, então, completo. Nesta fase, também, o índice de mortalidade é maior, sobretudo em crianças (KIRCHHOFF, 2011). Caso o hospedeiro sobreviva, as manifestações clínicas são observáveis somente anos após a infecção, na fase crônica. Em **(F)**, o *T. cruzi* pode infectar o inseto barbeiro, que se alimenta de sangue de hospedeiros doentes; quando isso ocorre, o parasita pode se alojar no intestino do inseto e se diferenciar em outras formas, como epimastigota e novamente em tripomastigota, servindo o inseto triatomíneo como vetor da doença **(G)** (NEVES, 2004).

Até o momento, existem apenas duas drogas efetivas no tratamento da doença de Chagas: o nifurtimox (Nf, um nitrofurano) e o benznidazol (Bz, um nitroimidazol). A primeira ganhou uso clínico em 1965, mas devido a efeitos colaterais muito severos, tem sido rapidamente substituída pelo benznidazol (BERN et al., 2007). O Bz foi colocado para comércio em 1971, e é administrado na fase aguda da doença: de 50 a 60% dos pacientes apresentam redução significativa da parasitemia nesta etapa. Entretanto, a eficiência cai para menos de 20% de chances de cura quando se atinge a fase crônica, mesmo que o tratamento persista (BERN et al., 2007; FERREIRA et al., 2017). O mecanismo de ação destes fármacos é baseado na geração de radicais nitrogenados, espécies altamente reativas que podem se ligar covalentemente a biomoléculas, em especial o DNA do parasita (MITAL, 2009; PÉREZ-MOLINA et al., 2009). Apesar da substituição do Nf pelo Bz, os efeitos adversos ainda são uma

desavença: como o tratamento é longo (durando meses ou até uma década), é comum observar hepatite medicamentosa, polineuropatia, anemia, dermatite e problemas no funcionamento da medula óssea (CUNHA et al., 2019). Ainda assim, os dois constam na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS (WHO, 2019).

Figura 13. Estruturas dos dois fármacos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas. **A)** Nifurtimox (racemato e mistura E-Z); **B)** Benznidazol.

Fonte própria.

Não resta dúvidas, então, de que novas drogas precisam ser pensadas e selecionadas. Alguns estudos sobre metalofármacos para doença de Chagas vêm sendo feitos: como já exemplificado acima, nosso grupo já reportou a atividade tripanocida de uma série de complexos simétricos com ligantes azanaftalenos (POSSATO et al., 2017a). Agora, motivado pelo bom desempenho dos complexos ortometalados contra linhagem de melanoma murino (DA SILVA, 2019b), e também pelo histórico de atividades de complexos com ligantes fenazínicos contra *T. cruzi* (BENÍTEZ et al., 2009a, 2009c), pretende-se investigar o potencial antiparasitário destes e a interação com DNA, além de fazer a contrapartida com as propriedades dos ligantes fenazínicos livres, traçando assim uma possível relação estrutura-atividade para a descoberta de novos candidatos a metalofármacos antichagásicos.

2. Objetivos

- Descrever a síntese e caracterização de um complexo trinuclear de rutênio, inédito, de fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$ (4-pic = 4-picolina) e de seu ligante, dppz (dipiridofenazina). Caracterizar o novo complexo por técnicas de espectroscopia eletrônica de absorção no UV-Vis, vibracional de absorção no infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H ;
- Explorar algumas propriedades eletrônicas do ligante dppz em solução, como fluorescência, solvatocromismo e empilhamento π ;
- Utilizar uma série de complexos ortometalados previamente sintetizados e caracterizados, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(\text{py})_2(\text{L})]\text{PF}_6$, onde **L** = dppn (**1**), dppz (**2**), dppz-CH₃ (**3**), dppz-Cl (**4**) e phen (**5**), a fim de investigar a interação dos mesmos com a molécula de DNA, usando a técnica de deslocamento de sonda fluorescente (brometo de etídio);
- Explorar a reatividade do complexo de dppz (**2**) em solução de solvente coordenante, e também a propriedade de empilhamento π ; explorar a reatividade dos complexos **1-5** frente a oxigênio molecular;
- Explorar a atividade antiparasitária, em cepas de *Trypanosoma cruzi*, dos complexos de **2** a **5**, bem como de seus ligantes livres, nas formas celulares amastigota e epimastigota, fazendo também um contraponto com a citotoxicidade em células hospedeiras saudáveis (LLC-MK2).

3. Parte experimental

3.1. Procedência dos solventes e reagentes

Solventes	
Nome	Procedência
Acetato de Etila	Honeywell Riedel-de-Häen
Acetona	Synth
Acetilacetona	Synth
Acetonitrila	Êxodo
Acetonitrila deuterada	Sigma-Aldrich
Benzeno	Honeywell Riedel-de-Häen
1-Butanol	Êxodo
<i>terc</i> -Butanol	Êxodo
Clorofórmio deuterado	Sigma-Aldrich
Dicloroetano	Sigma-Aldrich
Diclorometano	Sigma-Aldrich
Diclorometano deuterado	Sigma-Aldrich
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
Etanol	Êxodo
Etilenoglicol	Synth
Isobutanol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Metanol	Êxodo
1-Pentanol	Synth
1-Propanol	Sigma-Aldrich
Tetraidrofurano	Synth
Tolueno	Honeywell Riedel-de-Häen
Tricloroetileno	Honeywell Riedel-de-Häen
Reagentes e materiais	
1,10-fenantrolina-5,6-diona	Sigma-Aldrich
1,2-diaminobenzeno	Sigma-Aldrich
4-metilpiridina (4-picolina, 4-pic)	Sigma-Aldrich

Acetato de sódio	Êxodo
Ácido acético	Êxodo
Ácido clorídrico	Synth
Ácido fórmico	Êxodo
Ácido nítrico	Êxodo
Ácido sulfúrico	Êxodo
Alumina neutra	Sigma-Aldrich
Brometo de etídio	Nalgene
Brometo de potássio espectroscópico	Sigma-Aldrich
Cloreto de mercúrio (II)	Sigma-Aldrich
Cloreto de rutênio (III) triidratado	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio	Synth
Hexafluorofosfato de amônio	Sigma-Aldrich
Hidrazina monohidrato (sol. aquosa 65%)	Sigma-Aldrich
Tampão Tris	Sigma-Aldrich
Zinco	Sigma-Aldrich

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Síntese do ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz): $C_{18}H_{10}N_4$

A síntese e purificação do ligante dppz foi realizada conforme reportado na literatura, com adaptações (GREGURIC et al., 2002).

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se 267,1 mg (2,47 mmol) do reagente 1,2-diaminobenzeno e 501,3 mg (2,38 mmol) do reagente 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Solubilizou-se tudo em 60 mL de etanol a quente. Fez-se refluxo a 78 °C por 4h. A solução passou de marrom para amarelo. O balão foi colocado em geladeira por 24h. Formou-se uma suspensão, que foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com placa vidro sinterizado de porosidade 4 (10 a 16 μm), da qual obteve-se um sólido amarelo, que foi lavando com alíquotas de água deionizada e uma mistura gelada de etanol:metanol 50:50. Usou-se 5 mL de éter etílico para auxiliar na secagem do sólido. Este foi guardado em dessecador e seco até massa constante. Obteve-se 536,9 mg de produto (1,90 mmol) e o rendimento (η) foi de 79,8% ($MM = 282,299 \text{ g mol}^{-1}$) - rendimento da literatura: 80% (GREGURIC et al., 2002).

3.2.2. Síntese dos complexos trinucleares precursores

As sínteses dos complexos precursores a seguir descritas foram baseadas na literatura, já há tempos consolidada, sobre clusters de rutênio (BAUMANN et al., 1978; SPENCER et al., 1972), com adaptações (TOMA et al., 2001).

3.2.2.1. Precursor (1), “cluster-mãe”: $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$

Em um balão de fundo redondo de 500 mL, juntou-se 5 g (19,16 mmol) de cloreto de rutênio triidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e 10 g (73,5 mmol) de acetato de sódio triidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), solubilizando-se tudo em 125 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) e 125 mL de etanol. Aqueceu-se em refluxo a 80 °C por 4h. A solução inicialmente apresentava cor vermelho intensa, e ao final da reação passou a verde escuro. Deixou-se o balão em geladeira por 12h, para que o excesso de acetato de sódio decantasse, separando-se então este da solução por filtração à vácuo em funil de Büchner. O filtrado foi recuperado, tendo os solventes retirados sob baixa pressão. Nesta etapa, forma-se um óleo, pois ainda há muito ácido acético e o sólido não seca totalmente. Por isso, adicionou-se 50 mL de metanol ao balão, evaporando-se em baixa pressão em seguida. Este último procedimento foi realizado três vezes, a fim de se retirar o excesso de etanol, água e ácido acético. O sólido obtido foi guardado em dessecador sob vácuo. Como não houve purificação do precursor nesta etapa, não se calculou o rendimento ($\text{MM} = 828,64 \text{ g mol}^{-1}$).

3.2.2.2. Precursor (2): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_2\text{CO}]^0$

Em um balão de três bocas, adicionou-se 1,0 g (1,21 mmol) do precursor (1), dissolvendo-se em 30 mL de metanol. Adicionou-se também cinco discos de amálgama de Zn/Hg recém-preparadas⁵. Acoplou-se ao balão reacional um sistema gerador de $\text{CO}_{(g)}$, que consiste em um funil de decantação contendo HCOOH anidro anexado a um balão contendo H_2SO_4 concentrado. O sistema foi desareado com fluxo contínuo de argônio por 40 minutos. Com o sistema vedado, contendo uma agulha

⁵ A amálgama de zinco e mercúrio é obtida da seguinte maneira: num béquer contendo de cinco a sete pastilhas de Zn metálico, adiciona-se algumas gotas de HNO_3 concentrado, a fim de remover uma camada de óxido de zinco (ZnO) da superfície das pastilhas. Lava-se continuamente com água deionizada, para evitar que o excesso de ácido continue oxidando o zinco metálico (que forma $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, em solução). Quando as pastilhas atingem um brilho metálico característico, adiciona-se uma ponta de espátula de Hg_2Cl_2 , deixando-se reagir com as pastilhas em água. O aspecto passa de brilhante para opaco. Lava-se a amálgama com água deionizada, para tirar excesso de mercúrio e ácido, secando-a com um papel, sendo então adicionada ao sistema.

para alívio de pressão, permitiu-se então misturar gota a gota os dois ácidos de forma que houvesse uma formação contínua de CO dirigido ao meio reacional, que permaneceu sob agitação em temperatura ambiente durante a reação. O borbulhamento de CO foi mantido durante 6h. Nesta etapa, a solução passou de verde para violeta. Ao término da reação, o solvente foi retirado sob pressão, e o sólido guardado em dessecador à vácuo e seco até massa constante. Durante todos os procedimentos, tomou-se o cuidado de impedir o contato das soluções e sólidos de complexo-produto com a luz, além do cuidado de não se misturar abruptamente grandes quantidades dos ácidos no gerador de CO, uma vez que vapores de ácido fórmico poderiam atingir o meio reacional, destruindo o cluster-mãe que é instável em meio ácido. Obteve-se 876,4 mg (1,02 mmol) de produto, e o rendimento foi de 84,2%.

Alternativamente, uma segunda síntese deste complexo foi realizada, desta vez usando hidrazina monohidrato ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) como redutor. Num sistema igual à síntese acima descrita, dissolveu-se 620,6 mg (0,749 mmol) do precursor **(1)** em 50 mL de metanol. Adicionou-se, gota a gota e com o balão em baixa temperatura, um excesso de 600 μL de hidrazina monohidrato a 65% m/m (12,4 mmol), e depois deixou-se o sistema sob fluxo de argônio e agitação por 30 min. A solução inicialmente verde passou à cor marrom. Em seguida, começou-se o borbulhamento de CO, em temperatura ambiente, por 2h, tornando a solução violeta. O solvente foi rotaevaporado e o sólido seco em vácuo até massa constante. Obteve-se 580,3 mg (0,675 mmol) de composto, e o rendimento foi de 90,1% ($\text{MM} = 859,68 \text{ g mol}^{-1}$). Esta alternativa mostrou-se viável e supera o procedimento com amálgama, em termos de tempo de reação e controle da quantidade e do tipo de resíduos gerados. Nesta etapa também não houve purificação do produto, já que os procedimentos são feitos com reagentes em excesso que são facilmente retirados do meio reacional (a amálgama é sólida e pode ser retirada com auxílio de uma espátula de plástico, a hidrazina é retirada na rotaevaporação e o CO é um gás e portanto não é isolado como reagente em excesso na secagem do sólido).

3.2.2.3. Precursor (3): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{CO}]^0$

Em um balão de 100 mL, adicionou-se o precursor **(2)** e o ligante 4-metilpiridina (4-pic), em 50 mL de metanol. Utilizou-se um fluxo de argônio por 40 minutos. Em atmosfera inerte, deixou-se reagir por 6h, sob agitação em temperatura ambiente e

protegido da luz, pois este precursor ainda contém o ligante CO, tornando o sistema fotossensível. Acompanhou-se a reação por meio de espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis-NIR. A cor da solução passou de violeta para um azul intenso. Em seguida o solvente foi retirado à vácuo, e o sólido azul obtido foi purificado através de filtração em funil de placa porosa 4 e lavagem com alíquotas de água gelada, sendo seco depois com éter etílico, e depois sob vácuo em dessecador até massa constante, tendo seu espectro eletrônico de absorção registrado. Como esta síntese foi realizada mais de uma vez, as quantidades de reagentes utilizadas e rendimento de cada uma delas estão especificadas na tabela a seguir e os rendimentos são após purificação.

Tabela 2. Valores de massas e número de mols dos reagentes e produtos e rendimentos de cada síntese do precursor **3**.

Síntese	Precursor (2) mg (mmol)	4-picolina mg (mmol)	Produto mg (mmol)	Rendimento (η , %)
1	508,3 (0,653)	182,5 (1,96)	143,1 (0,158)	24
2	971,5 (1,27)	306,2 (3,27)	504,1 (0,568)	45
3	582,6 (0,761)	355,0 (3,81)	387,1 (0,436)	57

Fonte própria.

O maior valor de rendimento na síntese 3 foi atribuído a dois fatores: a purificação do precursor (**2**) utilizado e a proporção estequiométrica de 1 mol de cluster para 5 mols de picolina. Quando impuro, o precursor (**2**) apresenta como impureza o precursor (**1**), que na presença de ligantes piridínicos forma o cluster oxidado simétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_3]^+$, de cor verde. Apesar das perdas que aconteceram durante o procedimento de lavagem com água gelada, o rendimento foi satisfatório e obteve-se massa suficiente de composto para progredir às etapas posteriores ($\text{MM} = 887,74 \text{ g mol}^{-1}$).

3.2.2.4. Precursor (**4**): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{MeOH})]\text{PF}_6$

Em um balão, juntou-se 300 mg do precursor (**3**) (0,338 mmol), dissolvendo-se em 60 mL de CH_2Cl_2 . Lentamente, adicionou-se 50 mL de uma solução recém-preparada de Br_2 líquido em diclorometano, de concentração $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, deixando em agitação por 30 min. A cor do meio reacional passou de azul intenso para ciano.

O solvente foi retirado à vácuo, e o sólido ressuspendido duas vezes em 25 mL de metanol e rotaevaporado em seguida, para retirar todo o resquício de bromo⁶. Depois, o sólido foi ressuspendido em 45 mL de metanol e mantido sob refluxo a 60 °C por 1h. Coletou-se espectros de absorção eletrônica no UV-Vis-NIR deste meio. Em seguida, adicionou-se à solução um excesso de 0,2768 g (1,70 mmol) de NH₄PF₆, e esta mistura foi mantida em geladeira *overnight*, para que o produto precipitasse. O precipitado foi filtrado em funil de vidro sinterizado porosidade 3, lavado com pequenas alíquotas de água gelada e seco com éter etílico, e depois em dessecador até massa constante. À água-mãe da filtração acrescentou-se uma ponta de espátula de NH₄PF₆, de onde precipitou mais uma quantidade de sólido que foi filtrada e lavada da mesma maneira. Como os dois sólidos obtidos eram iguais, juntou-se as duas frações, obtendo-se 0,2516 g (0,243 mmol) de produto puro, com rendimento de 71,9% (MM = 1036,76 g mol⁻¹).

3.2.3. Síntese do complexo inédito

As etapas sintéticas a seguir foram adaptações das sínteses descritas na literatura para complexos análogos, contendo cinco acetatos e ligantes ortometalados (CHEN et al., 2005; DAI et al., 2011).

3.2.3.1. Complexo [Ru₃O(CH₃COO)₅(4-pic)₂(dppz)]PF₆

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 225,1 mg (0,217 mmol) do precursor (**4**) e 96,0 mg (0,340 mmol) do ligante dppz, dissolvendo-se tudo em 35 mL de diclorometano. Deixou-se o sistema vedado, com uma agulha para alívio de pressão, em agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Observou-se que a cor da solução passou do ciano para um verde-oliva. O solvente foi retirado sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com alíquotas de água gelada para retirar uma possível quantia de contaminante de NH₄PF₆ da síntese anterior, seco, e finalmente purificado em coluna cromatográfica de alumina neutra (Al₂O₃), com fase móvel 70:30 DCM:ACN, coluna de 50 cm de comprimento por diâmetro de 3 cm. O eluído foi

⁶ Para neutralizar este, como medida de segurança, uma solução aquosa de bissulfito de sódio (NaHSO₃) foi preparada, dando a reação $\text{NaHSO}_3 + \text{Br}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + 2\text{HBr}$. Após correção com bicarbonato para pH ~7, a solução aquosa pode ser descartada em pia. Esta solução também foi usada no balão coletor do rotaevaporador.

rotaevaporado e seco até massa constante, obtendo-se 108,1 mg (0,088 mmol) de produto, e o rendimento foi de 40,6% ($MM = 1226,94 \text{ g mol}^{-1}$).

Os demais ligantes (dppzCH₃, dppzCl) foram sintetizados em trabalho anterior pela doutora Camila Fontes (e colaboradores, no caso do dppn) (DA SILVA et al., 2020), através da metodologia descrita na literatura (BUTSCH et al., 2010; FOXON et al., 2012), bem como os complexos **1-5** (DA SILVA et al., 2020; QIN et al., 2012). O ligante phen foi obtido comercialmente. Os procedimentos foram semelhantes.

3.3. Equipamentos utilizados para caracterizações

A não ser quando especificado diferente, todas as análises foram feitas no Departamento de Química da FFCLRP-USP.

3.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis-NIR

Os espectrofotômetros utilizados foram da marca Agilent, modelo 8453, cuja faixa de aquisição foi de 190 a 1100 nm com precisão de 0,5 nm; e marca Shimadzu, com faixa de aquisição de 200 a 1000 nm e intervalo de leitura de 1 nm. Utilizou-se cubetas de quartzo de caminho óptico variável (1,0 cm ou 0,1 cm), em função da necessidade de diluição da amostra.

3.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectrofotômetros utilizados foram da marca Bruker Advance, de 500 MHz para o complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(4-pic)₂dppz]PF₆; para o ligante dppz, na análise de ¹H e ¹³C monodimensionais usou-se o equipamento de 300 MHz, e para espectros bidimensionais, o de 500 MHz. Para o complexo utilizou-se acetonitrila deuterada, e para o ligante dppz, clorofórmio deuterado, ambos com TMS (tetrametilsilano) como referência.

3.3.3. Espectroscopia de absorção vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectrofotômetro utilizado foi o de marca Shimadzu, modelo IR Prestige 21, com resolução de 2 cm⁻¹. A região de aquisição foi de 400 a 4000 cm⁻¹. Preparou-se as amostras em pastilhas de KBr previamente seco, de grau espectroscópico.

3.3.4. Espectrometria de Massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS²)

Esta análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ). O equipamento usado foi o espectrômetro de massas de marca Bruker Daltonics, modelo q-ToF Maxis 3G, alta resolução, fonte ESI, modo de aquisição positivo, nebulizador 2,8 bar, fluxo de gás de 8 L min⁻¹, e voltagem de 4,5 kV.

3.4. Ensaios de atividade tripanocida

Os ensaios de atividade tripanocida foram realizados pelas Dra. Gisele Bulhões Portapilla e Dra. Bruna Possato, no Laboratório de Parasitologia, do Professor Dr. Sérgio de Albuquerque, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Para os ensaios, utilizou-se cepas Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*, transfectado com o gene *LacZ*, que codifica para a enzima β -galactosidase (BUCKNER et al., 1996). As formas epimastigotas foram continuamente mantidas em escala de crescimento logarítmico, semanalmente alimentadas com o meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) a 28 °C. Células aderentes de rim de macaco LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™) foram cultivadas no meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute – Sigma-Aldrich) a 37 °C com ar umidificado e 5% de CO₂, sendo usadas para manter o ciclo de tripomastigotas semanalmente. Os compostos (ligantes e complexos de **2** a **5**) foram dissolvidos em 100% DMSO, fornecendo uma solução estoque, a partir do qual usou-se alíquotas para que a porcentagem de DMSO no meio celular fosse mantido em 1% constante em todos os poços. Para controle positivo, utilizou-se a droga de referência benznidazol (BZ, Sigma-Aldrich). O complexo de número **1** (e seu ligante, dppn) precipitou durante os ensaios, e, portanto, foi removido dos testes de atividade biológica.

3.4.1. Ensaio de inibição de crescimento da forma epimastigota

Células de *T. cruzi* na forma epimastigota, em fase logarítmica, foram adicionados em número de 5×10^4 epimastigotas por poço, numa microplaca de 96 poços, seguidas de duplicatas de diferentes concentrações (10 – 0,078 μ M) dos complexos de **2** a **5** e de seus respectivos ligantes não coordenados; o mesmo para

o BZ, porém neste a faixa de concentrações variou de 100 a 0,78 μM . Decorridas 72h a 28 °C, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante foi gentilmente removido. A viabilidade dos parasitas foi investigada após a adição de 50 μL de PBS (solução tampão salina, *phosphate buffer saline*) contendo 2% de Triton X-100 e 200 μM de CPRG (*chlorophenol-red- β -galactopyranoside*). A enzima β -galactosidase catalisa a hidrólise do reagente CPRG, inicialmente amarelo, formando um cromóforo vermelho que é facilmente detectável através de medidas de absorbância em 570 nm depois de 4 h de incubação a 37 °C (leitor de microplacas – Synergy™ H1) (SALSI et al., 2018). A concentração inibitória onde há redução de metade da viabilidade do parasita (IC_{50}) foi calculada pela curva dose-resposta considerando o controle negativo (células que não receberam nenhuma droga).

3.4.2. Ensaio da inibição de crescimento da forma amastigota intracelular

Tripomastigotas de cepa Tulahuen foram cultivados em uma placa de 96 poços (em número de 5×10^3 células por poço) com células LLC-MK2 (5×10^4 células por poço), resultando em uma multiplicidade de infecção (MOI, *multiplicity of infection*, ou a razão entre o número de células hospedeiras e de células parasitas) de 10. Decorridas 48h, as células infectadas foram lavadas duas vezes com PBS a fim de remover os parasitas que não foram internalizados pelas células hospedeiras. Em seguida, um novo meio foi adicionado, contendo 200 μL de uma diluição seriada (de 10 a 0,078 μM) dos complexos **2-5** e de seus ligantes livres. A droga BZ foi usada na faixa de 100 a 0,78 μM . Depois de 72h, a viabilidade dos amastigotas foi avaliada pelo método CPRG, como previamente descrito para epimastigotas. Valores de IC_{50} , representando a dose que inibe 50% dos amastigotas, foram calculados pela curva de dose-resposta, considerando o controle negativo.

3.4.3. Citotoxicidade em células mamíferas

As células epiteliais, aderentes, de rim de macaco (*Macaca mulatta*) foram adicionadas em uma microplaca de 96 poços (5×10^3 células por poço) durante 48h a 37 °C com atmosfera de 5% CO_2 . Depois, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e 200 μL de um novo meio foi adicionado contendo os complexos **2-5** e seus ligantes livres, em duplicata, como descrito acima (10 – 0,078 μM), sendo incubadas por 72h. Depois, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, e adicionou-se em

cada poço 50 μL (2,0 mg mL^{-1}) do corante MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) para obter as concentrações citotóxicas, como já descrito (MUELAS-SERRANO et al., 2000). As placas foram então incubadas a 37 °C por 4h, e os cristais de formazan (produto de metabolização do MTT pelas mitocôndrias das células vivas remanescentes pós tratamento com as drogas) foram dissolvidos em 50 μL de DMSO, deixando-se incubado por 30 minutos a 37 °C. A absorbância do formazan foi lida em 492 nm, utilizando-se um leitor de microplaca Synergy H1. A Concentração Citotóxica de 50% das células mamíferas (CC_{50}) foi calculada pela curva de dose-resposta considerando o controle negativo.

3.4.4. Análise estatística

Todos os experimentos foram inicialmente feitos em quadruplicata, descartando-se aquele cujos valores médios de IC_{50} foram mais distantes da média. Assim, os dados de atividade *in vitro* foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, performados em três dias diferentes. A análise estatística foi feita usando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido dos testes de comparações múltiplos de Dunnett. Todas as análises foram feitas usando o software GraphPad Prism, V 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.5. Interação dos complexos com DNA pelo deslocamento de brometo de etídio

O ensaio de deslocamento de brometo de etídio (EB) foi realizado de acordo com a literatura (ICSEL et al., 2013a; POSSATO et al., 2020; SIRAJUDDIN et al., 2013). Inicialmente, preparou-se uma solução-estoque de *fsDNA* (DNA de esperma de peixe, *fish sperm deoxyribonucleic acid*, Sigma-Aldrich) 3,90 mM em tampão Tris 50 mM, 5 mM de NaCl, pH 7,40. O preparo desta solução é bastante simples: pesa-se o *fsDNA* (que vem liofilizado) de modo a obter aproximadamente 1 mg mL^{-1} no tampão desejado; calcula-se a concentração exata (em mol L^{-1}) através de um espectro eletrônico, lendo a absorbância em 260 nm e utilizando o valor adotado pela literatura de $\epsilon_{260\text{nm}} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Também a razão $\frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}}} > 1,8$ indica que o DNA está suficientemente livre de histonas e próprio para uso. A solução de *fsDNA* pode

ser usada por até 4 dias depois de seu preparo, desde que armazenada em geladeira e protegida da luz UV. Depois, em cubeta de fluorescência de caminho óptico 1 cm, preparou-se uma solução contendo 50 μM de *fsDNA* e 10 μM de EB (Nalgene)⁷, mantendo-se em temperatura ambiente por 1h. Em seguida, a mistura *fsDNA*-EB foi titulada com alíquotas das soluções-estoques dos complexos **1-5** diluídos em DMSO, mantendo a cubeta sempre em agitação e aguardando 1 minuto antes de registrar cada espectro. Tomou-se o cuidado para que a porcentagem de DMSO em cada análise nunca ultrapassasse 2% em volume. Considerou-se que a variação de volume, decorrente das adições de complexo, foi desprezível e não alterou as concentrações das espécies em solução. A análise foi realizada num espectrofluorofotômetro Shimadzu modelo RF5301-PC, com λ_{exc} 526 nm e λ_{em} 605 nm, resolução de 1 nm, larguras de fendas de excitação e de emissão de 5 nm, registrando o espectro entre 545 nm e 700 nm. A constante de interação aparente (K_{app}) foi calculada de acordo com a equação:

$$K_{\text{EB}}[\text{EB}] = K_{\text{app}}[\text{Q}]$$

Onde $K_{\text{EB}} = 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[\text{EB}] = 10 \mu\text{M}$ e $[\text{Q}]$ é a concentração de complexo ou ligante (*quencher*) que suprime 50% da fluorescência inicial, F_0 (mistura *fsDNA*-EB na ausência de complexo). Todos os ensaios com complexos foram feitos em duplicata. Para determinar o valor exato de $[\text{Q}]$, plotou-se a concentração do complexo *versus* área da curva normalizada (a intensidade em um ponto, F , dividido por F_0), obtendo-se uma curva logarítmica de equação $y = a \ln(x) + b$, $a < 0$, resolvendo-se para x quando $y = \frac{F_0}{2}$ (ponto onde há metade da intensidade inicial).

3.6. Reatividade dos complexos frente a borbulhamento de oxigênio molecular e estabilidade em solução

Soluções dos complexos **1-5** foram preparadas dissolvendo-se, qualitativamente, uma quantidade de cada sólido em volume mínimo de diclorometano, em vials de 5 mL, mantendo concentração suficiente para que pudesse

⁷O brometo de etídio é um poderoso agente mutagênico, e por isso sua manipulação foi feita utilizando os devidos EPIs. A solução-estoque de EB, assim como de *fsDNA*, deve ser protegida da luz ultravioleta. Para a descontaminação de soluções e materiais com resíduos de EB, utilizou-se uma solução recém preparada de NaNO_2 1M acidificada, que produz produtos menos tóxicos, solúveis em água e passíveis de serem armazenados em descarte adequado sem riscos. Deixou-se as soluções e descartáveis imersos nesta solução por 24h antes de serem descartados ou lavados (LUNN et al., 1987).

ser feito um acompanhamento espectral dentro da lei de Lambert-Beer. Registrou-se os espectros iniciais das soluções. O sistema de borbulhamento de gás consistiu em uma conexão entre o cilindro de O₂ e um frasco contendo diclorometano, com uma mangueira conectando para o vial, a fim de manter a saturação do sistema com vapor de solvente. Com os vials tampados com septos, fez-se um furo com uma agulha para entrada e outra agulha para saída de gás, para aliviar a pressão do sistema. Iniciou-se borbulhamento de O₂, e a cada 5 minutos de borbulhamento, um espectro eletrônico foi registrado. O tempo total de borbulhamento de O₂ em cada amostra foi de 15 minutos. Para estudar a estabilidade do complexo **2**, dissolveu-se uma pequena quantidade (o suficiente para gerar um sinal no espectro eletrônico) em acetonitrila (coordenante), deixando-se em solução por 28 dias num vial fechado. Registrou-se espectro no primeiro e no último dia.

3.7. Empilhamento π do ligante dppz e do complexo **2**

Uma solução estoque em acetonitrila foi preparada para o ligante dppz e para o complexo **2**, [Ru₃O(CH₃COO)₅(py)₂(dppz)]PF₆. Em cubeta de quartzo de 1,0 cm, contendo acetonitrila, adicionou-se alíquotas constantes dos compostos e registrou-se espectros eletrônicos de absorção, aumentando-se as concentrações até o limite superior de detecção que o equipamento registrava. As concentrações foram corrigidas em cada ponto pelas adições de volume.

3.8. Solvatocromismo do ligante dppz

Soluções do ligante dppz de igual concentração foram preparadas nos solventes acetato de etila, acetona, acetilacetona, acetonitrila, benzeno, 1-butanol, *tert*-butanol, dicloroetano, diclorometano, *N,N*-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, etilenoglicol, isobutanol, isopropanol, metanol, 1-pentanol, 1-propanol, tetraidrofurano, tolueno, tricloroetileno e mistura 1-propanol/água acidificado com HCl 1,0 M. Registrou-se espectros de absorção de cada um deles e correlacionou-se o máximo da banda de menor energia com parâmetros de polaridade de solvente ET₃₀ e SPP.

4. Resultados e discussão

4.1. Síntese e caracterização do ligante dppz e algumas propriedades espectroscópicas

A reação que dá origem ao ligante fenazínico é baseada numa adição nucleofílica de diaminas vicinais primárias aromáticas a uma α,β -dicetona conjugada, seguido de eliminação de água. Por isso, esta reação é conhecida como adição-eliminação nucleofílica. O produto é uma diimina aromática com maior conjugação π (BRUICE, 2016), neste caso também conhecido como base de Schiff porque possui estrutura $R_1,R_2C=NR_3$ onde $R \neq H$ (IUPAC, 2006).

De maneira geral, a reação pode ser representada da seguinte forma:

Figura 14. Esquema geral de reação de cetonas com aminas, para formação de iminas.

Fonte própria.

O produto é obtido através de algumas etapas de reação. Na figura 15, em resumo, ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio da amina ao carbono da carbonila (A). Forma-se um ânion etóxido (RO^-), que abstrai um hidrogênio do ácido catalisador, HB (B). A base conjugada, B^- , desprotona o grupo NH_2R^+ (C) gerando o intermediário tetraédrico, chamado de carbinolamina ou hemiaminal (D). A hidroxila ataca o hidrogênio do ácido HB, gerando uma molécula de água (E). Como a água é um excelente grupo de saída, o nitrogênio forma uma dupla ligação ($C=N$, imina) simultâneo à eliminação de água (F). Finalmente, a imina é desprotonada pela base conjugada B^- e o catalisador é regenerado (G) (BRUICE, 2016).

Figura 15. Mecanismo de reação proposto para a formação da imina.

Fonte própria.

Esta proposta de mecanismo requer o uso de ácido como catalisador da reação. Na literatura, esta reação é dita ser bastante sensível ao pH do meio, uma vez que a amina não pode estar protonada para exercer o ataque nucleofílico, e também o nitrogênio do intermediário **(D)** pode competir com o ácido para a reação reversa (BAYMAK et al., 2007; BRUICE, 2016). Além disso, alguns sistemas semelhantes requerem o uso de um condensador Dean-Stark ou mesmo agentes secantes para a retirada de água, deslocando o equilíbrio no sentido do produto (BRAZ et al., 2020). Um outro mecanismo propõe que a protonação inicial ocorra na carbonila em **(A)**, porque desta forma a densidade eletrônica sobre o carbono é muito mais baixa e o ataque nucleofílico é mais suscetível (CIACCIA et al., 2014). Na síntese do ligante dppz (e dos demais ligantes: dppzCl, dppzCH₃ e dppn) não foi necessário o uso de ácido, como reportam os trabalhos acerca deste ligante (BAYMAK et al., 2007; BUTSCH et al., 2010; KLEINWEISCHEDE et al., 2006). Ainda assim, o produto é formado, e sua precipitação ocorre *in situ* quando se resfria a solução. A purificação é simples e lavagens com água/metanol são suficientes para obter o produto puro em alto rendimento. Isto sugere que o mecanismo não coincide exatamente com os propostos pela literatura, muito embora trate-se da mesma reação. Possivelmente o próprio solvente prótico, etanol, atue como catalisador da reação no lugar do ácido (CIACCIA et al., 2014; LAYER, 1963). Como se trata de uma diamina e uma dicetona, dificilmente os ataques ocorreriam simultaneamente: depois da formação do primeiro

intermediário, a reação com o outro par amina/cetona seria facilitada pela geometria deste (1).

Figura 16. Esquema geral de formação do ligante dppz a partir da diamina e da dicetona.

Fonte própria.

De um ponto de vista termodinâmico, a formação do produto é entropicamente favorecida, já que há eliminação de duas moléculas de água, o que aumenta a entropia do sistema. Também é muito improvável que as reações inversas ocorram em quantidade apreciável, uma vez que isto envolveria a quebra de duas ligações C=N (catalisada em pH baixo) e diminuição da extensa conjugação π do produto (PAVIA, 2010), diferente do que ocorre em iminas alifáticas ou de cadeia aberta (CIACCIA et al., 2014). Considerando que i) o equilíbrio global seja continuamente deslocado em direção à formação de produto e ii) o produto formado seja pouco solúvel sob resfriamento da solução, estes fatores contribuem para um alto rendimento desta síntese.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostram os sinais do produto purificado.

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do ligante dppz em CD_2Cl_2 , 300 MHz, 298 K, 20 mM.

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante dppz em CD_2Cl_2 , 300 MHz, 298 K, 20 mM.

A análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais comprovaram a estrutura do composto. Os espectros bidimensionais (HMQC, HMBC e COSY) serão mostrados como anexos, mas seus valores estão compilados na tabela a seguir, mostrando a atribuição realizada por comparação com a literatura, que utiliza o mesmo solvente, CDCl_3 . (BUTSCH et al., 2010)

Tabela 3. Dados de RMN e atribuição para o ligante dppz.

Núcleo de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta\ ^1\text{H}$ (ppm)	Integral (H)	COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$)	Correlação (HMQC)	Correlação (HMBC)
1	148,6	----	----	----	----	----
2	152,7	9,21	2	$\text{H}_2\text{-H}_3$	$\text{H}_2\text{-C}_2$	$\text{H}_2\text{-C}_2$ $\text{H}_2\text{-C}_3$ $\text{H}_2\text{-C}_1$
3	124,3	7,73	2	$\text{H}_3\text{-H}_4$ $\text{H}_3\text{-H}_2$	$\text{H}_3\text{-C}_3$	$\text{H}_3\text{-C}_5$ $\text{H}_3\text{-C}_2$
4	133,9	9,60	2	$\text{H}_4\text{-H}_3$	$\text{H}_4\text{-C}_4$	$\text{H}_4\text{-C}_6$ $\text{H}_4\text{-C}_1$ $\text{H}_4\text{-C}_6$
5	127,7	----	----	----	----	----
6	141,3	----	----	----	----	----
7	142,7	----	----	----	----	----
8	129,7	8,30	2	$\text{H}_8\text{-H}_9$	$\text{H}_8\text{-C}_9$	$\text{H}_8\text{-C}_9$ $\text{H}_8\text{-C}_7$
9	130,8	7,87	2	$\text{H}_9\text{-H}_8$	$\text{H}_9\text{-C}_9$	$\text{H}_9\text{-C}_8$ $\text{H}_9\text{-C}_7$

Fonte própria.

Uma vez que a molécula é simétrica em relação a um eixo de rotação C_2 e um plano σ_v (grupo de ponto C_{2v}), os deslocamentos químicos dos átomos de um lado da molécula serão iguais aos deslocamentos dos átomos simetricamente opostos, já que estão em ambientes químicos idênticos. Os valores observados são pertinentes à natureza dos hidrogênios aromáticos, que são desblindados devido ao efeito da corrente de anel, que causa uma anisotropia diamagnética, tendo deslocamentos

entre 7,0 a 8,5. Valores maiores são justificados pelo efeito indutivo elétron-retirador dos átomos de nitrogênio (PAVIA, 2010). O espectro de ^{13}C também mostra o esperado para a molécula, com valores de deslocamento entre 110-170 ppm. C_1 , C_2 , C_6 e C_7 apresentam os maiores deslocamentos por estarem diretamente ligados a átomos de nitrogênios (PAVIA, 2010).

Em relação ao espectro de infravermelho, a maior parte das bandas bem definidas está situada em regiões de baixa energia, enquanto uma banda mais larga está presente em maiores valores de número de onda.

Figura 19. Espectro de FT-IR para o ligante dppz em pastilha de KBr, 40 acumulações.

Fonte própria.

Por se tratar de uma molécula simétrica, plana e com poucos grupos funcionais, a análise do espectro de IV torna-se relativamente simples. A região de alta energia ($3500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$) corresponde à sobreposição de vários estiramentos C-H de fraca intensidade, ou até a presença de moléculas de metanol ou água no retículo do sólido (mesmo em traços), já que essa região é também característica de modos vibracionais O-H. Na região de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, estão os estiramentos C=C. Os estiramentos C=N ocorrem entre $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$, e quando há ligações simples C-N, ocorrem em $1230\text{-}1000$, ambas de intensidade média – uma vez que existe deslocalização eletrônica e

as ligações têm característica intermediária entre simples e dupla, ocorrem bandas em valores intermediários a estes valores de referência. Observa-se que existem bandas em toda a região de *fingerprint* ($1400-500\text{ cm}^{-1}$), de estiramento de ligação C=N e C=C aromáticas características, de intensidade média-a-forte e finas (PAVIA, 2010).

O espectro eletrônico de absorção do dppz, qualitativo, é mostrado a seguir.

Figura 20. Espectro eletrônico qualitativo para o ligante dppz em CHCl_3 .

Fonte própria.

Pode-se dividir o espectro eletrônico de absorção do ligante dppz em duas regiões: aquela entre 210-280 nm mostra bandas intensas, finas e de alta absorvidade molar, características de transições eletrônicas de natureza $\pi^* \leftarrow \pi$. Na região entre 290-380 nm, são encontradas várias bandas menos intensas, sobrepostas, que a literatura atribui como de natureza $\pi^* \leftarrow \pi$ centradas na porção diaza da molécula, ao passo que as mais energéticas são centradas na porção fenantrolínica. Apesar da deslocalização eletrônica, estudos de modelagem mostram que as transições ocorrem separadamente dentro de cada uma das porções da molécula (DA SILVA et al., 2008; DA SILVA, 2008; KLEIN et al., 2007). As bandas na região de baixa energia não são bem definidas, podendo ter contribuições de transições $\pi^* \leftarrow n$ junto a $\pi^* \leftarrow \pi$ com componentes vibracionais. A tabela a seguir mostra os valores da absorvidade molar para o ligante dppz em clorofórmio a 25 °C.

Tabela 4. Bandas observadas, transições associadas e coeficientes de absorvidade molar calculados para o dppz em CHCl_3 .

$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	Transição	$\epsilon/\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
271	$\pi^* \leftarrow \pi$ (phen)	54954
292	$\pi^* \leftarrow \pi^*$ (phen)	24547
360	$\pi^* \leftarrow \pi^* + \pi^* \leftarrow n$ (aza)	11220
379	$\pi^* \leftarrow \pi^* + \pi^* \leftarrow n$ (aza)	14321

Fonte própria.

Como os demais ligantes foram sintetizados previamente pela Dra. Camila F. N. Silva (dppzCH₃, dppzCl), ou pelo grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Cláudia Turro (dppn) ou adquiridos comercialmente (phen), seus espectros estão mostrados na figura a seguir.

Figura 21. Espectros eletrônicos de absorção para os ligantes fenazínicos deste trabalho, em DMSO.

Fonte: adaptado de DA SILVA et al., 2020.

Moléculas como as fenazinas e derivados, que são planares, rígidas, π -conjugadas e aromáticas, podem formar agregados moleculares em solução. Estes agregados são mantidos por forças intermoleculares fracas, resultando em equilíbrios de formação de dímeros, trímeros ou agregados de maior ordem, processo conhecido

como empilhamento π (do inglês *π -stacking*) (BRAGA et al., 2014; CHEN et al., 2009b; XU et al., 2017). A característica responsável pela natureza das forças intermoleculares nestes agregados é a presença de nuvens π , onde a densidade eletrônica nos anéis aromáticos de uma molécula pode interagir com os elétrons nos anéis de outra (chamado interação π - π). Em alguns sistemas, esta interação é tão expressiva que os elétrons das nuvens π envolvidas são perturbados energeticamente, diminuindo a energia de transição HOMO-LUMO do agregado em relação às moléculas separadas, fazendo surgir novas bandas no espectro eletrônico ou então alterando a intensidade da transição de uma banda já existente (BRAHMA et al., 2019). Quando este último fenômeno ocorre, nota-se que um gráfico de concentração em função de absorbância resulta em mudanças na inclinação da reta prevista pela lei de Lambert-Beer, a partir de uma certa concentração, indicando a presença de equilíbrio de formação de agregados (CHEN et al., 2009b).

Pensando nisso, investigou-se uma possível propriedade de empilhamento π do ligante dppz em solução. Para isso partiu-se de uma solução diluída de ligante, numa cubeta de quartzo de 1 cm, aumentando-se a concentração gradativamente. Tomou-se o cuidado de não deixar ocorrer precipitação de sólido em altas concentrações. Os espectros obtidos são mostrados a seguir.

Figura 22. Espectros de absorção eletrônica do ligante dppz em concentrações crescentes, em ACN, 298 K.

Fonte própria.

Esta propriedade também foi explorada por meio de espectroscopia de emissão eletrônica por fluorescência.

Figura 23. Espectros de emissão do ligante dppz, λ_{exc} 271 nm, em acetonitrila, em concentrações crescentes.

Fonte própria.

O ligante dppz tem um perfil de emissão de uma banda com máximo em 425 nm, sendo de máxima intensidade quando excitado em 271 nm. A excitação em outras bandas de absorção acarreta na mesma emissão, mas em intensidades muito menores. Não há mudança no perfil de emissão (em termos de deslocamento de energia) em concentrações crescentes do ligante.

Nas condições experimentais (absorção e emissão eletrônica, solvente acetonitrila, a 25 °C) não houve mudanças de níveis de energia e nem intensidade de nenhuma banda. O solvente acetonitrila foi escolhido porque solventes polares favorecem as interações π entre os anéis de uma molécula hidrofóbica. Quando se plota um gráfico da lei de Lambert-Beer para este sistema (anexo), observa-se que o gráfico de concentração vs absorvância é uma reta com alto coeficiente de correlação, mesmo estando muito fora das condições da lei-limite ($0,2 < \text{absorvância} < 0,9$). Estes fatos indicam que não foi possível observar formação de espécies agregadas nestas condições e por esta técnica, e que as eventuais interações intermoleculares não perturbaram os níveis eletrônicos do ligante dppz no espectro de absorção no UV.

Um outro fenômeno que ocorre com algumas moléculas orgânicas semelhantes às fenazinas, e seus complexos, é o solvatocromismo. Uma molécula ou um sistema é dito solvatocrômico quando as energias envolvidas nas transições eletrônicas, de absorção ou emissão, são moduladas em função de parâmetros do solvente (como a polaridade e constante dielétrica) no qual o analito se encontra dissolvido (DE SOUZA et al., 2017; OSTERBY et al., 1996). De modo a investigar melhor as propriedades eletrônicas do dppz, foram estudados espectros de absorção em 22 solventes, entre álcoois, halogenados, aromáticos e compostos carbonílicos, mantendo-se concentração fixa de dppz; os máximos de banda (em centímetros recíprocos) foram plotados em função de dois parâmetros termodinâmicos de solventes: ET_{30} (kcal mol⁻¹), baseado no cromóforo-padrão betaína (ou corante de Reichardt) (REICHARDT, 1994) e SPP (adimensional), um parâmetro proposto por Catalán e colaboradores que funciona como uma escala de polaridade de solventes, levando em conta duas sondas fluorescentes (CATALÁN et al., 1995). O conjunto de todos os espectros está em anexo. A figura a seguir mostra a maior diferença de comprimento de onda encontrada entre dois solventes (metanol e tolueno).

Figura 24. Diferenças entre máximos de onda para absorção do ligante dppz na região diaza, em metanol e tolueno.

Fonte própria.

É conhecido que as transições de natureza $\pi^* \leftarrow n$ têm coeficientes de absorvidade molar menor que as $\pi^* \leftarrow \pi$, além de ocorrerem em maiores comprimentos de onda, porque a transição ocorre de um orbital não-ligante, de maior energia que um ligante. Quando ocorre uma transição $\pi^* \leftarrow n$, há uma reorganização da densidade eletrônica no estado excitado. Os elétrons que pertenciam ao par não-ligante, paralelo ao anel, acabam populando orbitais π^* com densidade acima e abaixo do plano da molécula. Por consequência, existe uma diminuição do momento de dipolo (BRUICE, 2016). Como o estado fundamental é mais polar do que o excitado, espera-se que solventes polares estabilizem o primeiro. Assim, ocorre uma estabilização do HOMO e nenhuma alteração do LUMO, fazendo aumentar a energia de transição $\pi^* \leftarrow n$ (KONGSTED et al., 2004).

Na região de alta energia (porção fenantrolínica), a variação foi menor que 2 nm. Já as bandas acima de 350 nm (porção diaza) sofrem um pequeno deslocamento hipsocrômico quando o solvente é metanol (o mais polar da série) em relação ao tolueno, o outro extremo da série ($\Delta\lambda = 5$ nm, ou $\Delta E = 76,0$ kcal mol⁻¹). Esta é uma variação muito pequena se comparada ao composto solvatocrômico de referência (betaína), que apresenta uma amplitude de até 357 nm. Ainda assim, na análise da banda de maior energia, houve uma separação evidente de grupos de solventes: os álcoois formam um grupo onde o máximo de banda é deslocado para o azul (com exceção do etilenoglicol, devido à sua alta viscosidade), seguido das cetonas, ao passo que os solventes aromáticos tendem a causar um deslocamento para o vermelho, e os clorados ficam entre os dois extremos em ambos os parâmetros. Isto está dentro do esperado, uma vez que solventes aromáticos interagem com o dppz via interação π , formando temporariamente orbitais moleculares de menor energia, ou então forçando uma espécie de equilíbrio dinâmico de agregação molecular, reversível, entre moléculas de ligante, causando o mesmo efeito. Já os álcoois aumentam a energia de transição, pois podem solvatar as moléculas de ligante de forma a impedir aproximações adequadas para interações π entre estas, impedindo formação de novos OM's; além do fato de que álcoois estabilizam o HOMO envolvidos em transições $\pi^* \leftarrow n$ (KONGSTED et al., 2004).

Figura 25. Correlação entre o parâmetro ET_{30} e a energia de transição eletrônica para a banda de menor energia do ligante dppz, para diversos solventes.

Fonte própria.

Figura 26. Correlação entre o parâmetro SPP e a energia de transição eletrônica para a banda de menor energia do ligante dppz, para diversos solventes.

Fonte própria.

Quando o ligante dppz é protonado por meio de uma solução de HCl pH 1,0, o espectro resultante é obtido:

Figura 27. Espectros de absorção para o ligante dppz em 1-propanol e em solução alcóolica acidificada com HCl para pH 1,0.

Fonte própria.

Observa-se que quando há protonação, algumas bandas na região de baixa energia são suprimidas, restando apenas três bandas largas (como no *inset*); ao mesmo tempo, algumas bandas de natureza $\pi^* \leftarrow \pi$ são perturbadas pela adição de um próton, sendo comum que se desloquem levemente para o vermelho devido à criação de carga e efeitos indutivos. Já transições $\pi^* \leftarrow n$ são mais afetadas pela protonação, porque a criação de um novo orbital molecular leva à estabilização dos elétrons n . Isso é observado porque algumas bandas da região com transições de baixa energia são deslocadas para o azul, formando uma banda larga em torno de 300-340nm. Esse conjunto de informações aponta para a existência de componentes $\pi^* \leftarrow n$ encobertas por transições $\pi^* \leftarrow \pi$ na porção diaza da molécula.

4.2. Síntese dos complexos precursores e inéditos: discussões simultâneas às atribuições dos espectros eletrônicos de absorção

Para a obtenção dos complexos, foi realizada uma rota sintética em cinco etapas. Em cada etapa serão discutidas também as atribuições das bandas eletrônicas, de muita importância no acompanhamento das sínteses.

4.2.1. Precursor (1), “cluster-mãe”: $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$

Esta primeira etapa consiste no refluxo de cloreto de rutênio (III) triidratado, etanol, ácido acético e acetato de sódio. Após o tempo adequado, obtém-se o produto com três centros metálicos Ru, seis acetatos e um oxigênio em ponte. Completando a esfera de coordenação, estão as moléculas de solvente do meio reacional (S), e como o produto é lavado algumas vezes com metanol em abundância, considera-se que S é predominantemente metanol, CH_3OH .

Figura 28. Esquema de reação para formação do precursor (1).

Fonte própria.

Este tipo de reação é nomeado na literatura como auto-montagem (tradução livre de *self-assembly*), quando um sistema se organiza num arranjo bem definido (com direcionalidade) na ausência de forças externas, tipicamente observado em processos de síntese de supermoléculas (TOMA, 2000). Embora esta designação seja usada principalmente para descrever um arranjo não-covalente de moléculas em solução ou no estado sólido, através de interações fracas, pode-se estender o conceito neste caso: o produto formado possui um arranjo molecular direcionado pelo conjunto de átomos dos metais e dos ligantes em ponte. O produto em maior quantidade é o complexo trinuclear descrito acima, e não espécies mononucleares; provavelmente devido também às interações entre os orbitais p do oxigênio e os orbitais 4d do metal, que estabilizam níveis eletrônicos, além do aspecto termodinâmico da complexação de acetatos em ponte, que formam seis anéis de seis

membros, conferindo uma estabilidade especial a estas moléculas (MIESSLER et al., 2014; YE et al., 2007). Estudos cinético-mecanísticos demonstram que a síntese de complexos heteronucleares que contenham uma unidade central do tipo $[M_2M'O]$ ($M, M' =$ metais de transição) passa por intermediários bimetalícos do tipo M_2O , que são instáveis e logo agrupam um terceiro átomo para formar a espécie trinuclear, e isto explica a observação de complexos Ru_2M' , mas não RuM'_2 (ALEXIOU et al., 2000). Não são observadas espécies com nuclearidade superior.

É importante notar que as moléculas de solvente como metanol, água e etanol são lábeis (e a cinética de troca entre elas é rápida) (TOMA et al., 2001) o que faz com que existam variedades de complexos com diferentes solventes como ligantes. Entretanto isto não interfere na caracterização mínima (absorção eletrônica no UV-Vis) ou na reatividade deste complexo, e é possível confirmar sua obtenção pelo espectro eletrônico (ALEXIOU, 1993; NIKOLAOU, 2002; TOMA et al., 2001).

Figura 29. Espectro eletrônico do precursor (1) e deconvolução calculada.

Fonte própria.

A rica química desta classe de compostos de rutênio é fundamentada pelas teorias que descrevem suas estruturas molecular e eletrônica. As primeiras considerações acerca da natureza das transições eletrônicas em termos da mistura orbital metal-oxigênio e de suas simetrias foram pensadas por Cotton e Norman em 1971. Com base na teoria de Combinação Linear Adaptada por Simetria (do inglês *Symmetry-Adappted Linear Combination, SALC*), um diagrama de orbitais moleculares (DOM) foi proposto por Baumann em 1978, para explicar as transições

eletrônicas em complexos simétricos, pertencentes ao grupo de ponto D_{3h} - quando todos os ligantes periféricos são iguais. Mais tarde, Alexiou mostrou um segundo diagrama, fruto do desdobramento daquele sob simetria C_{2v} - quando um terceiro ligante L' é diferente dos dois outros (ALEXIOU, 1993; BAUMANN et al., 1978; COTTON et al., 1972). Embora não esteja explorado com detalhes aqui, os DOMs são baseados na Teoria de Grupo e nas representações de simetria que os orbitais atômicos assumem quando na simetria da molécula, e suas combinações para formar orbitais moleculares.

Algumas ressalvas são feitas: para simplificação, sem o uso de cálculos computacionais, não foram consideradas as contribuições dos acetatos em ponte, e assumiu-se também que os complexos não sofram distorções de simetria por efeitos eletrônicos ou conformacionais, sendo essencialmente D_{3h} ou C_{2v} . Omitiu-se também as interações sigma entre os metais e o ânion óxido, evidenciando-se as interações de natureza π , que são responsáveis pela conjugação eletrônica e geração dos OMs envolvidos nas transições eletrônicas no uv-visível. O esquema a seguir mostra o conjunto de coordenadas escolhidas para orientação dos orbitais de simetria π que compõem os DOMs.

Figura 30. Sistema de coordenadas adotado para a construção do DOM. O sobrescrito linha (') indica coordenada local.

Fonte própria.

Figura 31. Diagrama de orbitais moleculares proposto para complexos trinucleares com ponte μ_3 -oxo sob simetrias D_{3h} e C_{2v} , focando no núcleo $[Ru_3O]$ e considerando contribuição de um ligante com orbitais π^* .

Fonte própria.

As designações dos orbitais metálicos atômicos levam um diferencial (') devido à representação em um sistema de coordenadas local ($x'y'z'$) para cada rutênio, sendo que o oxigênio central foi tomado como eixo de coordenadas original (xyz). Não deve ser confundido com as marcações ' (linha) e " (duas linhas) presentes nos símbolos de Mulliken dos OM's, indicando simetria (') ou assimetria (") em relação a um eixo de reflexão. O orbital p_z do oxigênio central (que no sistema de coordenadas escolhido tem simetria π e é o orbital que não participa diretamente de ligações sigma, estando perpendicular ao plano da unidade $[Ru_3O]$) interage com orbitais $dy'z'$ de cada íon Ru^{3+} , resultando num orbital ligante e em um antiligante de simetria a''_2 – de caráter de oxigênio e de metal, respectivamente. Os íons metálicos interagem entre si também, pela mistura de orbitais $dx'z'$, gerando orbitais e' e um a'_2 . Os orbitais metálicos quadráticos $dx'^2-y'^2$ de cada rutênio também possuem uma sobreposição suficientemente efetiva para gerar orbitais a'_1 e $e'(2)$, que se comportam como não-ligantes, pois as interações são mais fracas do que no caso anterior. Observa-se a natureza paramagnética de complexos com carga +1, com um elétron desemparelhado no SOMO a'_2 . No caso deste DOM, mostrou-se a contribuição de um orbital π^* de um ligante N-heterocíclico, que pode aceitar elétrons do centro metálico.

Isto explica as transições de transferência de carga cluster-ligante (TCCL) nos complexos contendo ligantes piridínicos.

No precursor **1**, “cluster-mãe”, os ligantes solvente não possuem um orbital com esta simetria e energia adequadas para a interação, e, portanto, as bandas TCCL devem ocorrer através de transferências de carga acetato-cluster. Assim, para este precursor, este diagrama permite uma visualização dos orbitais envolvidos somente nas transições IC, que ocorrem entre os orbitais com caráter da mistura p_z (O) e orbitais d com componente em z (d_{x^2z} , d_{y^2z}). Ainda assim, a deconvolução calculada para o precursor (**1**) é semelhante ao perfil espectral de um cluster simétrico com fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{pz})_3]^+$, onde pz = pirazina, cujas transições eletrônicas foram atribuídas por Alexiou (ALEXIOU, 1993). As transições então são atribuídas a seguir (IC = Intra-Cluster; TCCL = Transição de Transferência de Carga Cluster-Ligante). Os valores de ϵ são de um complexo análogo onde o ligante solvente é DMSO (dimetilsulfóxido), apenas para efeito de comparação, já que a ordem de grandeza destes valores mostrou-se não muito variante dentro de uma série de complexos com diferentes ligantes L (solventes e N-heterocíclicos) (ALEXIOU, 1993).

Tabela 5. Atribuições de bandas de absorção para o precursor (**1**) em DMSO.

Comprimento de onda no máximo de banda/nm	Transição	$\log \epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1*}$
(1) 681	$a_2'' \leftarrow e''$ (IC)	3,7
(2) 602	$a_2'' \leftarrow a_1'$ (IC)	3,5
(3) 482	TCCL	3,1
(4) 381	TCCL	3,2
(5) 242	TCCL	3,9

* valores para um complexo de fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmsO})_3]\text{PF}_6$

Fonte: ALEXIOU, 1993.

4.2.2. Precursor (2): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_2\text{CO}]^0$

Como o complexo final desejado é assimétrico - possui dois ligantes L_1 (4-pic) e um ligante L_2 , dppz – é necessário que um dos íons Ru^{3+} seja transformado numa espécie inerte frente à troca de ligantes solventes (S) por ligantes piridínicos. Se estes fossem adicionados diretamente ao precursor (**1**), formar-se-ia um complexo simétrico com três ligantes piridínicos substituindo os solventes. Esta etapa consiste, então, na

adição de um grupo protetor ao complexo, o monóxido de carbono (CO). O primeiro passo é reduzir o complexo da forma $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$ para $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}$ (esta representação é apenas ilustrativa, uma vez que a valência neste cluster reduzido é deslocalizada). A redução é exclusivamente monoeletrônica, seja ela feita por hidrazina (N_2H_4) ou por amálgama de zinco e mercúrio – ambos os reagentes possuem potencial para promover a redução do cluster de +1 a 0; estados reduzidos com carga -1 (ou mesmo oxidados com carga +2) são acessíveis somente por processos eletroquímicos.

Figura 32. Esquema de reação para formação do precursor (2).

A redução faz com que haja pareamento de elétrons no último orbital, tornando a espécie diamagnética. Além disso, a repulsão intereletrônica desestabiliza o orbital HOMO do complexo, diminuindo o *gap* energético HOMO-LUMO. Isso está de acordo com o observado no espectro de absorção da espécie reduzida $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{MeOH})_3]^0$, pois a banda intra-cluster (IC) tem um deslocamento batocrômico de 681 para 903 nm. Uma das bandas TCCL, no complexo reduzido, também é deslocada para o vermelho, indo de 381 para 422 nm.

Uma vez que o complexo apresenta carga forma zero, é possível coordenar em um dos íons metálicos uma molécula de CO. Este ligante tem caráter σ -doador, com um par de elétrons centrado no carbono, e π -receptor, pois seus orbitais π^* estão vazios e possuem simetria e energia adequada para interagir com orbitais d_{xy} do íon Ru^{II} . Pelo efeito de retrodoação que retira densidade eletrônica do metal, o orbital HOMO do complexo é estabilizado com a coordenação do CO, aumentando a energia da transição, deslocando a banda IC de 903 para 560 nm (MOREIRA et al., 2016). Na verdade, a literatura reporta que, uma vez que o ligante CO é coordenado, o complexo

comporta-se como tendo valência localizada, sendo melhor descrito por $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{II}}\text{CO}$ – o mesmo ocorre com ligantes CN^- ou fosfinas (BAUMANN et al., 1978; MOREIRA et al., 2016).

Figura 33. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para os precursores (1) reduzido e (2), em MeOH.

Fonte própria.

4.2.3. Precursor (3): $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{CO}]^0$

Com um dos íons rutênio protegidos, pôde-se prosseguir à adição assimétrica do ligante piridínico, que facilmente desloca o solvente metanol coordenado nas duas posições remanescentes.

Figura 34. Esquema de reação para formação do precursor 3.

Fonte própria.

A coordenação do ligante 4-picolina se dá pela mistura de um orbital d_{z^2} de um íon Ru^{3+} com um orbital de simetria sigma do heterociclo, paralelo ao plano do anel. Os orbitais de simetria π do ligante interagem com orbitais d de mesma simetria do íon metálico, possibilitando o fenômeno de retrodoação: um processo sinérgico por onde o ligante contribui com um par de elétrons para um orbital vazio do metal (reação ácido-base de Lewis, representada pela seta vermelha), e simultaneamente ocorre a retirada de densidade eletrônica por doação dos elétrons d para orbitais π^* vazios do ligante (setas azuis) (IUPAC, 2006). Entretanto, a retrodoação nos ligantes piridínicos não é tão pronunciada como no ligante CO, pois estes possuem rotação livre ao longo do eixo da ligação (seta vermelha); em média, as moléculas cuja conformação entre o ligante e o orbital d_{π} esteja coplanar contribuem para o efeito de aporte de elétrons, mas esta não é uma sobreposição efetiva como no caso do CO, cuja conformação é fixa na melhor sobreposição orbital. Na figura 16 está representado um dos dois primeiros LUMOs (π^*) da 4-picolina de simetria adequada para a interação com orbitais d_{π} . Os orbitais envolvidos na ligação σ foram omitidos. Também há outro orbital que contribui para a retrodoação, quando o ligante piridínico está a 90° do plano da $[Ru_3O]$, existindo então duas conformações para isso.

Figura 35. Interação sigma (ligação química, seta vermelha) e interação π (retrodoação), esta última se dando entre um dos LUMOs do ligante piridínico e o orbital $d\pi$ do metal.

O grupo CH_3 também aumenta a densidade eletrônica no nitrogênio do anel para interação sigma com o metal, por um efeito indutivo de grupo doador de elétrons, que é um efeito menos pronunciado do que a ressonância, se fossem grupos como OH ou NH_2 .

O espectro eletrônico do precursor **3** está mostrado a seguir.

Figura 36. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para o precursor **3**.

Observa-se que a banda IC varia levemente com a adição do ligante 4-picolina, em relação ao seu precursor que continha moléculas de solvente, e a banda continua

tendo o mesmo formato gaussiano (de 560 para 585 nm). Mesmo no caso de ligantes mais π -ácidos, como a dimetilpirazina (dmpz), a literatura reporta que a banda IC tem um deslocamento muito leve para 591 nm. Trabalhos anteriores explicam este fato pelo efeito *push-pull* exercido por ligantes σ -doadores em conjunto com π -receptores: quanto mais densidade eletrônica os ligantes piridínicos doam, maior o efeito da retrodoação na ligação $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO}$; como resultado líquido, as energias dos orbitais $d\pi$ do metal variam muito pouco (MOREIRA et al., 2016). Porém os efeitos de sigma-doadora do ligante, mais ele desestabiliza os níveis $d\pi$ do metal, incluindo aqueles que não possuem simetria adequada para interagir com o ligante CO (e que não sofrem efeito *push-pull*); consequentemente, as energias das transições $\pi^* \leftarrow d\pi$ diminuem (MOREIRA et al., 2016). As bandas mais finas e intensas abaixo de 273 nm são transições intrínsecas $\pi^* \leftarrow \pi$ dos ligantes (IL).

4.2.4. Precursor (4): $\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{MeOH})\text{PF}_6$

Esta etapa consiste na retirada do grupo protetor CO, através da re-oxidação do complexo. Íons com carga +3 não conseguem comportar um ligante retirador de densidade eletrônica como o CO, e por isso ocorre sua labilização. Como a oxidação é feita com Br_2 , coordena-se um ligante brometo na vacância deixada pelo CO (considerando que o solvente, CH_2Cl_2 , não é coordenante). A próxima etapa é um refluxo com metanol, para a troca do ligante Br^- por MeOH. O íon brometo passa da esfera interna para a externa, como contra-íon, mas este é trocado por um excesso de PF_6^- , que diminui a solubilidade em solventes orgânicos polares e permite a precipitação do complexo, facilitando sua purificação.

Figura 37. Esquema de reação para formação do precursor (4).

Fonte própria.

Como o orbital HOMO é estabilizado pela retirada de um elétron, tornando-se novamente um orbital SOMO, a transição intra-cluster (IC) agora torna a ocorrer em regiões de mais baixa energia (em relação aos complexos reduzidos com CO). Observa-se também a presença de um ombro na banda IC, devido aos mesmos efeitos explicados para o precursor (1); o que muda aqui, entretanto, é que o DOM para o precursor (1) foi feito para simetria D_{3h} . Como os precursores (2), (3) e (4) são menos simétricos, o grupo de ponto torna-se C_{2v} e assim o DOM também muda. Não será explorado com detalhes a construção deste segundo DOM, mas sabe-se que em simetria C_{2v} não existem níveis degenerados, e os orbitais de simetria e' e e'' são desdobrados para novos pares orbitais de simetria a_1 e b_2 , e a_2 e b_1 , respectivamente. Ainda assim, ocorrem duas transições entre orbitais com maior caráter $[\text{Ru}_3\text{O}]$, com energias próximas, por isso o ombro na região IC, inexistente em complexos reduzidos tanto em simetria C_{2v} quanto D_{3h} (ALEXIOU, 1993). As transições intra-ligantes permanecem inalteradas, independentemente da carga do complexo.

Figura 38. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para os precursores (3) e (4).

Fonte própria.

4.3. Complexo: $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$

Quando se reage o cluster precursor (4), que contém um solvente como ligante e seis acetatos em ponte, com um ligante bidentado como as fenazinas, o produto é um cluster com cinco acetatos.

Figura 39. Esquema de reação para formação do novo complexo.

Fonte própria.

O ligante dppz possui geometria adequada para a coordenação bidentada, via dois nitrogênios, em um dos íons rutênio, que contém o ligante solvente, lábil. O

carbono imediatamente adjacente a um dos nitrogênios também se coordena ao complexo, através de um segundo íon metálico. Para isso, é necessário que i) o ligante solvente e um ligante acetato sejam retirados, para que haja vacâncias em dois sítios de coordenação e ii) o carbono alfa ao nitrogênio, no ligante, seja desprotonado antes da coordenação (processo chamado ativação C-H) (KUMAR et al., 2016b). Não existem ainda estudos cinéticos-mecanísticos que explicam a formação da ligação Ru-C nestes complexos; porém, como o complexo perde um grupo acetato (de carga negativa) e mantém a carga formal +1, ao invés de adquirir carga +2, propôs-se que o centro metálico atue como um catalisador capaz de desprotonar um carbono aromático, que possui um alto valor de pKa: para o benzeno, por exemplo, é de 43; hidrogênios alfa a nitrogênios em anéis aromáticos fundidos assumem valores de pKa ligeiramente mais baixos, entre 31 a 43 (BRUICE, 2016; SHEN et al., 2007) mas que ainda assim não são ácidos o suficiente frente a bases orgânicas comumente usadas em síntese. É comum que a coordenação a um centro metálico torne os hidrogênios alfa mais ácidos, e desta forma é provável que a coordenação bidentada pelos átomos de nitrogênio induza a desprotonação do carbono alfa (KUMAR et al., 2016b). Desta forma, o ligante adquire carga negativa, tornando-se um carbânion aromático, que é uma base de Lewis muito forte e que poderia reagir deslocando um ligante acetato e coordenando-se por ortometalação (CHEN et al., 2009a). Ainda que haja a perda de um ligante quelante acetato, que é estável devido ao anel de seis membros, forma-se um novo quelato de cinco membros.

Figura 40. Ativação da ligação C-H no ligante fenazínico e ortometalação.

Fonte própria.

Como o ligante dppz possui uma extensa conjugação π , o esperado era que ele induzisse o aumento da deslocalização eletrônica da unidade central $[Ru_3O]$, diminuindo a densidade eletrônica nesta e causando um efeito hipsocrômico, por

estabilização de orbitais $d\pi$ (YE et al., 2007) de maneira semelhante (mas menos intensa) do que um ligante CO. O observado é que a banda IC dos complexos, que é majoritariamente centrada nos orbitais dos íons metálicos e oxigênio, sofre apenas um leve efeito de diminuição de energia, continuando com um valor próximo aos de seu precursor **(4)**, deslocando-se de 678 para 695 nm ($\Delta\lambda = 17$ nm). Uma possível explicação é dada olhando-se a estrutura da molécula: se o ligante dppz estiver não-coplanar com o centro metálico, não há boa sobreposição dos orbitais mencionados; o ligante é “dobrado” para baixo do plano da $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Embora não tenha sido possível conseguir um monocristal para difração de raios-X para o complexo sintetizado, a explicação é consistente com o observado experimentalmente: cálculos computacionais mostram que o ângulo entre o cerne $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e o ligante dppz, no complexo **2** ($[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(\text{py})_2(\text{dppz})]^+$) é de $36,5^\circ$ (DA SILVA et al., 2020).

Para uma série de complexos com seis acetatos, existem estudos teóricos que mostram uma certa contribuição, da ordem de até 20%, dos acetatos nos orbitais HOMO mais internos (HOMO-1, HOMO-2) e nas transições eletrônicas do cerne metálico, sendo melhor descrito por $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]^+$ (PEREZ, 2018). Neste caso, mesmo após a saída de um acetato, a banda não foi tão afetada em termos energéticos, mostrando uma pequena contribuição deste ligante na energia da transição IC destes complexos, assim como reportado para complexo análogo ortometalado em cálculos de DFT que indicam menos de 11% de contribuição de acetato na IC (DAI et al., 2011). Uma outra observação no espectro eletrônico para o complexo sintetizado é que o formato da banda IC muda, tornando-se uma gaussiana centrada em 695 nm, diferente de seus precursores oxidados que têm uma distorção (ombro). A observação experimental coloca em questionamento como se dá a participação dos acetatos de fato. Na ausência de cálculos computacionais, não é ainda possível explicar esta mudança no perfil espectral para este composto.

Figura 41. Espectro eletrônico qualitativo de absorção para o novo complexo em acetonitrila e seu precursor (4) em metanol.

Fonte própria.

Tabela 6. Atribuição do espectro eletrônico para o novo complexo.

$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	Transição	$\epsilon/\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
695	(IC)	6855
357	$\pi^* \leftarrow \pi$ (IL) + $\pi^* \leftarrow d\pi$ (TCCL)	28875
272	$\pi^* \leftarrow \pi$ (IL) + $\pi^* \leftarrow d\pi$ (TCCL)	69820

Fonte própria.

Na região de 377 a 475 nm estão centradas as transições de transferência de carga cluster-ligante, de orbitais $d\pi$ para π^* do ligante. Em 273 nm e 357 nm estão as transições intra-ligante, ambas de origem $\pi^* \leftarrow \pi$ próprias do dppz, e nesta região também existem transições TCCL, que estão encobertas por transições IL. Observa-se que o valor de ϵ é muito alto para a banda em 272 nm, além do formato ser diferente das bandas TCCL típicas para os complexos precursores, sendo mais semelhante às bandas de transições $\pi^* \leftarrow \pi$ de alta energia do grupo fenantrolínico no ligante dppz. Isto indica uma sobreposição de bandas TCCL-IL nesta região.

Dados cristalográficos publicados para complexos com cinco acetatos evidenciam a explicação para a baixa perturbação eletrônica da banda IC quando se coordena o ligante dppz: quando o ligante bidentado é coordenado através de dois átomos de nitrogênio em um metal, e um átomo de carbono em outro metal (ortometalado, $\mu\text{-}\eta^1(\text{C}), \eta^2(\text{N}, \text{N})$), as bandas IC possuem o mesmo perfil do que os relatados aqui. Se, entretanto, o modo de coordenação se der por três átomos de nitrogênio (dois em um metal e um em outro metal, $\mu\text{-}\eta^1(\text{N}), \eta^2(\text{N}, \text{N})$) o perfil da banda muda bastante, deslocando-se para menores valores de comprimento de onda. Medidas dos ângulos diedros destes últimos complexos mostram que o ligante com três nitrogênios se encontra praticamente no mesmo plano da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ (ângulo de aproximadamente 5°), e, portanto, tem orientação adequada para a sobreposição efetiva de orbitais $d\pi(\text{Ru})\text{-}\pi(\text{anel})$. Já os ângulos diedros entre a $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e ligantes ortometalados são consideravelmente maiores, da ordem de $30\text{-}40^\circ$, e a geometria destes faz com que a deslocalização eletrônica seja pouco pronunciada (YE et al., 2007).

4.3.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IV)

Através do espectro de infravermelho, é possível atribuir alguns modos vibracionais do complexo e suas respectivas energias. De maneira geral, a depender da simetria do complexo gerado, alguns modos vibracionais serão observados e outros não, mudando também a sua intensidade. Phillips e colaboradores trazem compilados de valores de frequências vibracionais para uma série de acetatos, comparando os com maior caráter iônico em relação àqueles que apresentam algum grau de covalência (PHILLIPS et al., 1980). Por exemplo, acetatos ligantes quelantes ou simétricos em ponte ($M_1 = M_2$) não alteram a ordem de ligação C-O-M (considerando um ambiente de coordenação de geometria não distorcida), e as frequências de estiramento caem perto das do acetato iônico como em sais de sódio ou potássio. Já uma coordenação monodentada abaixaria a simetria global do complexo e resultaria em distâncias de ligações C-O diferentes, sendo mais pronunciada a diferença entre a frequência de estiramento COO assimétrico em relação ao simétrico.

Figura 42. Modos de coordenação de um ligante acetato a um ou mais metais.

Fonte própria.

Figura 43. Espectro de absorção no infravermelho (FT-IR) para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$.

Fonte própria.

Para efeitos de comparação, o artigo de Phillips traz a frequência de estiramento assimétrico ($\text{COO } \nu_{\text{as}}$) em acetatos de metais alcalinos (Na^+ , K^+ , Rb^+) em $1578\text{-}1571 \text{ cm}^{-1}$; para o simétrico (ν_{sim}), $1414\text{-}1402 \text{ cm}^{-1}$. A diferença $\Delta\nu = \nu_{\text{assimétrico}} - \nu_{\text{simétrico}}$ para acetatos puramente iônicos está na faixa de $164\text{-}171 \text{ cm}^{-1}$ (não existe variação significativa dos valores quando se troca o contra-íon se este é um metal alcalino). De fato, para complexos com acetato monodentado, a maioria dos valores reportados por Phillips e colaboradores possuem $\Delta\nu_{\text{monodentado}} > \Delta\nu_{\text{iônico}}$. Já no caso de ligantes bidentados quelatos, os valores de $\Delta\nu_{\text{quelato}}$ reportados foram menores que

$\Delta\nu_{\text{iônico}}$. É sugerido então que uma diferença $\nu_{\text{assimétrico}} - \nu_{\text{simétrico}}$ menor do que 150 cm^{-1} é um indicativo de acetato quelato e/ou em ponte. (NAKAMOTO, 1978). Entretanto, devido à baixa simetria do complexo, onde cada acetato está numa região química diferente, e portanto tem densidades eletrônicas e efeitos *trans* diferentes, esta atribuição das bandas de acetato torna-se imprecisa, pois existem muitas bandas semelhantes na região de 1400 a 1600 cm^{-1} , todas relativas a estiramentos COO, além dos vários estiramentos dos ligantes piridínicos (BAUMANN et al., 1978), e essa análise do modo de coordenação não se aplica. Também é observado um modo de vibração OCO fora do plano (β) em 680 cm^{-1} (MOREIRA et al., 2016; POSSATO, 2017).

Figura 44. Ilustração representando modos vibracionais possíveis para o íon acetato. Preto: C; Vermelho: O; Cinza: H.

Fonte própria.

Em 558 cm^{-1} encontra-se um estiramento da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, que aparece também em faixas de energia menores do que a janela de varredura mostrada aqui (NAKAMOTO, 1978); o contra-íon PF_6^- aparece como um estiramento em 843 cm^{-1} , ambos assimétricos. Neste caso, ainda que haja estiramento simétrico observado, este se dá por mudanças em níveis vibracionais da molécula como um todo, gerando um termo de simetria que permite com que a transição ocorra (PAVIA, 2010). Na região de alta energia (2500 - 4000 cm^{-1}), que foi omitida do espectro, estão presentes os vários estiramentos C-H dos ligantes piridínicos e do dppz.

4.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Dentre as técnicas para caracterização de qualquer classe de compostos, a ressonância magnética nuclear destaca-se por ter um alto grau de especificidade, sendo capaz de distinguir duas ou mais moléculas estruturalmente muito semelhantes, como confôrmers (BRUICE, 2016; PAVIA, 2010). Entretanto, esta técnica não é capaz de discernir entre dois enantiômeros, sobretudo numa estrutura onde predominam efeitos dos metais que distorcem muito os sinais dos ligantes orgânicos coordenados em relação aos mesmos livres (NIKOLAOU et al., 2001). Assim, observa-se um único conjunto de sinais atribuídos a uma molécula, mesmo que haja presença de dois estereoisômeros em solução.

Em moléculas orgânicas, os efeitos mais comuns que afetam valores de deslocamento químico são efeitos indutivos e de ressonância (grupos retiradores ou doadores de elétrons), e o efeito de corrente de anel. Este último ocorre quando os hidrogênios aromáticos ficam desblindados, porque a circulação de elétrons acima e abaixo do plano do anel induz um campo magnético local cujas cônicas são anisotrópicas, ou seja, não equivalentes em toda a região da molécula, como mostrado a seguir. No centro do anel, as linhas se opõem a B_0 , e na periferia onde se localizam os hidrogênios, elas se somam. Então, o campo efetivo é uma soma do campo externo aplicado e do campo induzido: $B_{\text{eff}} = B_0 + B_{\text{ind}}$, e o campo induzido é relacionado com uma constante de blindagem diamagnética, σ , de modo que $B_{\text{ind}} = -\sigma \times B_0$ e $B_{\text{eff}} = B_0 \times (1-\sigma)$ (MARIJA BARANAC-STOJANOVIC, 2014).

Figura 45. Efeito da corrente de anel sobre o campo magnético externo aplicado, B_0 , nos hidrogênios paralelos ao plano do anel.

Fonte: reprodução direta de MARIJA BARANAC-STOJANOVIC, 2014.

Nos compostos orgânicos, esta desblindagem é chamada diamagnética pois (a maioria das) moléculas possuem camada eletrônica cheia nos orbitais de valência, e assim têm uma resultante de momento angular de *spin* total nula ($S = 0$). Para compostos inorgânicos, além dos efeitos mencionados acima, é muito comum encontrar configurações eletrônicas que acarretam S diferente de zero, especialmente em metais da primeira série de transição com ligantes de campo fraco, ou quaisquer metais com orbitais d não totalmente preenchidos. A presença de elétrons desemparelhados introduz um segundo efeito chamado anisotropia paramagnética, onde o momento angular resultante intrínseco do elétron perturba o campo magnético efetivo sentido pelos núcleos próximos a ele. Este efeito pode causar um deslocamento tanto para campo alto quanto para campo baixo a depender da posição relativa nos núcleos em relação ao centro paramagnético. No caso dos compostos paramagnéticos, o campo gerado pelo elétron desemparelhado responde ao campo magnético externo, e os núcleos mais próximos à unidade $[Ru_3O]$ sentem mais este efeito (POSSATO, 2017). Nos complexos oxidados apresentados aqui, observa-se a presença de um elétron desemparelhado ($S = 1/2$), e, portanto, a atribuição de RMN para estes torna-se tarefa mais sofisticada.

A atribuição tentativa foi realizada por comparação com complexos análogos com carga +1 (paramagnéticos), reportados para ortometalados com ligantes axiais piridina (CHEN et al., 2009a; DAI et al., 2011; NIKOLAOU et al., 2001). A estrutura numerada do complexo sintetizado e seu espectro de RMN de 1H estão mostrados a seguir.

Figura 46. Numeração para os hidrogênios do complexo sintetizado.

Fonte própria.

Figura 47. Espectro de RMN de ^1H para o complexo sintetizado, CD_3CN , 500 MHz, 100 mM, 298 K.

Fonte própria.

Os hidrogênios em **1** (acetato) sofrem um deslocamento para 13,02 ppm, pois este grupo acetato está localizado acima dos anéis aromáticos do ligante dppz, ou seja, estão centrados exatamente na parte das cônicas de campo magnético induzido pelos anéis que se opõem ao campo magnético externo, conforme figura 46. Esta observação está de acordo com a estrutura proposta para o complexo. Em relação aos hidrogênios do ligante dppz, pode-se observar um deslocamento muito significativo para o hidrogênio alfa ao carbono envolvido na ligação C-Ru (**a**), que aparece como um dubleto em -13,84 ppm, provavelmente devido ao conjunto de efeitos de alta densidade eletrônica presente no carbono da ortometalação e paramagnetismo da unidade central. Uma outra observação interessante é que o hidrogênio em (**i**) é deslocado para 0,95 ppm, um valor muito incomum para um hidrogênio aromático. Isto é consequência da proximidade deste núcleo com a unidade [Ru₃O] que contém um elétron desemparelhado, sendo o centro paramagnético da molécula (DA SILVA et al., 2020). Como aparecem mais sinais do que os atribuídos por tentativa, conclui-se que a etapa de purificação não foi precisa e assim o espectro mostra sinais de impurezas, provavelmente do cluster cuja estrutura é mostrada na discussão sobre o espectro de massas.

4.3.3. Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray* (ESI-MSMS²)

Dentre as técnicas analíticas de caracterização, a Espectrometria de Massas é uma das mais sensíveis em relação ao limite de quantificação de substâncias, além de gerar resultados de interpretação razoavelmente simples e seguros. O método de ionização escolhido para estas análises é a ionização por *electrospray* (ESI). Neste método, uma solução do analito é passada através de um capilar altamente carregado (da ordem de 5kV) e levada até uma câmara de baixa pressão, onde é concentrado em gotículas carregadas negativamente devido ao forte campo elétrico, num processo chamado de nebulização. Conforme as gotículas entram na câmara de ionização, elas são dessolvatadas por aumento da temperatura e fluxo de gás nitrogênio, restando apenas aglomerados de íons em estado gasoso. Por causa da enorme repulsão eletrostática nesses aglomerados, ocorre uma explosão destes, gerando vários fragmentos menores de íons de analito (HENDERSON et al., 2005).

Esta técnica é muito utilizada em análises de compostos inorgânicos, pois o outro método comum de tratamento de amostra, chamado de ionização eletrônica (EI),

utiliza um choque mecânico de elétrons para gerar íons, além da necessidade de aquecimento da amostra para levar o analito à fase gasosa. Este segundo método é limitado no contexto de moléculas orgânicas pequenas, voláteis e de baixa massa molecular, que não é o caso das estruturas apresentadas neste projeto, que requerem temperaturas altíssimas para serem vaporizadas; além disso, a alta voltagem aplicada no EI poderia fragmentar a estrutura original antes desta chegar nos detectores, tornando a análise inviável. Neste contexto, o ESI é um método de ionização brando, atendendo aos requisitos de compostos de coordenação e de moléculas de alta massa molecular, como proteínas e polímeros (BURGOYNE et al., 2016; HENDERSON et al., 2005; LLOYD et al., 2005). No modo positivo, somente espécies com carga positiva são detectadas, por isso não se observa contra-íons (ânions) no espectro.

O espectro de MS mostra o pico do íon molecular do complexo sintetizado sem o contra-íon PF_6^- ($[1 - \text{PF}_6^-]$) em m/z 1082,9751. Também se observa um pico em m/z 953,9616 correspondente a um cluster totalmente simétrico de fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_3]^+$, impureza proveniente da síntese na etapa de obtenção dos precursores **(3)** e **(4)**.

Os outros picos presentes são fragmentações que eventualmente ocorrem na fonte, de origem de compostos orgânicos ligantes, relativamente comum, ainda que esta técnica permita minimizar este fenômeno. O fato de existir a impureza relatada não impossibilita a caracterização do complexo pelo perfil de fragmentação no MS^2 e nem invalida a confirmação de sua estrutura.

Figura 48. Espectro de MS por ESI no modo positivo do complexo sintetizado.

Uma informação muito valiosa que se pode extrair de um espectro de massas, sobretudo para compostos inorgânicos, é o padrão isotópico de um determinado elemento presente no analito, no caso os isótopos de rutênio, cuja distribuição é ¹⁰⁴Ru (18.7%), ¹⁰²Ru (31.6%), ¹⁰¹Ru (17.0%), ¹⁰⁰Ru (12.6%), ⁹⁹Ru (12.7%), ⁹⁸Ru (1.88%) e ⁹⁶Ru (5.52%) (SEUANES et al., 2015). Em espectros de alta resolução é possível observar a composição isotópica como a seguir. Por causa da presença de três átomos de Ru, a combinação de isótopos resulta numa grande variedade de picos com diferentes massas e abundâncias. Além disso, a diferença de massa ($\Delta m/z$) entre os picos confirma que a carga do complexo é de fato +1 (HENDERSON et al., 2005).

Figura 49. Distribuição isotópica para o íon molecular do complexo sintetizado.

Selecionando-se um pico de interesse, pode-se acompanhar a fragmentação deste íon. O perfil de fragmentação do pico m/z 1082,9751 é mostrado a seguir.

Figura 50. Espectro de fragmentação MS² por ESI⁺ do íon de m/z 1082,9774.

Fonte própria.

O espectro de MS² mostra um padrão de fragmentação típico para acetatos trinucleares contendo ligantes periféricos N-heterocíclicos (DA SILVA, 2019c; MOREIRA et al., 2008; NIKOLAOU et al., 2008; POSSATO, 2017). Observa-se perdas sucessivas do ligante 4-picolina, que deixam vacâncias no metal onde estava coordenada. Estas vacâncias podem ser eventualmente preenchidas com moléculas de solvente utilizadas para o preparo de amostra, a saber, acetonitrila e água (a água pode estar presente em traços no solvente de escolha). Além disso pode haver formação de adutos em fase gasosa com moléculas de solvente coordenantes, uma vez que é possível que, no decorrer do caminho percorrido pelo analito dentro das instalações do equipamento, moléculas de solvente acabem chegando ao detector. Uma análise que poderia argumentar a favor desta observação é o uso de espectrometria de massas por ionização por MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization*, ou Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz), onde a amostra seria adsorvida numa matriz sólida garantindo que apenas íons do analito chegassem ao detector (HENDERSON et al., 2005; POSSATO, 2017). No entanto, devido aos grupos funcionais coordenantes das moléculas que compõem as matrizes comuns, a análise para complexos inorgânicos torna-se difícil, e a possibilidade de

passagem de solvente até o detector é relativamente comum (POSSATO, 2017). Além disso, o perfil de fragmentação observado é consistente com a estrutura proposta e com o perfil relatado para outros complexos análogos, como nas referências acima. Não se observa a perda do ligante dppz nas fragmentações, uma vez que este faz três ligações com o centro metálico, e, portanto, a decomposição do íon molecular desta maneira seria mais difícil de ocorrer. Já as piridinas axiais e até mesmo os acetatos são mais facilmente removidos no potencial utilizado. Em relação a estes últimos, a perda de um grupo negativamente carregado deveria acarretar na mudança de carga do composto e na relação m/z ; entretanto, como não existem mecanismos estabelecidos para a fragmentação destes compostos, admite-se a possibilidade de o composto manter a carga +1 por uma transferência de elétron do acetato para o complexo, saindo como uma espécie neutra CH_3COO , já que a reatividade de espécies em fase gasosa é muito diferente do que em solução, uma vez que as moléculas possuem energia o suficiente para estabilizar espécies que seriam muito reativas em solução (HENDERSON et al., 2005; PAVIA, 2010).

Apesar do padrão de fragmentação do MS^2 ser consistente, as observações de picos de cluster simétrico e de ligante livre no MS mostram que o composto encontra-se impuro, o que inviabilizou a continuação dos testes biológicos com o mesmo.

Tabela 7. Atribuição dos picos observados no espectro de $\text{ESI}^+\text{-MS}^2$ para a fragmentação do íon molecular de m/z 1081,9751, do complexo sintetizado.

Pico (m/z)	Atribuição
1081,9751	$[\mathbf{1} - \text{PF}_6^-]^+$
1007,9295	$[\mathbf{1} - \text{PF}_6^- - 1\text{pic} + \text{H}_2\text{O}]^+$
989,9182	$[\mathbf{1} - \text{PF}_6^- - 1\text{Pic}]^+$
932,8821	$[\mathbf{1} - \text{PF}_6^- - 2\text{Pic} - \text{OAc}]^+$
914,8707	$[\mathbf{1} - \text{PF}_6^- - 2\text{Pic} + \text{H}_2\text{O}]^+$
896,8601	$[\mathbf{1} - \text{PF}_6^- - 2\text{Pic}]^+$

Fonte própria.

4.4. Reatividade, estabilidade e propriedades dos complexos ortometalados

Devido ao insucesso na purificação do complexo sintetizado, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, não foi possível proceder aos testes de atividade biológica com este. Por isso, optou-se por explorar esta e outras propriedades com a classe de ortometalados análogos, disponíveis no laboratório de pesquisa (DA SILVA et al., 2020).

Os complexos **1** (dppn), **2** (dppz), **3** (dppz-CH₃), **4** (dppz-Cl) e **5** (phen) foram sintetizados da mesma maneira que o complexo com 4-picolina, e, portanto, a discussão tem o mesmo modelo. Abaixo são mostrados os espectros eletrônicos de todos e suas estruturas.

Figura 51. Espectro eletrônico dos complexos ortometalados 1-5, em diclorometano.

Fonte: adaptado de DA SILVA et al., 2020.

Figura 52. Estrutura dos complexos 1-5 utilizados neste trabalho. O núcleo fenantrolínico em comum é mostrado em azul. O contra-íon é PF_6^- .

Fonte própria.

A substituição de um grupo CH_3COO^- e a ortometalação fazem com que a simetria do composto abaixe consideravelmente: como os novos complexos apresentam a identidade, E , como único elemento de simetria, eles pertencem ao grupo de ponto C_1 . De acordo com a Teoria de Grupo, moléculas pertencentes aos grupos de ponto C_n , D_n , T , O e I são quirais (COTTON, 1990). Logo, estes complexos apresentam quiralidade, existindo como um par de enantiômeros (R) e (S). O solvente utilizado na síntese (DCM) não é quiral, e assim não existe nenhum efeito de estabilização cinética para a formação preferencial de um isômero em particular, obtendo-se ao final um racemato (BRUICE, 2016).

Figura 53. Estruturas do par de enantiômeros para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, com cinco acetatos e ligante dppz, geradas através do software Chem3D. O contra-íon foi omitido. Vinho: Ru; azul: N; vermelho: O; cinza: C; branco: H.

Fonte própria.

No caso em especial dos complexos **3** (dppz-CH₃) e **4** (dppz-Cl) ainda há a existência de isômeros geométricos, além da isomeria óptica. Isso porque o ligante pode estar com o grupo R (CH₃ ou Cl) coordenado em lados opostos em relação ao acetato acima do plano dos anéis do dppz. Portanto para estes complexos existem quatro isômeros possíveis, sendo um R e um S para cada par de isômeros geométricos. Isso é constatado nos espectros de RMN de ¹H, já que os sinais para os acetatos aparecem todos duplicados com um leve espaçamento entre os picos (DA SILVA et al., 2020), indicando que a técnica é capaz de detectar pequenas alterações no ambiente químico dos acetatos provocado pela posição relativa do grupo R no dppz.

A mesma ideia de empilhamento π em solução, feita para o ligante dppz, foi proposta para os complexos. Para isso, escolheu-se o complexo **2**, que contém o ligante dppz. Os espectros são mostrados a seguir:

Figura 54. Espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_5(4\text{-pic})_2(\text{dppz})]\text{PF}_6$, em concentrações crescentes, a 298 K, em acetonitrila.

Fonte própria.

O mesmo comportamento é observado tanto para o ligante quando para o complexo **2**: não há alterações nas bandas, em energia ou em desvios de intensidade. Novamente, a lei de Lambert-Beer é seguida mesmo em concentrações que resultam em absorbâncias maiores que a unidade.

Um passo importante para a construção de novas moléculas para uso biológico inclui explorar alguns parâmetros de estabilidade. Pensando em possíveis reações de labilização de ligantes, cisão da ligação C-Ru ou quaisquer indícios de degradação da molécula, fez-se alguns testes qualitativos de estabilidade dos complexos **1-5**. A seguir estão mostrados os espectros em função do tempo de borbulhamento de oxigênio em solução de diclorometano.

Figura 55. Espectros eletrônicos de absorção dos complexos 1-5 (A-E) submetidos a diferentes tempos de borbulhamento de gás oxigênio em solução de diclorometano.

Fonte própria.

Mesmo após borbulhamento contínuo de $O_{2(g)}$ na solução dos complexos **1-5**, estes se mostraram inertes (o aumento da intensidade das bandas se deve à evaporação de parte do solvente e concentração da solução). Esta estabilidade é interessante também do ponto de vista biológico. Quando o parasita *Trypanosoma cruzi* entra na corrente sanguínea, é fagocitado por macrófagos, células de defesa. O macrófago então utiliza um vacúolo parasitóforo, englobando o parasita para destruí-lo. Como resposta, o parasita sintetiza grandes quantidades de oxigênio molecular para romper o vacúolo digestivo e sobreviver dentro da célula hospedeira (TEIXEIRA et al., 2011). Dado que essa é uma etapa crucial para a diferenciação em amastigota e replicação do parasita, é interessante que a droga se mantenha íntegra dentro da célula hospedeira, mesmo num ambiente de stress oxidativo.

A seguir, escolheu-se o complexo **2** como representativo da série e estudou-se a estabilidade deste em uma solução de acetonitrila, armazenada em vial fechado durante o período de 28 dias. A análise dos espectros indica que não houve alteração da estrutura, seja por degradação ou coordenação do solvente.

Figura 56. Estabilidade do complexo **2** em solução de acetonitrila em solução de ACN por 28 dias.

Fonte própria.

4.5. Interação dos ligantes e complexos com *fsDNA*: Deslocamento de brometo de etídio (EB) por fluorescência

Este experimento é uma das várias técnicas utilizadas para estudar as interações intermoleculares entre a macromolécula de DNA e um analito - por exemplo, um fármaco, proteína, sensor ou uma toxina. A análise consiste em titular uma solução contendo uma mistura de DNA e brometo de etídio com o analito em questão. O EB funciona como uma sonda, sendo um método de análise indireta da interação de uma droga com o DNA. Este método foi proposto pela primeira vez em 1979 por Morgan e colaboradores (MORGAN et al., 1979) e é usado em trabalhos desde então, especialmente para complexos que não são fluorescentes, como é o caso dos acetatos trinucleares de rutênio (KELLETT et al., 2019).

A molécula de brometo de etídio tem uma estrutura que garante uma forte intercalação desta no meio dos pares de bases do DNA, devido à presença de anéis aromáticos conjugados: a constante de intercalação aparente comumente adotada tem ordem de grandeza de 10^7 M^{-1} (ICSEL et al., 2013b; PRAVIN et al., 2016). Devido a isso e ao fato de ser fluorescente quando interage com o DNA, o EB é utilizado largamente em análises de biologia molecular, em géis, como revelador de bandas, logo após processos de clivagem ou replicação de genes.

Figura 57. Estrutura do brometo de etídio.

Fonte própria.

O interior da macromolécula de DNA, que é formado pelas bases nitrogenadas pareadas entre si (entre purinas e pirimidinas) oferece um ambiente hidrofóbico, ou seja, sem moléculas de água solvatando esta organização interna. Além das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, as interações π entre anéis aromáticos é também a responsável por manter íntegra a estrutura helicoidal do DNA (FENG et al.,

2019). Desta maneira, quando o brometo de etídio está intercalado, a intensidade de sua fluorescência é magnificada, e uma luz laranja (~605 nm) é emitida quando excitado no UV ou no verde (~526 nm). Quando este é deslocado do meio do DNA para a solução, sua fluorescência é suprimida por de solventes polares (água, neste caso) (GAUR et al., 2019), e é este o princípio da técnica. Através da supressão de fluorescência é possível observar a troca de moléculas de EB por moléculas de complexo no espaço entre os pares de bases. Vale lembrar que esta análise não é gene-específica, podendo os intercaladores atingir quaisquer sítios sem preferência por uma dada sequência – a menos que um ligante auxiliar ou um enantiômero puro seja usado como direcionador específico para uma sequência de bases poli-AT ou poli-CG (KELLETT et al., 2019), que não é o caso; por isso, o sequenciamento exato dos pares de bases do DNA de esperma de peixe - ou mesmo da fonte alternativa de dsDNA (*double-stranded DNA*, ou DNA de fita dupla) comumente adotada, de timo de bezerro (*calf thymus DNA*, ctDNA) - não é necessário.

Espera-se, de antemão, que a constante aparente de interação (K_{app} , que leva este nome por ser uma medida indireta da magnitude de interação DNA-complexo) aumente conforme aumenta-se o tamanho do ligante fenazínico coordenado ao complexo trinuclear, uma vez que moléculas são tão melhores agentes intercaladores quanto maior for sua extensão da conjugação π . E de fato, a tendência observada seguiu a hipótese, conforme os espectros mostrados e os valores tabelados a seguir (as curvas se encontram no Anexo, figura 67).

Figura 58. Espectros de fluorescência do brometo de etídio em DNA em concentrações crescentes dos complexos 1-5 (A-E) (uma replicata de cada está mostrada). F) Espectro de emissão do brometo de etídio em solução na ausência (vermelho) e na presença (azul) de DNA.

Fonte própria.

Tabela 8. Valores de [Q] médio observados e K_{app} médio calculados para os complexos 1-5.

Composto	[Q] médio* / μM	K_{app} médio* / $\text{M}^{-1} \times 10^6$
Complexo 1, dppn	1,90	52,6
Complexo 2, dppz	21,46	4,66
Complexo 3, dppzCH ₃	19,03	5,25
Complexo 4, dppzCl	17,00	5,88
Complexo 5, phen	--	--

*Os valores de [Q] e K_{app} médio foram obtidos por média aritmética simples de dois experimentos independentes.

Fonte própria.

O complexo com fenantrolina (phen, 5) não foi capaz de suprimir a fluorescência inicial do aduto *fs*DNA-EB pela metade, nas condições experimentais, e

assim não se calculou nenhuma constante para este. Isto – ou, pelo menos, que suas constantes fossem menores – era esperado, uma vez que este é o complexo com o menor ligante da série. Ainda assim, o complexo **5** foi capaz de deslocar a molécula de EB, visto que houve certa supressão de fluorescência. Na verdade, a literatura trata complexos mononucleares de rutênio-fenantrolina ou bipyridina não como intercaladores, mas como sendo *groove binders* - moléculas que interagem com os sulcos externos do DNA. Os sulcos são resultantes da estrutura helicoidal do DNA, sendo divididos em sulco maior e sulco menor. Por causa desta estrutura retorcida, o DNA pode assumir três conformações (encontradas naturalmente e biologicamente ativas): o DNA-A é uma conformação onde os planos dos pares de base apresentam um ângulo maior em relação ao eixo de rotação central, e os sulcos maiores são mais profundos e estreitos. O DNA-B, descrito por Rosalind Franklin, o mais abundante nas células, é ligeiramente mais alongado e suas bases estão quase perpendiculares ao eixo de rotação central. Ambos A- e B-DNA são dextrógiros. Já o Z-DNA é uma conformação levógira, e os sulcos maiores e menores são praticamente do mesmo tamanho (FENG et al., 2019; KELLETT et al., 2019).

Figura 59. Três conformações possíveis para a molécula de DNA.

Fonte: Reprodução direta de KELLETT et al., 2019.

Como o ligante phen é pequeno (assim como a bipyridina, bipy) e somente a parte planar do ligante é intercaladora (de maneira a evitar impedimento estérico do

restante do complexo com o DNA) ele age preferencialmente nos sulcos, sendo então um *groove binder*.

Conforme se aumenta o tamanho do ligante coordenado, as constantes tendem a aumentar: dentro da série das dipiridofenazinas, todos foram capazes de suprimir 50% da intensidade inicial. Observa-se que quando o grupo ligado ao anel é um hidrogênio (dppz), a constante é ligeiramente menor do que as moléculas que possuem um grupo substituinte metila (dppzCH₃) ou cloro (dppzCl) no carbono 9 (numeração da figura 18). Pensando que o processo de intercalação ocorre por meio do empilhamento entre os anéis aromáticos das moléculas (bases nitrogenadas e ligantes fenazínicos), as interações parecem ser mais favoráveis quando se tem um grupo substituinte diferente do hidrogênio. Porém a inserção de mais de um grupo substituinte pode causar uma diminuição na constante de intercalação, devido a impedimento estérico no processo de reconhecimento entre DNA e complexo. Na literatura, em complexos rutênio-areno com dppz-R₁R₂, aquele onde R₁ = R₂ = H teve uma constante maior ($7,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) do que quando os grupos R são CH₃ ($5,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), evidenciando que a substituição precisa ocorrer em posições específicas dos anéis e em quantidade adequada (GANESHPANDIAN et al., 2018). Neste mesmo trabalho, os autores discutem que a inserção de dois grupos metila na estrutura da phen aumenta a constante de interação (de 0,9 para $2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$); isso porque os grupos metila podem assistir interações hidrofóbicas com os sulcos do DNA, sendo mais uma evidência de que este é o modo de interação DNA-phen. Também é necessário algum grau de desnaturação da molécula de DNA antes da intercalação, para que as bases fiquem expostas o suficiente para interação com o composto. Assim, pode-se inferir que uma substituição de um hidrogênio por cloro ou metila acarretam em maiores magnitudes de forças atrativas - neste caso, as interações fracas de van der Waals, o que justificaria valores ligeiramente maiores nas constantes dos complexos 3 e 4 em relação à do complexo 2.

Era mesmo esperado que o complexo com o ligante benzodipiridofenazina (dppn) tivesse o maior valor para a constante de interação com o DNA. O que surpreende é que este valor foi mais do que dez vezes maior do que todos os outros complexos da série ($5,26 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), e até mesmo mais de cinco vezes maior do que o próprio brometo de etídio, sendo o único que atingiu a ordem de grandeza de 10^7 M^{-1} , precisando de menos de 2 μM para atingir 50% da fluorescência inicial. A adição de mais um anel aromático conjugado na estrutura proporcionou um aumento

considerável em sua capacidade intercalante, mais até do que a troca de um hidrogênio por substituintes, como os complexos com cloro e metila. Essas observações estão de acordo com um outro método de avaliação de interação dos complexos com DNA, a viscosimetria, que segue a mesma tendência (DA SILVA, 2019a).

Como os complexos possuem carga +1, poder-se-ia esperar algum tipo de interação eletrostática com o esqueleto de fosfato do DNA, de carga residual negativa. Entretanto essa possibilidade foi desconsiderada, já que no meio havia cátions Na^+ em concentração pelo menos 50 vezes acima das de complexos, estando os grupos fosfatos contrabalanceados com íons sódio. Além disso, a carga +1 dos clusters trinucleares é menor e mais dispersa do que as cargas +2 e +3 de complexos mononucleares. É válido mencionar que os complexos ortometalados **1-5** não são luminescentes, além de não suprimirem diretamente a emissão do aduto EB-DNA, devido ao tempo de vida muito curto do estado excitado (escala de picossegundos) (DA SILVA et al., 2020). Também se considerou que o aumento de volume na cubeta, devido à adição de alíquotas de complexos, foi desprezível (um incremento de ~30 μL), e a supressão de fluorescência não foi devida à diluição do aduto.

A comparação desta série de complexos deste trabalho (ligantes fenazínicos) com uma outra série de complexos trinucleares simétricos, agora com ligantes azanaftalenos, reforça a ideia de que a extensão dos anéis π -conjugados aumenta a constante de interação aparente (K_{app}), e de maneira mais pronunciada do que a inserção de substituintes. Para a série de complexos com azanaftalenos, a ordem de grandeza da constante atinge no máximo 10^5 M^{-1} : em especial, o complexo com ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (thiq) não conseguiu suprimir metade da fluorescência inicial, assim como o complexo com ligante phen (**5**). No caso do primeiro, a saturação do anel substituinte acarreta em perda da rigidez estrutural, dificultando a intercalação (POSSATO et al., 2020). De maneira geral, os complexos **1-4** tiveram uma ordem de grandeza de K_{app} de 10^6 M^{-1} , um valor aceito pela literatura como intercaladores fortes (ERYAZICI et al., 2008; ICSEL et al., 2013c) e ordem geral foi **1** > **4** > **3** > **2** > **5**. Assim, não resta dúvidas de que estes complexos, e em especial o complexo **1**, são excelentes metalointercaladores.

4.6. Avaliação da atividade tripanocida dos complexos 2-5

O uso de compostos de coordenação como candidatos a metalofármacos antiparasitários vem crescendo nos últimos anos. A premissa empregada é a de que a coordenação de um ligante orgânico (ativo biologicamente ou não) a um centro metálico cause efeitos sinérgicos de modo a potencializar a atividade biológica da droga.

Foram estudadas duas formas celulares de *Trypanosoma cruzi*, a amastigota e a epimastigota. A primeira é uma forma intracelular obrigatória, ou seja, sempre encontrada no interior da célula hospedeira, utilizando um metabolismo cooperativo com esta. É também a forma altamente replicativa do parasita e a mais abundante na fase crônica. A segunda é uma forma presente não no hospedeiro, mas sim no intestino no inseto triatomíneo vetor (barbeiro); apesar disso, ela foi escolhida como uma maneira de explorar a toxicidade **direta** no parasita, pois é uma forma celular livre. Assim, o ensaio com epimastigotas garante que a atividade tripanocida é devido à morte do parasita, não estando atrelado à morte da célula hospedeira. Morfologicamente, a forma epimastigota se assemelha à tripomastigota, já que ambas possuem flagelo que auxiliam na locomoção.

Um trabalho publicado por Oliveira, 2014 traça algumas similaridades entre câncer e infecções parasitárias. Por exemplo, ambas possuem mecanismo próprio de sinalização celular, e ambos os casos são muito susceptíveis a alterações epigenéticas (regulação transcricional por metilação do DNA ou alteração de histonas). Por isso, algumas drogas anticâncer têm se mostrado promissoras no tratamento de parasitoses, e o inverso também é verdadeiro (OLIVEIRA, 2014). Os complexos de **1** a **5** já foram explorados enquanto candidatos a metalofármacos para câncer (melanoma), com ótimos resultados - por exemplo, os complexos **2** e **4** conseguiram reduzir para menos de 50% a viabilidade celular de células cancerosas B16F10 numa concentração em torno de 2 μ M, com alta seletividade, e os ligantes foram bem menos ativos (DA SILVA, 2019a). Isso motivou a exploração dos clusters ortometalados em relação à atividade antiparasitária.

A figura a seguir mostra os dados referentes à atividade contra formas amastigotas e células saudáveis.

Figura 60. **A)** Comparação entre Concentração Citotóxica (CC_{50}) para células saudáveis (LLC-MK2) e Concentração Inibitória (IC_{50}) para formas amastigotas, do complexo 2 e seu ligante. **B)** Citotoxicidade para células saudáveis LLC-MK2 para o complexo 2 e seu ligante em diferentes concentrações. **C)** Atividade tripanocida para amastigotas para o complexo 2 e seu ligante, em diferentes concentrações. Controle = poços onde nenhum composto foi aplicado. L = ligante e C = complexo.

Fonte própria.

O gráfico em **A)** mostra, juntas, a Concentração Citotóxica (CC_{50}) - a concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade das células saudáveis LLC-MK2 (azul) - e a Concentração Inibitória (IC_{50}), a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% dos parasitas amastigotas (roxo), para o complexo 2 e seu

ligante (dppz), escolhidos como representantes da série (os demais gráficos referentes aos complexos **3-5** encontram-se em anexo). Os dados foram plotados juntos porque esta é uma forma de demonstrar que o composto foi mais ativo contra o parasita do que foi tóxico para a célula saudável – e essa foi a mesma tendência para o ligante livre. Os dados em **B)** e **C)** mostram, respectivamente, uma relação entre dose e resposta para a citotoxicidade em células saudáveis e atividade tripanocida (amastigota) do complexo **2** e seu ligante. A faixa de concentrações usada nos ensaios, para todos os compostos, foi de 10 a 0,078 μM , o que é uma escala não usual de diluição. Esta foi adotada, *a priori*, com o intuito de evitar precipitação (observou-se no microscópio eletrônico se havia presença de cristais de compostos nos poços de cultura), mas que incrivelmente mostrou-se ativa mesmo numa faixa sub-micromolar, para todos os complexos. Observa-se que já numa concentração próxima de 0,30 μM , o complexo **2** foi capaz de reduzir em aproximadamente 80% a população de parasitas na célula hospedeira, ao passo que, neste mesmo ponto, a redução de células saudáveis atingiu pouco mais de 20%. Em todos os complexos e até mesmo para os ligantes, os valores de IC_{50} foram menores do que os da droga de referência, benznidazol. A tabela a seguir sumariza as concentrações (em micromol por litro) de todos os complexos para a forma amastigota.

Tabela 9. Valores ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de CC_{50} para células saudáveis LLC-MK2 e IC_{50} para amastigotas, obtidos por três experimentos independentes, médias dos valores com desvio padrão e índice de seletividade dos complexos **2-5**, seus ligantes e benznidazol.

	LLC-MK2/ μM			Média CC_{50} $\pm$ DP	Amastigotas/ μM			Média $\text{IC}_{50} \pm$ DP	IS $\text{CC}_{50}/$ IC_{50}
Complexo 2	1,42	3,17	2,74	$2,44 \pm 0,91$	0,282	0,230	0,235	$0,249 \pm 0,03$	9,80
Complexo 3	0,943	3,98	1,75	$2,22 \pm 1,57$	0,305	0,288	0,241	$0,278 \pm 0,03$	8,00
Complexo 4	0,454	3,62	1,66	$1,91 \pm 1,60$	0,225	0,231	0,174	$0,210 \pm 0,03$	9,11
Complexo 5	7,23	>10	> 10	$9,08 \pm 1,60$	2,23	1,39	1,45	$1,69 \pm 0,47$	4,28
Dppz	6,50	3,94	4,41	$4,95 \pm 1,37$	0,573	0,867	0,509	$0,650 \pm 0,19$	7,62
DppzCH ₃	5,93	4,71	4,82	$5,15 \pm 0,67$	0,663	0,593	0,561	$0,606 \pm 0,05$	8,51
DppzCl	>10	>10	> 10	> 10	1,75	2,50	1,20	$1,81 \pm 0,65$	> 5,52
Phen	4,64	2,84	4,39	$3,96 \pm 0,97$	1,88	1,96	1,46	$1,76 \pm 0,27$	2,24
BZ	>100	>100	> 100	> 100	6,55	4,98	5,71	$5,74 \pm 0,78$	> 17,4

DP: desvio-padrão; IS: índice de seletividade; CC_{50} : Concentração Citotóxica; IC_{50} : Concentração Inibitória; BZ: benznidazol.

Fonte própria.

Outro fato interessante e, de certa forma, surpreendente, foi que os ligantes livres foram quase tão ativos quanto os complexos. Mesmo assim, em todos os casos, os valores de IC_{50} foram menores para os complexos, indicando que a coordenação é de fato benéfica. A efeito de comparação, a atividade tripanocida do complexo precursor (**1**), “cluster-mãe”, já foi estudada em amastigotas e tripomastigotas, sendo ineficaz, tendo valor de IC_{50} de mais de 300 μM em ambas as formas e um Índice de Seletividade menor que 1 (POSSATO et al., 2017a). Isso demonstra que os complexos não são meros carreadores de ligantes-fármacos e sim que os compostos de coordenação como um todo são as espécies ativas.

Já em relação à citotoxicidade em células saudáveis, que é representada pelo valor de CC_{50} , muda-se o raciocínio: em quase todos os casos, os complexos foram

mais citotóxicos do que os ligantes, a exceção sendo o complexo **5**. Porém, estes valores não devem ser vistos isoladamente como magnitudes independentes, porque podem levar à interpretação de que, sendo tóxicos, são automaticamente inviáveis para uso. Uma maneira de se avaliar a relação de efeito benéfico/prejudicial de um composto testado *in vitro* é através do Índice de Seletividade (IS), que é uma relação entre a Concentração Citotóxica (CC₅₀) e a Concentração Inibitória (IC₅₀). Pela tabela, pode-se ver que quase todos os complexos tiveram IS maior que seus respectivos ligantes livres, a exceção sendo o complexo **3**. Vê-se aqui um outro indício de que, a despeito da citotoxicidade em doses mais altas, a coordenação a um centro metálico melhorou este outro parâmetro das drogas estudadas. A OMS recomenda que, para uma droga destinada a Doenças Negligenciadas ser aprovada para testes *in vivo*, seu IS seja de, no mínimo, 10 (CHATELAIN, 2015). Um exemplo de complexo trinuclear que atingiu excelente valor de IS foi o cluster [Ru₃O(CH₃COO)₆(thiq)₃]PF₆, thiq = 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina, com IS de mais de 200 (POSSATO et al., 2017a); Embora os compostos não tenham atingido este número, os complexos **2** e **4** (e o ligante dppzCH₃) são os que mais se aproximaram. E, apesar da eficiência da droga não ser avaliada apenas pelos números isolados, o fato dos complexos e ligantes mostrarem uma alta atividade na escala sub-micromolar é algo por si só muito interessante.

Numa comparação interna dentro da série, a ordem geral de IC₅₀ para amastigotas foi **4** > **2** > **3** > **5**, sendo que os valores dos três primeiros foram, em média, o dobro do valor do complexo **5**. O complexo contendo a fenantrolina foi o menos eficaz também no ensaio contra melanoma, e também no câncer os complexos **2** e **4** foram os mais ativos (DA SILVA, 2019a). Isso aponta que tanto o tamanho do ligante fenazínico como o perfil de substituições podem impactar na atividade biológica, nestes casos em particular, positivamente quando se passa da fenantrolina para as dipiridofenazinas. De fato, a literatura demonstra que estruturas poliaromáticas conjugadas e um perfil de substituição (a metilação e halogenação, por exemplo) podem melhorar a atividade de uma droga (BARREIRO et al., 2011; SALSI et al., 2018).

A seguir, será discutida a atividade contra a forma epimastigota. O gráfico a seguir mostra uma das replicatas para a atividade contra esta forma, e os valores de IC₅₀ das três replicatas, incluindo a média, estão sumarizados na tabela. A faixa de concentrações foi a mesma para a anterior.

Figura 61. Gráfico de dose-resposta dos complexos 2-5 e ligantes livres para a forma epimastigota (uma replicata). (C= complexo; L = ligante).

Fonte própria.

Tabela 10. Valores de IC₅₀, obtidos por três experimentos independentes, para os complexos 2-5, seus ligantes e benznidazol, e média com desvio-padrão, para a forma epimastigota.

	Epimastigota/μM			Média ± DP
Complexo 2	1,36	1,06	1,16	1,19 ± 0,13
Complexo 3	1,80	1,83	2,58	2,07 ± 0,36
Complexo 4	1,38	1,31	2,33	1,67 ± 0,46
Complexo 5	1,51	2,30	4,14	2,65 ± 1,10
Dppz	1,16	6,01	4,89	4,02 ± 2,07
DppzCH ₃	1,06	2,98	3,91	2,65 ± 1,19
DppzCl	0,531	0,581	0,651	0,59 ± 0,05
Phen	4,76	9,49	7,77	7,34 ± 1,95
BZ	20,2	21,4	22,5	21,4 ± 0,94

Fonte própria.

Como a forma epimastigota é uma forma independente de célula hospedeira, não se calcula valores de IS para esta, sendo analisado diretamente o valor de IC₅₀. Semelhante à forma amastigota, os compostos (ligantes e complexos) continuaram mostrando valores de toxicidade na escala sub-micromolar, inclusive menores do que o benznidazol. Juntando esta informação com os valores de IS, obtidos para amastigotas, conclui-se que de fato existe uma atividade biológica contra o **parasita**, e sua eliminação não se dá apenas pela morte da célula hospedeira. A ordem geral de atividade antiparasitária nesta forma foi **2 > 4 > 3 > 5**. Novamente, o complexo 5

aparece como o menos ativo da série também para epimastigota, reforçando a sugestão de que ligantes com estrutura π estendida são melhores para a atividade biológica – e esta parece ser mais significativa do que a substituição nos carbonos do dppz.

Em relação à ordem observada para a grandeza das constantes de intercalação com DNA ($1 > 4 > 3 > 2 > 5$), não parece haver correlação entre esta e a toxicidade para ambas as formas. Embora não seja possível, ainda, afirmar qual o mecanismo exato de ação da droga, é possível observar que os ligantes maiores (dipiridofenazinas) têm uma atividade mais intensa do que aqueles com fenantrolina, como na intercalação com DNA. Trabalhos do grupo, com clusters trinucleares, mostram que nem sempre a ordem de grandeza das constantes de interação com DNA segue a tendência da atividade biológica, tanto para câncer quanto para *T. cruzi* (DA SILVA, 2019b; POSSATO et al., 2017a, 2020); aqui, embora infelizmente o complexo **1** não foi pôde ser testado, o aumento do ligante está relacionado com aumento da atividade, variando ligeiramente com o perfil de substituição.

Comparando os complexos e ligantes, o mesmo observado para a amastigota se repete aqui: os complexos continuam sendo mais ativos do que os ligantes; agora, porém, com exceção do complexo **4** (o ligante dppzCl foi mais ativo). É importante mencionar que não há relatos na literatura da atividade dos ligantes fenazínicos livres; este é o primeiro. Por isso, a comparação da atividade dos ligantes com outros trabalhos não é possível. Ainda assim, a literatura de metalodrogas antiparasitárias, algumas inclusive envolvendo os ligantes deste trabalho, vem crescendo. Gambino e colaboradores estudaram alguns complexos de vanadila (VO^{2+}) contendo o ligante fenantrolina e ligantes semicarbazonas (L), de fórmula $[V^{IV}O(L)(phen)]$, contra a forma epimastigota (BENÍTEZ et al., 2013), e os valores de IC_{50} variaram de 1,6 a 3,8 μM (BENÍTEZ et al., 2011). Já para um complexo de vanadila com dppz, os valores de IC_{50} variam de 13 a 19 μM , em comparação com complexos vanadila com ligante bipyridina que tiveram valores maiores que 70 μM – o que reforça a importância da conjugação de anéis na atividade. Apesar de promissores, nenhum destes complexos foi mais eficaz que o Nifurtimox testado (BENÍTEZ et al., 2009b). Existem também complexos de outros metais ou semimetals, como Pd, Ag, Au, Sb e Cu que, num artigo de revisão recente, mostraram-se eficazes contra parasitas do gênero *Trypanosoma* (*T. cruzi* e *T. brucei*, uma espécie de parasita endêmica na África que causa doenças neurológicas) (NAVARRO et al., 2010). Alguns trabalhos também trazem uma

discussão de que algumas proteínas importantes para o desenvolvimento do parasita (como a cruzipaina e falcipaina) são expressas em todas as fases principais (tripomastigota, amastigota e epimastigota) (DE FREITAS et al., 2006; NAVARRO et al., 2010). Visto que os complexos **1-5** apresentaram uma forte interação com a albumina, uma proteína sérica (DA SILVA, 2019a), trabalhos futuros visarão explorar a interação destes complexos com as proteínas citadas, pois assim pode-se determinar o mecanismo de ação da droga: se os compostos forem ativos nas três formas, é um indicativo de que estas proteínas estejam envolvidas na resposta citotóxica.

A forma amastigota é dita como a forma predominante na fase crônica da doença de Chagas, pois pode ficar em período de latência dentro da célula hospedeira, sem sofrer com resposta imune do corpo ou mesmo às drogas de tratamento (SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018). Considerando que ambos complexos e ligantes tiveram atividade em doses bastante baixas, inclusive na forma amastigota, pode-se considerar os complexos **2-5** como bons candidatos a metalofármacos antiparasitários – em especial, os complexos **2** e **4** que apresentaram um Índice de Seletividade (IS) muito próximo àquele recomendado pela OMS.

5. Conclusões

Um novo complexo de rutênio, ortometalado, combinado a ligantes 4-picolina e dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz), inédito, foi sintetizado e caracterizado. As técnicas de caracterização confirmaram sua estrutura, sobretudo a espectrometria de massas que mostra um pico em m/z 1082,9751 no espectro de ESI-MS⁺, relativo ao íon [**1** – PF₆⁻]. O ligante dppz não apresentou propriedades de empilhamento π em solução conforme monitorado pelas técnicas de absorção e emissão no UV-Vis. A análise de seus espectros aponta para contribuição de bandas de natureza $\pi^* \leftarrow n$ centradas na porção diaza da molécula, indicando alguma propriedade solvatocrômica, havendo boa separação entre os grupos de solventes (álcoois, halogenados e aromáticos). Apesar das tentativas de purificação, o complexo inédito não foi obtido em pureza suficiente para prosseguir às etapas de avaliações biológicas, possivelmente devido à degradação *in situ* em coluna cromatográfica. Também o complexo **2** não apresentou a formação de agregados em solução, conforme observado pela técnica de absorção no UV-Vis-NIR. Este mostrou-se estável em solução de acetonitrila por um período de 28 dias. A reatividade dos complexos **1-5** foi avaliada frente a um borbulhamento de oxigênio molecular e nenhuma degradação foi observada. Estes complexos mostraram-se bons intercaladores de DNA pela técnica de deslocamento de sonda fluorescente, e os valores de constantes seguiram a ordem **1** > **4** > **3** > **2** > **5**, com ordens de grandeza de 10⁶ M⁻¹ para os complexos **2-4** e 10⁷ M⁻¹ para o complexo **1**. O complexo **5** mostrou-se como um *groove binder* ao invés de um intercalador. Os complexos **2-5** apresentaram valores de IC₅₀ contra as duas formas de *T. cruzi* (amastigota e epimastigota) em escala sub-micromolar, menores inclusive do que a droga de referência, benznidazol. Os ligantes tiveram valores baixos de IC₅₀, mas com exceção de um único caso, os complexos foram mais ativos, e seus índices de seletividade, maiores. A ordem de atividade antiparasitária foi de **4** ~ **2** > **3** > **5** nas duas formas celulares, e seguiu a tendência para atividade anticâncer anteriormente explorada. A ordem de interação com o DNA não segue fielmente a ordem de toxicidade para formas de *T. cruzi*, indicando que o DNA pode não ser uma molécula-alvo no mecanismo de ação; apesar disso, é possível concluir que o aumento do número de anéis aromáticos na estrutura do ligante, passando da fenantrolina para as dipiridofenazinas, foi impactante na atividade tripanocida.

6. Perspectivas futuras

Este trabalho mostrou a síntese e caracterização de um novo complexo ortometalado de rutênio. Sua rota sintética convencional e purificação é de difícil obtenção, e por isso, uma questão que se abre é pensar rotas alternativas de síntese destes complexos, explorando-se mais a fundo condições experimentais pra otimizar estes processos. Tendo em vista os resultados de atividade biológica contra *T. cruzi*, o próximo caminho envolve um estudo mais detalhado destes complexos e ligantes (ou análogos estruturais) em relação à estrutura-atividade, explorando outras variáveis como interação com proteínas biologicamente importantes (como a cruzipaina) e internalização celular dos compostos. Pensando em modulação do índice de seletividade, sugestões como alteração da estrutura ou entrega dirigida do fármaco (como encapsulação por nanopartículas) podem ser adotadas. Dado que os complexos **1-4** se mostraram excelentes metalintercaladores, a perspectiva é que estes ou análogos continuem sendo usados para este propósito em trabalhos futuros, a fim de se investigar interações entre metalodrogas-biomoléculas.

7. Referências

- AITKEN, J. B.; ANTONY, S.; WEEKLEY, C. M.; LAI, B.; SPICCIA, L.; HARRIS, H. H. Distinct cellular fates for KP1019 and NAMI-A determined by X-ray fluorescence imaging of single cells. *Metalomics*, v. **4**, 1051–1056, 2012.
- ALESSIO, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. **2017**, 1549–1560, 2017.
- ALEXIOU, A. D. P. Síntese, Caracterização e Reatividade de Clusters Trigonais de Acetato de Rutênio. Tese de Doutorado, 1993, Universidade de São Paulo.
- ALEXIOU, A. D. P.; DOVIDAUSKAS, S. Propriedades E Aplicações De Clusters Trinucleares De Carboxilatos De Rutênio. *Química Nova*, v. **2**, 785–793, 2000.
- AROUNAGUIRI, S.; DATTA GUPTA, A.; MAIYA, B. G. Redox-activated luminescence and light-induced nuclease activity of a new mixed-ligand ruthenium (II) complex. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences*, v. **109**, 155–158, 1997.
- BARREIRO, E. J. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. *ArtMed*, 2. ed., Porto Alegre, 2008.
- BARREIRO, E. J.; ARTHUR, E. K. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*, v. **111**, 2011, 5215–5246.
- BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chemical Communications*, v. **49**, 2013, 5106–5131.
- BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure and Applied Chemistry*, 2014, v. **86**, 1897–1910.
- BAUMANN, J. A.; SALMON, D. J.; WILSON, S. T.; MEYER, T. J.; HATFIELD, W. E. Electronic Structure and Redox Properties of the Clusters $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_6\text{L}_3]^{n+}$. *Inorganic Chemistry*, 1978, v. **17**, 3342–3350.
- BAYMAK, M. S.; ZUMAN, P. Equilibria of formation and dehydration of the carbinolamine intermediate in the reaction of benzaldehyde with hydrazine. *Tetrahedron*, v. **63**, 2007, 5450–5454.
- BENÍTEZ, J.; BECCO, L.; CORREIA, I.; LEAL, S. M.; GUISET, H.; PESSOA, J. C.; LORENZO, J.; TANCO, S.; ESCOBAR, P.; MORENO, V.; GARAT, B.; GAMBINO, D. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, v. **105**, 303–312.
- BENÍTEZ, J.; CAVALCANTI DE QUEIROZ, A.; CORREIA, I.; ALVES, M. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; VARELA, J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; MORENO, V.; PESSOA, J. C.; GAMBINO, D. New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, v. **62**, 20–27.
- BENÍTEZ, J.; GUGGERI, L.; TOMAZ, I.; ARRAMBIDE, G.; NAVARRO, M.; COSTA PESSOA, J.; GARAT, B.; GAMBINO, D. Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, v. **103**, 609–616.
- BENÍTEZ, J.; GUGGERI, L.; TOMAZ, I.; PESSOA, J. C.; MORENO, V.; LORENZO, J.; AVILÉS, F. X.; GARAT, B.; GAMBINO, D. A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, v. **103**, 1386–1394.
- BERGAMO, A.; SAVA, G. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chemical Society Reviews*, 2015, v. **44**, 8818–8835.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; DANTAS, R. O.; MAGUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. V.; GILMAN, R. H.; REYES,

- P. A.; SALVATELLA, R.; MOORE, A. C. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: A systematic review. *Journal of the American Medical Association*, v. **298**, 2171–2181.
- BRABEC, V.; HRABINA, O.; KASPARKOVA, J. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, v. **351**, 2–31.
- BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, v. **376**, 75-94.
- BRAGA, G.; APARICIO, J. L.; VILSINSKI, B. H.; TESSARO, A. L.; GEROLA, A. P.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Autoagregação da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (tmpp): Estudos espectroscópicos e análises multivariadas. *Química Nova*, 2014, v. **37**, 648–652.
- BRAHMA, R.; SINGH, M. P.; BARUAH, J. B. Stacking among the clips of the poly-aromatic rings of phenazine with hydroxy-aromatics and photophysical properties. *RSC Advances*, 2019, v. **9**, 33403–33412.
- BRAZ, D. M. G.; SOUZA, S.; JUNIOR, R. S. D. B.; PAULA, A. B. D. L.; SALVIATO, R.; EDUARDO, V.; HIDEKI, R.; CESAR, G.; GUSTAVO, A. O. S.; DEMETS, G. J. Assessment of the electronic structure of a triruthenium acetate- pyridyl-naphthalimide cluster. *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*, 2020, v. **391**, 112361-112370.
- BRUCE, P. Y. Organic Chemistry. *Pearson Education*, 8. ed. Santa Barbara, 2016.
- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L. M. J.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, v. **40**, 2592–2597.
- BURGOYNE, A. R.; KASCHULA, C. H.; PARKER, M. I.; SMITH, G. S. In vitro Cytotoxicity of Half-Sandwich Platinum Group Metal Complexes of a Cationic Alkylated Phosphaadamantane Ligand. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, v. **2016**, 1267–1273.
- BUTSCH, K.; GUST, R.; KLEIN, A.; OTT, I.; ROMANSKI, M. Tuning the electronic properties of dppz-ligands and their palladium(II) complexes. *Dalton Transactions* 2010, v. **39**, 4331–4340.
- CACITA, N.; POSSATO, B.; DA SILVA, C. F. N.; PAULO, M.; FORMIGA, A. L. B.; BENDHACK, L. M.; NIKOLAOU, S. Investigation of a novel trinuclear μ -oxo ruthenium complex as a potential nitric oxide releaser for biological purposes. *Inorganica Chimica Acta*, 2015, v. **429**, 114–121.
- CARDIN, C. J.; KELLY, J. M.; QUINN, S. J. Photochemically active DNA-intercalating ruthenium and related complexes-insights by combining crystallography and transient spectroscopy. *Chemical Science*, 2017, v. **8**, 4705–4723.
- CASTELLANO, M.; RUIZ-GARCÍA, R.; CANO, J.; FERRANDO-SORIA, J.; PARDO, E.; FORTEA-PÉREZ, F. R.; STIRIBA, S. E.; JULVE, M.; LLORET, F. Dicopper(II) Metallocyclophanes as Multifunctional Magnetic Devices: A Joint Experimental and Computational Study. *Accounts of Chemical Research*, 2015, v. **48**, 510–520.
- CATALÁN, J.; LÓPEZ, V.; PÉREZ, P.; MARTIN-VILLAMIL, R.; RODRÍGUEZ, J. -G. Progress towards a generalized solvent polarity scale: The solvatochromism of 2-(dimethylamino)-7-nitrofluorene and its homomorph 2-fluoro-7-nitrofluorene. *Liebigs Annalen*, 1995, v. **1995**, 241–252.
- CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*, 2015, v. **20**, 22–35.
- CHEN, J. L.; ZHANG, X. D.; ZHANG, L. Y.; SHI, L. X.; CHEN, Z. N. Syntheses and characterization of oxo-centered triruthenium compounds with orthometalated bipyridine. *Inorganic Chemistry*, 2005, v. **44**, 1037–1043.
- CHEN, Z.-N.; DAI, F.-R. Oxo-Centered Triruthenium-Acetate Cluster Complexes Derived from Axial or Bridging Ligand. *Controlled Assembly and Modification of Inorganic Systems*, 2009, v. **44**, 93-120.

CHEN, Z.; LOHR, A.; SAHA-MÖLLER, C. R.; WÜRTNER, F. Self-assembled π -stacks of functional dyes in solution: Structural and thermodynamic features. *Chemical Society Reviews*, 2009, v. **38**, 564–584.

CIACCIA, M.; STEFANO, D. S. Mechanisms of Imine Exchange Reactions in Organic Solvents. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2014, v. **13**, 646–654.

COATES, C. J.; DECKER, H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, v. **74**, 293–317.

COCKERTON, B. R.; DEEMING, A. J. A diruthenium complex containing an ortho-metallated bipyridyl ligand formed directly from $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ and pyridine. *Journal of Organometallic Chemistry*, 1992, v. **426**, 92–95.

CORREA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; DE LOLO, F. G.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; PLUTIN, A. M.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A. Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'-(disubstituted)thiourea ligands: Synthesis, characterization, BSA- and DNA-binding studies of new cytotoxic agents against lung and prostate tumour cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, v. **150**, 63–71.

COTTON, F. A. Applications of Group Theory. Department of Chemistry, Texas A&M University, 3. ed. Texas, 1990.

COTTON, F. A.; HARRIS, C. B. The Crystal and Molecular Structure of Dipotassium Octachlorodirhenate(III) Dihydrate, $\text{K}_2[\text{Re}_2\text{Cl}_8] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Inorganic Chemistry*, 1965, v. **4**, 330–333.

COTTON, F. A.; NORMAN, J. G. Structural Characterization of a Basic Trinuclear Ruthenium Acetate. *Inorganica Chimica Acta*, 1971, v. **6**, 411–419.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, v. **104**, 31–40.

COVERDALE, J.; LAROYA-MCCARRON, T.; ROMERO-CANELÓN, I. Designing Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug Candidates? *Inorganics*, 2019, v. **7**, 31–46.

CUNHA, E. L. A.; TORCHELSEN, F. K. V. DA S.; CUNHA, L. M.; DE OLIVEIRA, M. T.; FONSECA, K. DA S.; VIEIRA, P. M. A.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M. Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. *Experimental Parasitology*, 2019, v. **204**, 107711–107720.

DA SILVA, C. F. N. Carboxilatos trinucleares de rutênio com ligantes intercaladores: estudo químico e de interação com biomoléculas alvo. Tese de Doutorado, 2019, Universidade de São Paulo.

DA SILVA, C. F. N.; AL-AFYOUNI, M.; XUE, C.; FERREIRA, F. H. DO C.; COSTA, L. A. S.; TURRO, C.; NIKOLAOU, S. Syntheses and electronic, electrochemical, and theoretical studies of a series of μ -Oxo-triruthenium carboxylates bearing orthometalated phenazines. *Dalton Transactions*, 2020.

DA SILVA, C. F. N.; POSSATO, B.; FRANCO, L. P.; RAMOS, L. C. B.; NIKOLAOU, S. The role of ancillary ligand substituents in the biological activity of triruthenium-NO complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, v. **186**, 197–205.

DA SILVA, F. M. Desenvolvimento e estudo teórico de novos ligantes derivados da 1,10-fenantrolina e seus complexos de ferro(II). Tese de Doutorado, 2008, Universidade Federal de Santa Catarina.

DA SILVA, F.; SIGNORI, A. M.; VICENTE, J.; DE SOUZA, B.; PRIEBE, J. P.; SZPOGANICZ, B.; GONÇALVES, N. S.; NEVES, A. Synthesis of substituted dipyrrodo[3,2-a:2',3'-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrrodo[3,2-f:2',3'-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxaline. *Tetrahedron*, 2008, v. **64**, 5410–5415.

DAI, F. R.; WU, Y. H.; ZHANG, L. Y.; LI, B.; SHI, L. X.; CHEN, Z. N. Spectroscopic, electrochemical, and DFT studies of oxo-centered triruthenium cluster complexes with a bis(tridentate) triazine ligand. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2011, v. **1**, 2306–2316.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 2014, v. **740**, 364–378.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, Â. C. V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2006, v. **2**, 0226–0235.

DE SOUZA, C. M.; SILVA, R. C.; FERNANDES, P. O.; DE SOUZA FILHO, J. D.; DUARTE, H. A.; ARAUJO, M. H.; DE SIMONE, C. A.; DE CASTRO, S. L.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; DEMICHELI, C. P.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. Cyclometalated ruthenium complexes from naturally occurring quinones: studies on their photophysical features, computational details and trypanocidal activity. *New Journal of Chemistry*, 2017, v. **41**, 3723–3731.

DEMORO, B.; ROSSI, M.; CARUSO, F.; LIEBOWITZ, D.; OLEA-AZAR, C.; KEMMERLING, U.; MAYA, J. D.; GUISET, H.; MORENO, V.; PIZZO, C.; MAHLER, G.; OTERO, L.; GAMBINO, D. Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones. *Biological Trace Element Research*, 2013, v. **153**, 371–381.

DIKHTIARENKO, A.; KHAINAKOV, S.; GARCÍA, J. R.; GIMENO, J. Mixed-valence μ_3 -oxo-centered triruthenium cluster $[\text{Ru}_3^{\text{II,III,III}}](\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{CO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Synthesis, structural characterization, valence-state delocalization and catalytic behavior. *Inorganica Chimica Acta*, 2017, v. **454**, 107–116.

ERIK HOLMLIN, R.; BARTON, J. K. $\text{Os}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$: A Red-Emitting DNA Probe. *Inorganic Chemistry*, 1995, v. **34**, 7–8.

ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. *Chemical Reviews*, 1999, v. **99**, 2777–2796.

ERYAZICI, I.; MOOREFIELD, C. N.; NEWKOME, G. R. Square-planar Pd(II), Pt(II), and Au(III) terpyridine complexes: Their syntheses, physical properties, supramolecular constructs, and biomedical activities. *Chemical Reviews*, 2008, v. **108**, 1834–1895.

FENG, B.; SOSA, R. P.; MÅRTENSSON, A. K. F.; JIANG, K.; TONG, A.; DORFMAN, K. D.; TAKAHASHI, M.; LINCOLN, P.; BUSTAMANTE, C. J.; WESTERLUND, F.; NORDÉN, B. Hydrophobic catalysis and a potential biological role of DNA unstacking induced by environment effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, v. **116**, 17169–17174.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. *Pharmacology and Therapeutics*, 2017, v. **180**, 49–61.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 2019, v. **19**, 125–127.

FISCHER, J.; GANELLIN, C. R.; PROUDFOOT, J.; ALAPI, E. M. Optimizing Drug Therapy by Analogues. *Analogue-Based Drug Discovery II*. Weinheim: Wiley, 2010, 1–28.

FOXON, S. P.; GREEN, C.; WALKER, M. G.; WRAGG, A.; ADAMS, H.; WEINSTEIN, J. A.; PARKER, S. C.; MEIJER, A. J. H. M.; THOMAS, J. A. Synthesis, characterization, and DNA binding properties of ruthenium(II) complexes containing the redox active ligand benzo[i]dipyrido[3,2- a: 2',3'-c]phenazine-11,16-quinone. *Inorganic Chemistry*, 2012, v. **51**, 463–471.

FRIEDMAN, A. E.; BARTON, J. K.; CHAMBRON, J. C.; SAUVAGE, J. P.; TURRO, N. J.; BARTON, J. K. Molecular “Light Switch” for DNA: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, v. **112**, 4960–4962.

FU, P. K. L.; BRADLEY, P. M.; TURRO, C. Stabilization of duplex DNA structure and suppression of transcription in vitro by bis(quinone diimine) complexes of rhodium(III) and ruthenium(II). *Inorganic Chemistry*, 2003, v. **42**, 878–884.

GANESHPANDIAN, M.; PALANIANDAVAR, M.; MURUGANANTHAM, A.; GHOSH, S. K.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M. A. Ruthenium(II)–arene complexes of diimines: Effect of diimine intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cytotoxicity. *Applied Organometallic Chemistry*, 2018, v. **32**, 1–17.

GAUR, R.; USMAN, M. A combined experimental and theoretical investigation of ruthenium(II)-hydrazone complex with DNA: Spectroscopic, nuclease activity, topoisomerase inhibition and molecular

docking. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, v. **209**, 100–108.

GHOSH, K.; KUMAR, R.; KUMAR, S.; BALA, M.; SINGH, U. P. Orthometallation in bidentate Schiff base ligands via C-H activation: Synthesis of ruthenium(III) organometallic complexes. *Transition Metal Chemistry*, 2015, v. **40**, 831–837.

GREGURIC, A.; GREGURIC, I. D.; HAMBLEY, T. W.; ALDRICH-WRIGHT, J. R.; COLLINS, J. G. Minor groove intercalation of $[\text{Ru}(\text{Me}_2\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ to the hexanucleotide $\text{d}(\text{GTCGAC})_2$. *Dalton Transactions*, 2002, v. **6**, 849–855.

GROESSL, M.; ZAVA, O.; DYSON, P. J. Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin. *Metallomics*, 2011, v. **3**, 591–599.

HANIF, M.; HARTINGER, C. G. Anticancer metallodrugs: Where is the next cisplatin? *Future Medicinal Chemistry*, 2018, v. **10**, 615–617.

HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds: Tools, Techniques, Tips. John Wiley & Sons, 2005.

HUANG, S.; LIANG, Y.; HUANG, C.; SU, W.; LEI, X.; LIU, Y.; XIAO, Q. Systematical investigation of binding interaction between novel ruthenium(II) arene complex with curcumin analogs and ctDNA. *Luminescence*, 2016, v. **31**, 1384–1394.

ICSEL, C.; YILMAZ, V. T. DNA binding and cleavage studies of two palladium(II) saccharinate complexes with terpyridine. *DNA and Cell Biology*, 2013, v. **32**, 165–172.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. doi.org/10.1351/goldbook. Data de acesso: 05/2018.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. doi.org/10.1351/goldbook. Data de acesso: 11/2019.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. doi.org/10.1351/goldbook. Data de acesso: 05/2018.

JAWAD, B.; POUDEL, L.; PODGORNIK, R.; STEINMETZ, N. F.; CHING, W. Y. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, v. **21**, 3877–3893.

KELLETT, A.; MOLPHY, Z.; SLATOR, C.; MCKEE, V.; FARRELL, N. P. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. *Chemical Society Reviews*, 2019, v. **48**, 971–988.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Academic Press, Elsevier Ltd.*, 1. ed., 2011. v. **75**, 1-18.

KLEIN, A.; HURKES, N.; KAISER, A.; WIELANDT, W. π -Stacking modulates the luminescence of $(\text{dppz})\text{Ni}(\text{Mes})\text{Br}$ (dppz = dipyrdo[3,2-a:2',3'-c]phenazine, Mes = 2,4,6-trimethylphenyl). *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 2007, v. **633**, 1659–1665.

KLEINWEISCHEDE, A.; MATTAY, J. Synthesis of amino- and bis(bromomethyl)-substituted bi- and tetradentate N-heteroaromatic ligands: Building blocks for pyrazino-functionalized fullerene dyads. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, v. **2006**, 947–957.

KOMEDA, S.; CASINI, A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, v. **12**, 219–235.

KOMOR, A. C.; BARTON, J. K. The path for metal complexes to a DNA target. *Chemical Communications*, 2013, v. **49**, 3617–3630.

KONGSTED, J.; OSTED, A.; MIKKELSEN, K. V.; ÅSTRAND, P. O.; CHRISTIANSEN, O. Solvent effects on the $n \rightarrow \pi^*$ electronic transition in formaldehyde: A combined coupled cluster/molecular dynamics study. *Journal of Chemical Physics*, 2004, v. **121**, 8435–8445.

KUMAR, A.; KUMAR, A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy Spectroscopic studies of oxo-centered, carboxylate-bridged, trinuclear mixed-valence iron (III,III,II) complexes with aromatic hydroxycarboxylic acids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, v. **112**, 422–428.

KUMAR, R.; KUMAR, S.; BALA, M.; RATNAM, A.; SINGH, U. P.; GHOSH, K. Site-specific: Orthometallation via C-H bond activation and syntheses of ruthenium(III) organometallics: Studies on nitric oxide (NO) reactivity and photorelease of coordinated NO. *RSC Advances*, 2016, v. **6**, 72096–72106.

LAI-FUNG CHAN, S.; WAI-YIN SUN, R.; CHOI, M. Y.; ZENG, Y.; SHEK, L.; SIN-YIN CHUI, S.; CHE, C. M. An anti-cancer trinuclear ruthenium(III) complex with 2-thiosalicylate ligands attenuates Wnt- β -catenin signaling. *Chemical Science*, 2011, v. **2**, 1788–1792.

LAYER, R. W. The chemistry of imines. *Chemical Reviews*, 1963, v. **63**, 489–510.

LAZAREVIĆ, T.; RILAK, A.; BUGARČIĆ, Ž. D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. **142**, 8–31.

LEIGH, D. A. Genesis of the Nanomachines: The 2016 Nobel Prize in Chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2016, v. **55**, 14506–14508.

LESCOP, C. Coordination-Driven Syntheses of Compact Supramolecular Metallacycles toward Extended Metallo-organic Stacked Supramolecular Assemblies. *Accounts of Chemical Research*, 2017, v. **50**, 885–894.

LIANG, H.; HAO, T.; YIN, C.; YANG, X.; FU, H.; ZHENG, X.; LI, R.; XIAO, D.; CHEN, H. Cyclometalated Rhodium(III) Complexes Based on Substituted 2-Phenylpyridine Ligands: Synthesis, Structures, Photophysics, Electrochemistry, and DNA-Binding Properties. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017, v. **2017**, 4149–4157.

LIM, M. H.; SONG, H.; OLMON, E. D.; DERVAN, E. E.; BARTON, J. K. Sensitivity of $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}^{2+}$ luminescence to DNA Defects. *Inorganic Chemistry*, 2009, v. **48**, 5392–5397.

LIU, H. K.; SADLER, P. J. Metal complexes as DNA intercalators. *Accounts of Chemical Research*, 2011, v. **44**, p. 349–359.

LLOYD, N. C.; MORGAN, H. W.; NICHOLSON, B. K.; RONIMUS, R. S. The composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a century-old debate. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2005, v. **44**, 941–944.

LOPES, C. D.; POSSATO, B.; GASPARI, A. P. S.; OLIVEIRA, R. J.; ABRAM, U.; ALMEIDA, J. P. A.; ROCHO, F. DOS R.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A.; MAIA, P. I. S.; DA SILVA, J. S.; DE ALBUQUERQUE, S.; CARNEIRO, Z. A. Organometallic Gold(III) Complex $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1)_4]^+$ (L_1 = SNS-Donating Thiosemicarbazone) as a Candidate to New Formulations against Chagas Disease. *ACS Infectious Diseases*, 2019, v. **5**, 1698–1701.

LOW, P. J.; ROBERTS, R. L.; CORDINER, R. L.; HARTL, F. Electrochemical studies of bi- and polymetallic complexes featuring acetylide based bridging ligands. *Journal of Solid-State Electrochemistry*, 2005, v. **9**, 717–731.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions. *Analytical Biochemistry*, 1987, v. **162**, 453–458.

LUTTERMAN, D. A.; CHOUAI, A.; LIU, Y.; SUN, Y.; STEWART, C. D.; DUNBAR, K. R.; TURRO, C. Intercalation is not required for DNA light-switch behavior. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, v. **130**, 1163–1170.

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and oncology*, 2019, v. **53**, p. 148–158.

MARIJA BARANAC-STOJANOVIC. New insight into the anisotropic effects in solution-state NMR spectroscopy. *RSC Advances*, 2014, v. **4**, 308–321.

MARLOYE, M.; BERGER, G.; GELBCKE, M.; DUFRASNE, F. A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. *Future Medicinal Chemistry*, 2016, v. **8**, 2263–2286.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCAR, C. H.; LANGE, W.; HEUKELBACH, J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: Spatial patterns and definition of high-risk areas. *Tropical Medicine and International Health*, 2012, v. **17**, 1066–1075.

MCKINLEY, A. W.; LINCOLN, P.; TUIITE, E. M. Environmental effects on the photophysics of transition metal complexes with dipyrrodo[2,3-a:3',2'-c]phenazine (dppz) and related ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, v. **255**, 2676–2692.

MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*, 2015, v. **284**, 329–350.

US National Library of Medicine. *Chagas Disease*. Disponível em medlineplus.gov/chagasdisease.html. Data de acesso: 12/2019.

MI, Y. X.; WANG, S.; XU, X. X.; ZHAO, H. Q.; ZHENG, Z. B.; ZHAO, X. L. A promising DNA groove binder and photocleaver based on a dinuclear ruthenium(II) complex. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2019, v. **64**, 4392–4398.

MESSLER, G. L.; FISCHER, P. J. Inorganic Chemistry. *Pearson Education*, 5. ed., 2014.

MILOSAVLJEVIC, N.; DURANTON, C.; DJERBI, N.; PUECH, P. H.; GOUNON, P.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; DIMANCHE-BOITREL, M. T.; RAUCH, C.; TAUC, M.; COUNILLON, L.; POËT, M. Nongenomic Effects of Cisplatin: Acute Inhibition of Mechanosensitive Transporters and Channels without Actin Remodeling. *Cancer Research*, 2010, v. **70**, 7514–7523.

MITAL, A. Synthetic nitroimidazoles: Biological activities and mutagenicity relationships. *Scientia Pharmaceutica*, 2009, v. **77**, 497–520.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chemical Reviews*, 2014, v. **114**, 4540–4563.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *The Lancet*, 2017, v. **389**, 312–325.

MOND, A. W. The Acetates of Ruthenium. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1930, v. **2**, 1247–1249.

MOORE, G. E.; GERNER, R. E.; FRANKLIN, H. A. Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1967, v. **199**, 519–524.

MOREIRA, E. Z.; DE MORAES, L. A. B.; EBERLIN, M. N.; IAMAMOTO, Y.; NIKOLAOU, S. The use of electrospray ionization tandem mass spectrometry on the structural characterization of novel asymmetric metallo-organic supermolecules, based on pentafluorophenylporphyrins and ruthenium complexes. *Polyhedron*, 2008, v. **27**, 2721–2729.

MOREIRA, M. B.; SILVA, C. F. N.; PESCI, R.; DEFLON, V.; NIKOLAOU, S. Revisiting oxo-centered carbonyl-triruthenium clusters: investigating CO photorelease and some spectroscopic and electrochemical correlations. *Dalton Transactions*, 2016, v. **17**, 3342–3350.

MORGAN, A. R.; LEE, J. S.; PULLEYBLANK, D. E.; MURRAY, N. L.; EVANS, D. H. Ethidium fluorescence assays. Part 1. Physicochemical studies. *Nucleic Acids Research*, 1979, v. **7**, 547–565.

MOTOMURA, T.; ZUCCARELLO, L.; SÉTIF, P.; BOUSSAC, A.; UМЕНА, Y.; LEMAIRE, D.; TRIPATHY, J. N.; SUGIURA, M.; HIENERWADEL, R.; SHEN, J. R.; BERTHOMIEU, C. An alternative plant-like cyanobacterial ferredoxin with unprecedented structural and functional properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2019, v. **1860**, 148084–148105.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; GÓMEZ-BARRIO, A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, v. **71**, 101–107.

NAIDEK, K. P.; HOFFMEISTER, D. M.; PAZINATO, J.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; NAKAMURA, M.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; WINNISCHOFER, H. Ruthenium acetate cluster amphiphiles and their langmuir-blodgett films for electrochromic switching devices. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2014, v. **2014**, 1150–1157.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Wiley, 1997.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, 2010, v. **15**, 1070–1078.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. Atheneu, 11. ed., São Paulo, 2004.

NIKOLAOU, S. Desenvolvimento de Estruturas Polinucleares Baseadas em Clusters Trinucleares e Complexos Poliimínicos de Rutênio: unidades de montagem em Química Supramolecular. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2002.

NIKOLAOU, S.; DA SILVA, C. F. N. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio. *Química Nova*, 2018, v. **41**, 833–838.

NIKOLAOU, S.; FORMIGA, A. L. B.; TOMA, H. E. Probing the electronic delocalization in a cyclic pyrazine ruthenium cluster hexamer. *Inorganic Chemistry Communications*, 2010, v. **13**, 1032–1035.

NIKOLAOU, S.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; TOMA, H. E. Synthesis and characterization of the $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{BPE})\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}](\text{PF}_6)_2$ dimer. *Transition Metal Chemistry*, 2008, v. **33**, 1059–1065.

NIKOLAOU, S.; UEMI, M.; TOMA, H. E. Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of a bridged triruthenium cluster-polypyridine dimer based on 2D (COSY, HMQC, and HMBC) techniques. *Spectroscopy Letters*, 2001, v. **34**, 267–277.

OLIVEIRA, G. Cancer and parasitic infections: similarities and opportunities for the development of new control tools. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2014, v. **47**, 1–2.

ORGEL, L. E. Structure of the trinuclear basic acetates. *Nature*, 1960, v. **187**, 504–505.

OSTERBY, B. R.; MCKELVEY, R. D. Convergent Synthesis of Betaine-30, a Solvatochromic Dye: An Advanced Undergraduate Project and Demonstration. *Journal of Chemical Education*, 1996, v. **73**, 260–261.

PAGES, B. J.; GARBUTCHEON-SINGH, K. B.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Platinum Intercalators of DNA as Anticancer Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017, v. **2017**, 1613–1624.

PAVIA, D. L. Introdução à Espectroscopia. Cengage Learning, 5. ed, 2015.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; PÉREZ-AYALA, A.; MORENO, S.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C.; ZAMORA, J.; LÓPEZ-VELEZ, R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: A systematic review with a meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, v. **64**, 1139–1147.

PEREZ, N. M. Investigação da influência do solvente nas transições eletrônicas e na liberação de CO de carboxilatos trinucleares de rutênio. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2018.

PHILLIPS, R. J.; DEACON, G. B. Relationships Between the Carbon-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coordination Chemistry Reviews*, 1980, v. **33**, 227–250.

PITCHKOV, V. N. The Discovery of Ruthenium. *Platinum Metals Reviews*, 1996, v. **40**, 181–188.

POSSATO, B. Complexos trinucleares simétricos de rutênio com ligantes azanaftalenos como bons candidatos a metalofármacos: síntese, caracterização e estudos biológicos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2017.

POSSATO, B.; CARNEIRO, Z. A.; DE ALBUQUERQUE, S.; NIKOLAOU, S. New uses for old complexes: The very first report on the trypanocidal activity of symmetric trinuclear ruthenium complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017, v. **176**, 156–158.

POSSATO, B.; CHRISPIM, P. B. H.; QUERINO, J.; RAMOS, L. C. B.; MARQUES, E.; DE OLIVEIRA, A. C.; SANTANA, R.; FORMIGA, A. L. B.; NIKOLAOU, S. Anticancer activity and DNA interaction of ruthenium acetate clusters bearing azanaphthalene ancillary ligands. *Polyhedron*, 2020, v. **176**, 114261-114269.

POSSATO, B.; DEFLON, V. M.; NAAL, Z.; FORMIGA, A. L. B.; NIKOLAOU, S. An extended π -system and enhanced electronic delocalization on symmetric $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$ complexes combined with azanaphthalene ligands. *Dalton Transactions*, 2017, v. **46**, 7926–7938.

PRAVIN, N.; UTTHRA, P. P.; KUMARAVEL, G.; RAMAN, N. Effective DNA binding and cleaving tendencies of malonic acid coupled transition metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, 2016, v. **1123**, 162–170.

QIN, J.; LIAO, Y.; CHEN, X. Y.; QIAN, C. X.; ZUO, J. L.; YOU, X. Z. Syntheses, characterization and properties of oxo-centered triruthenium cluster with tetrathiafulvalene-fused ligands. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2012, v. **716**, 275–280.

RADIUS, U.; BREHER, F. To boldly pass the metal-metal quadruple bond. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2006, v. **45**, 3006–3010.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics*, 2012, v. **26**, 275–291.

REHDER, D. Biological Activities of V and Cr. *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Application*, 2013, v. **3**, 819-834.

REICHARDT, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 1994, v. **94**, 2319–2358.

SALSI, F.; BULHÕES PORTAPILLA, G.; SCHUTJAJEW, K.; CARNEIRO, Z. A.; HAGENBACH, A.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA SILVA MAIA, P. I.; ABRAM, U. Thiosemicarbazones and thiadiazines derived from fluorinated benzoylthioureas: Synthesis, crystal structure and anti-Trypanosoma cruzi activity. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2018, v. **215**, 52–61.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J.; PADILLA, A.; WANG, W.; ORR, D.; TARLETON, R. L. Spontaneous dormancy protects trypanosoma cruzi during extended drug exposure. *eLife*, 2018, v. **7**, 1–20.

SANTOS, R. DA S.; JANNUZZI, S. A. V.; FORMIGA, A. L. B. Acetatos homo e heterotrinucleares de ferro: um experimento para o laboratório de química de coordenação. *Química Nova*, 2010, v. **33**, 1815–1820.

Secretaria da Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. *Boletim epidemiológico da Secretaria da Vigilância em Saúde*, 2019, v. **2**, 1-10.

SEUANES, G. C.; MOREIRA, M. B.; PETTA, T.; DE MORAES DEL LAMA, M. P. F.; DE MORAES, L. A. B.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; NAAL, R. M. Z. G.; NIKOLAOU, S. Novel binuclear μ -oxo diruthenium complexes combined with ibuprofen and ketoprofen: Interaction with relevant target biomolecules and anti-allergic potential. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, v. **153**, 178–185.

SHEN, K.; FU, Y.; LI, J.; LIU, L.; GUO, Q. What are the pKa values of C–H bonds in aromatic heterocyclic compounds in DMSO? *Tetrahedron*, 2007, v. **63**, 1568–1576.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, v. **124**, 1-19.

SPENCER, A.; WILKINSON, G. μ 3-Oxotruthenium carboxylate complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1972, v. **14**, p. 1570–1577.

SUN, Y.; LUTTERMAN, D. A.; TURRO, C. Role of electronic structure on DNA light-switch behavior of Ru(II) intercalators. *Inorganic Chemistry*, 2008, v. **47**, 6427–6434.

TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, v. **24**, 592–630.

TENÓRIO, M. S.; OLIVEIRA E SOUSA, L.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; RODRIGUES, M. V.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; LUCHEIS, S. B. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Veterinary Parasitology*, 2014, v. **203**, 203–206.

TOMA, H. Supramolecular chemistry and technology. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2000, v. **72**, 5–25.

TOMA, H. E. Alfred Werner e Heinrich Rheinboldt: genealogia e legado científico. *Química Nova*, 2014, v. **37**, 574–581.

TOMA, H. E. Química Bioinorgânica e Ambiental. *Blucher*, São Paulo, 2015.

TOMA, H. E. Química de Coordenação, Organometálica e Catálise. *Blucher*, São Paulo: 2015.

TOMA, H. E.; ARAKI, K.; ALEXIOU, A. D. P.; NIKOLAOU, S.; DOVIDAUSKAS, S. Monomeric and extended oxo-centered triruthenium clusters. *Coordination Chemistry Reviews*, 2001, v. **219**, 187–234.

TOMA, S. H.; SANTOS, J. J.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Supramolecular Approach to Gold Nanoparticle / Triruthenium Cluster Hybrid Materials and Interfaces. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2011, v. **10**, 1640–1648.

TOMA, S. H.; SANTOS, J. J.; NIKOLAOU, S.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Direct assembly of a metallodendrimer encompassing seven triruthenium clusters units. *Inorganica Chimica Acta*, 2012, v. **390**, 148–153.

TURRO, C. To intercalate or semiintercalate, or both? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, v. **108**, 17573–17574.

TURRO, C.; BOSSMANN, S. H.; TURRO, N. J.; BOSSMANN, S. H.; JENKINS, Y.; BARTON, J. K. Proton Transfer Quenching of the MLCT Excited State of Ru(phen)₂dppz²⁺ in Homogeneous Solution and Bound to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, v. **117**, 9026–9032.

US Geological Survey. Mineral Commodity Summaries 2019. *US Geological Survey*, 2019, doi.org/10.3133/70202434, 1-200.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, v. **4**, 307–320.

WHO, World Health Organization. *Model List of Essential Medicines, 21st List*, 2019. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO, World Health Organization. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Disponível em: <www.who.int/chagas/en/>. Acesso em 08/2019.

XU, J.; YU, S.; ZHONG, K.; JIN, L. Y. Construction of supramolecular nanostructures from v-shaped amphiphilic rod-coil molecules incorporating phenazine units. *Polymers*, 2017, v. **9**, 685-697.

YE, H. Y.; DAI, F. R.; ZHANG, L. Y.; CHEN, Z. N. Low-valence triruthenium compounds via substitution of a bridging acetate in the parent Ru₃O(OAc)₆ cluster core by 2,2'-azobispyridine (abpy) or 2,2'-azobis(5-chloropyrimidine) (abcp). *Inorganic Chemistry*, 2007, v. **46**, 6129–6135.

YE, H. Y.; ZHANG, L. Y.; CHEN, J. L.; CHEN, Z. N. Dimers of delocalized Ru₃O clusters linked by ortho-metallated 2,2'-bipyrimidine in $\mu_4\text{-}\eta^1(\text{C}), \eta^1(\text{C}), \eta^2(\text{N}, \text{N}), \eta^2(\text{N}, \text{N})$ mode. *Chemical Communications*, 2006, v. **1**, 1971–1973.

ZHANG, T.; ZHANG, A.; BELL, S. G.; WONG, L. L.; ZHOU, W. The structure of a novel electron-transfer ferredoxin from *Rhodopseudomonas palustris* HaA2 which contains a histidine residue in its iron-sulfur cluster-binding motif. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2014, v. **70**, 1453–1464.

8. ANEXO

Figura 62. Espectro HMQC (^1H - ^{13}C) do ligante dppz, 10^{-2} mol L^{-1} , 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 63. Espectro HMBC do ligante dppz, 10^{-2} mol L^{-1} , 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 64. Espectro COSY (^1H - ^1H) do ligante dppz, 10^{-2} mol L $^{-1}$, 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 65. Espectros eletrônicos de absorção do ligante dppz em diferentes solventes.

Figura 66. Retas de absorbância em função da concentração de dppz em três bandas, em ACN.

Fonte própria.

Figura 67. Curvas obtidas da titulação do aduto EB-DNA com os complexos 1-5 (A-E) ajustadas para uma equação logarítmica.

Fonte própria

Tabela 11. Composição química do meio de cultura RPMI.

Componente	Concentração (mg/L)
Glicose	2000
Vermelho de fenol, indicador de pH	5
Sais	
NaCl	6000
NaHCO ₃	2000
Na ₂ HPO ₄	1512
KCl	400
MgSO ₄ , Ca(NO ₃) ₂	100
Aminoácidos	
Glutamina	300
Arginina	200
Asparagina, cistina*, leucina, isoleucina	50
Lisina, cloridrato	40
Serina	30
Ácido aspártico, ácido glutâmico, hidroxiprolina, ácido glutâmico, hidroxiprolina, prolina, treonina, tirosina, valina	20
Histidina, metionina, fenilalanina	15
Glicina	10
Triptofano	5
Glutathiona, reduzida	1
Vitaminas	
mio-Inositol	35
Colina, cloridrato	3
Ácido p-aminobenzoico, ácido fólico, nicotinamida, piridoxina cloridrato, tiamina cloridrato	1
Pantotenato de cálcio, biotina, riboflavina	0,25
Cianocobalamina	0,005

*A cistina é um dímero oxidado de cisteínas, unidas por uma ligação S-S.

Fonte: (MOORE et al., 1967).

Figura 68. **A)** Citotoxicidade dos complexos **2-5** e seus respectivos ligantes frente à linhagem celular saudável LLC-MK2 em diferentes concentrações. **B)** Atividade tripanocida contra amastigotas dos complexos **2-5** e seus respectivos ligantes em diferentes concentrações. A faixa de concentrações foi de 10 a 0,078 μM . L = ligante. Uma das replicatas está mostrada.

Fonte própria.

Figura 69. Gráficos de dose-resposta para o benznidazol contra *T. cruzi* nas formas celulares **A)** amastigota e **B)** epimastigota.

Fonte própria.