UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

CAMILA FONTES NEVES DA SILVA

"Carboxilatos trinucleares de rutênio com ligantes intercaladores: estudo químico e de interação com biomoléculas alvo"

Tese 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 Doutor(a) em Ciências,

Área de Concentração: **Química**

Orientadora: Profa Dra Sofia Nikolaou

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, F.N. Camila

CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO COM LIGANTES INTERCALADORES: ESTUDO QUÍMICO E DE INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS ALVO / Silva, C. F. N. Orientadora Profa. Dra. Sofia Nikolaou. - Ribeirão Preto, 2019.

227 p.

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

1.Carboxilatos trinucleares de rutênio. 2.Ligantes bidentados. 3.Espectroscopia. 4.Eletroquímica. 5.Propriedades fotofísicas 6.Citotoxicidade. 7.Interação com DNA e HSA

SILVA, C. F. N."**CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO COM LIGANTES INTERCALADORES: ESTUDO QUÍMICO E DE INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS ALVO".**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr_____Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof.Dr.:_____Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof.Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof.Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof.Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

À DEUS!

Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

DEDICATÓRIA

À minha família, pois se eu pudesse escolher ...todas às vezes eu escolheria vocês.

Obrigada por todo apoio, carinho e amor incondicional nesta caminhada da vida, principalmente nos momentos de incertezas, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Obrigada por me ensinarem o caminho do amor, honestidade e persistência.

Agradeço por estarem sempre comigo!

Meu coração se enche de alegria em dedicar este trabalho para as "minhas mães" Mara e Elizabeth, irmão Murilo e padrinho Tato.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa Dra Sofia Nikolaou,** gostaria de expressar minha gratidão, respeito, admiração e registrar algumas palavras para que no futuro eu possa me lembrar dos bons exemplos que eu tive, os quais eu quero me inspirar. Eu sinto orgulho em ter permanecido neste grupo de pesquisa ($LABiQSC^2$) durante este período, foram 6 anos de muito aprendizado e amadurecimento científico. Agradeço por toda a orientação e valiosas discussões, não foram poucos momentos em que nos reunimos para a discussão dos resultados da pesquisa, correções dos relatórios científicos, artigos, trabalhos para congressos, sem contar as inúmeras prévias e reuniões de grupo.

À Professora o meu reconhecimento pela oportunidade em desenvolver este trabalho com uma Orientação que transmite sabedoria e profissionalismo. Eu tive a sorte de trabalhar com uma excelente profissional que além de muito competente tem entusiasmo pela profissão e o dom de ensinar.

AGRADECIMENTOS

Ao Weliton Pedro Batiston, obrigada por todos os momentos, pois esteve comigo nesta caminhada desde a graduação, mestrado e doutorado.

Aos amigos que fizeram parte do grupo da Profa. Dra. Sofia Nikolaou, (em ordem alfabética), Bruna, Gabriele, Felipe, Lilian, Mariete, Natacha, Natália e aos novos integrantes: Douglas, Pedro, Samya, muito obrigada por compartilhar momentos de aprendizados, pelas infinitas ajudas, ensinamentos e também momentos de alegria. À Dra Bruna Possato, pelas inúmeras horas que trabalhamos juntas e pelos valiosos ensinamentos. Agradeço também o meu primeiro aluno de Iniciação Científica, Ricardo Júnior, extremamente dedicado, organizado e sempre conduziu os trabalhos no lab e estudou com muito entusiasmo e alegria. A esses amigos meu muito obrigado de coração. Obrigada pelo apoio nas discussões científicas e também por fazerem parte da minha caminhada durante este período.

Aos amigos do grupo do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, os quais mesmo após a mudança física de laboratório, sempre estiveram presentes, nas discussões e nos momentos de descontrações. Atualmente alguns destes alunos já foram embora, mas estiveram presentes durante o desenvolvimento deste trabalho. A estes amigos, Alexia, Ana, Bia, Jorge, Joicy, Juliana, Laísa, Leandro, Loyanne, Rafa, Renata, Tássia, muito obrigada. À Dra Loyanne pela incrível paciência e disponibilidade em conduzir e apoiar nos estudos de citotoxicidade, pelas inúmeras vezes que tirou minhas dúvidas, uma pessoa incrível e que eu sempre pude contar com esta excelente profissional. Agradeço também por toda ajuda com os documentos e prestação de contas da FAPESP. À Dra Tássia que durante o período do estágio no exterior me ajudou muito, agradeço pelas dicas, momentos em que conversamos e por compartilhar a sua experiência comigo.

Ao Prof. Dr. Maurício Caiut e aos colegas do grupo, por todas as ajudas e discussões no período em que dividimos o laboratório, (em ordem alfabética) André Riul, Caroline, Larissa, Roberta, Eloísa, Fernando, Renata. Obrigada por fazerem parte desta caminhada e pelos momentos de comemorações e alegria.

Aos técnicos Dra. Juliana Biazotto, Ms Clóvis Júnior e Ivana Borin, agradeço pelas discussões acadêmicas, orientação e por estarem sempre dispostos a ajudar, principalmente nos momentos de dificuldades. À Mércia pela amizade, longas conversas e por sempre ter uma palavra amiga para compartilhar.

Ao Prof Dr Luiz Antônio Costa, pela colaboração e contribuição com a discussão dos resultados de pesquisa nos encontros de Congressos.

Ao Prof Dr Maurício da Silva Baptista um excelente pesquisador cujos trabalhos me inspiraram desde o período da minha graduação. Recentemente tive a oportunidade de realizar alguns experimentos com o Professor durante o meu estágio na OSU (The Ohio State University). Este período foi produtivo e aprendi muito. Obrigada pelo proveitoso convívio e pela oportunidade e confiança para trabalharmos juntos nesta próxima etapa da minha carreria.

A todos os Professores e técnicos que de maneira indireta também colaboraram com este trabalho, por meio das análises dos complexos sintetizados e por permitirem o uso de equipamentos em seus laboratórios. Em especial ao Prof Dr Roberto Santana, Prof Dr José Carlos Toledo Júnior, Prof Dr Grégoire Jean-François Demets, Profa Dra Yassuko Iamamoto e Dr José Carlos Tomaz.

Ao Prof Dr Grégoire Jean-François Demets e aos colegas do seu grupo de pesquisa, Renato, Francisco e Evandro, por estarem sempre dispostos a ajudar e contribuir com as discussões científicas.

A todos os Professores que me supervisionaram no estágio PAE, Profa Dra Rogéria Rocha Gonçalves, Profa. Dra. Daniela Gonçalvez de Abreu, Profa. Dra. Glaucia M da Silva Degreve, Profa Dra. Joana de Jesus de Andrade e Profa Dra Sofia Nikolaou, agradeço pelos conhecimentos compartilhados e pela valiosa oportunidade. Agradeço também a todos os alunos do PAE, principalmente à Lídia Miranda por ser um exemplo de dedicação e esforço. Obrigada pela amizade e por tudo o que ainda me ensina.

Aos Professores da graduação que fizeram parte desta caminhada e que muito me ensinaram. Em especial o Prof. Expedito L Silva, Profa. Dra Cida (Maria Aparecida

Rodrigues), Profa Dra Marilde B. Zorzi de Sá, Profa Dra Neide Maria M. M. Kiouranis, Prof Dr Ourides Santin Filho, Profa Dra Silvana M. de Oliveira Santin, Profa Dra Helena Shikuzo Nakatami, Prof Dr Vagner de Souza. Vocês são grandes inspirações!

A todos os funcionários do Departamento de Química, pelo serviço prestado na secretária, à Lâmia Melloni Atunes e Silva e André Luis Pereira Barnabé por toda disposição e auxílio nos momentos que precisei. Às funcionárias que cuidam da limpeza, por manterem o ambiente de trabalho sempre limpo e, além disso, pelos momentos de conversas e descontrações nos corredores do DQ.

A minha madrinha Adriana e toda a família que sempre mandam mensagens posistivas e torcem por mim. Muito obrigada pelo carinho e também por saber que eu posso contar com vocês.

Aos amigos que a vida me deu, aqueles de longas datas, Bruna e Guilherme por todo apoio e por todos os momentos que compartilhamos. Por todos os anos de amizade e muitas histórias para contar. À Marcinha, uma grande amiga que eu ganhei nos corredores do Departamento de Farmácia, sou muito grata pela sua amizade, pelas longas conversas, conselhos e por estar sempre presente, não importa a distância. À Camila Bussola, uma grande companheira em muitos momentos de estudos. Obrigada por tornar os dias no DQ mais agradáveis, com os lanches da tarde, bolos e aquele bom café. Obrigada por me acolher tão bem em sua família, aprendi muito com os seus pais (Cris e Preto) e quero carregar esta amizade para a vida toda. À Bia, Gaby, Natália e Ana Claúdia, não tenho palavras para expressar a minha gratidão a este quarteto de anjos. Agradeço por tudo, principalmente por saber que nos momentos que eu mais precisei vocês me ajudaram muito, nos momentos de mudanças, com várias documentações, discussões científicas e também nos momentos de descontração. A todos esses amigos, muito obrigada por tudo. Vocês fazem parte da família que a vida me presenteou.

My special thanks to Professor Claudia Turro for giving me the amazing opportunity to work at Turro’s lab. Thanks to all Turro´s PhD students, special to Malik for taking time to speak with me, about science, culture, food and life. Thanks TJ for the support on the biological experiments and also for share good moments in the office. Thanks to Lauren

for always helping me and to be a wonderful person. Austin and Sean for making the days more pleasant in the office. Thanks to Congcong for all support in TA and fentosecond TA experiments and for the good moments outside the lab. Thanks Jie for the good moments that we celebrated together. Thanks to people that work at The Ohio State University, for the welcome. I'm still impressed how things work easilly and fast at OSU.

Thanks to my American family: Sally and Mark, Jeanne, Abebu, how good were the moments shared with you. It was more than a time that we spent together. It was about the good energy and good things that I learned with them and I brought with me. Thank you for being such a wonderful people in my life, for being so much supportive and for encouraging me.

Melissa, Dion, Myiah and Junior, thank you for everything, for those moments which we spent together, we laughed and we celebrated the life with good wine. Thank you to all of you for the memories I will cherish forever.

À minha família Brasileira em Columbus – Ohio: Aline, Georgia, Patrícia, Rick e Ale, obrigada pela amizade, infinitas ajudas e por todos os momentos que passamos. Vocês foram muito importantes nesta caminhada. "Marcinho"(Ricardo), muito obrigada pelos momentos de gordices e boas risadas.

Ao Darciso, pelos momentos de descontração e alegria, por acolher os meus padrinhos e também por me ensinar muitas coisas.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Processos 2014/25561-8 e 2017/15202-9) e CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudos concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

...”E o mais importante na vida não é o ponto de partida ou a chegada, o que realmente vale a pena é a caminhada ser bem aproveitada”...

...Caminhando e semeando, vivendo e aprendendo ...

Como dizia o poeta:

"Gente nao nasce pronta e vai se gastando, gente nasce não pronta e vai se fazendo"...(Guimarães Rosa)

RESUMO

Neste trabalho uma classe de carboxilatos trinucleares de rutênio coordenados a ligantes ortometalados foi apresentada. As propriedades eletrônicas, eletroquímicas e fotofísicas destes complexos foram investigadas, bem como a atividade anticâncer e interações com biomoléculas alvo, DNA e HSA. Foram realizadas as sínteses e caracterização dos ligantes **(L_2)** $C_{18}H_{10}N_4$, **(L_3)** $C_{19}H_{12}N_4$, **(L_4)** $C_{18}H_9ClN_4$, dos precursores **(1)** $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$, **(2)** $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(CH_3OH)_2]$, **(3)** $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(py)_2]$, **(4)** $[Ru_3O(OAc)_6(H_2O)(py)_2]PF_6$ e dos novos complexos **(1-5)**, $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]PF_6$, (onde py = piridina, L_1 = dppn, L_2 = dppz, L_3 = dppzCH_3, L_4 = dppzCl, L_5 = phen). Os dados de RMN mostraram que a ortometalação dos ligantes fenazínicos afeta a estrutura dos complexos, com severo abaixamento de simetria. Já a investigação das propriedades eletrônicas e eletroquímicas indicaram que a presença de diferentes substituintes e a basicidade dos ligantes ortometalados influenciaram pouco as propriedades da unidade $[Ru_3O]^+$. Em termos da estrutura eletrônica dos complexos, este efeito indica que não há interações de natureza π significativas entre os orbitais da unidade $[Ru_3O]^+$ e dos ligantes ortometalados. Esse fato pode se originar na falta de planaridade entre a unidade $[Ru_3O]^+$ e os ligantes fenazínicos. Os resultados de citotoxicidade em linhagem de célula tumoral (B16F10) e não tumoral (L929) mostraram que os complexos apresentam efeito citotóxico maior contra as células tumorais do que os ligantes livres, bem como baixa citotoxicidade contra a célula não tumoral. Estes resultados mostraram que a série com ligantes ortometalados traz os exemplos com os melhores desempenhos já observados em nosso grupo de pesquisa, em comparação com outros clusters com ponte μ-oxo, frente ao câncer de melanoma. Os estudos de interação com biomoléculas alvo mostraram que os complexos interagem com o DNA e a HSA. Com o DNA observou-se interações de natureza eletrostática, com contribuição do mecanismo de intercalação à medida que o tamanho e a extensão da conjugação π dos ligantes ortometalados aumentam, sendo que o processo de intercalação é favorecido no caso do complexo **(1)** com o ligante dppn. Foram realizados estudos de interação dos complexos **(1-5)** com a HSA. Constataram-se valores altos das constantes de ligação complexos-HSA (da ordem 10^9 M^{-1}) e alterações na estrutura secundária da proteína. Os parâmetros termodinâmicos de interação com o DNA e HSA indicaram que as interações clusters-biomoléculas também apresentam contribuições de caráter hidrofóbico.

ABSTRACT

In this work a class of trinuclear ruthenium carboxylates coordinated to *ortho*-metallated ligands was presented. The electronic, electrochemical and photophysical properties of these complexes were investigated, as well as anticancer activity and interactions with target biomolecules, DNA and HSA. Synthesis and characterization of ligands **(L_2)** $C_{18}H_{10}N_4$, **(L_3)** $C_{19}H_{12}N_4$, **(L_4)** $C_{18}H_9ClN_4$, precursors **(1)** $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$, **(2)** $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(CH_3OH)_2]$, **(3)** $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(py)_2]$, **(4)** $[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)]PF_6$ and the complexes **(1-5)**, $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]\ PF_6$, (where py = pyridine, L_1 = dppn, L_2 = dppz, L_3 = dppzCH_3, L_4 = dppzCl, L_5 = phen). NMR data showed that the ortho-metallation of phenazine ligands affects the structure of the complexes, with severe symmetry lowering. On the other hand, the investigation of the electronic and electrochemical properties indicated that presence of different substituents and the basicity of the ortho-metallated ligands influence little the properties of the unit $[Ru_3O]^+$. In terms of the electronic structure of the complexes, this effect indicates that there are no significant π-type interactions between the orbitals of the $[Ru_3O]^+$ unit and ortometalated ligands. This fact may arise from the lack of planarity between the $[Ru_3O]^+$ unit and the phenazine ligands. The results of cytotoxicity in tumor cell and non-tumor cell lines showed that the complexes have a greater cytotoxic effect against tumor cells than free ligands, as well as low cytotoxicity against the non-tumor cell. These results have shown that the series with ortometal ligands brings the best performing examples already observed in our research group, compared to other trinuclear acetates of ruthenium with μ-oxo bridge, against melanoma cancer. The interaction studies with target biomolecules showed that the complexes interact with DNA and HSA. With the DNA, we observed interactions of an electrostatic nature, with contribution of the intercalation mechanism as the size and extent of π conjugation of the orthomolected ligands increases, and the intercalation process is favored in the case of complex **(1)** with the dppn binder. Interaction studies of the complexes **(1-5)** with the HSA were performed. High complex-protein association constants (of the order $10^9\ M^{-1}$) and alterations in the secondary structure were observed in the presence of the complexes **(1-5)**. The thermodynamic parameters of interaction with DNA and HSA indicated that the clusters-biomolecules interactions also present hydrophobic contributions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do complexo simétrico (A), $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$ e assimétrico (B), $[Ru_3O(OAc)_6(L')(L'')_2]^n$, onde L = ligantes axiais 4
Figura 2: Esquema de síntese para a formação do complexo $[Ru_3O(OAc)_6(MeOH)_3]^+$ .. 6
Figura 3: Representação do sistema de coordenadas da unidade $[Ru_3O]^n$ e a hibridização sp^2 do oxigênio central em complexos do tipo $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$ 7
Figura 4: Representação do DOM para complexos simétricos $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$ (simetria D_{3h}) e assimétricos (simetria C_{2v})..... 7
Figura 5: Representação da estrutura geral do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(phen)(L_1)_2]^n$, onde L_1 = piridina e phen = 1,10-fenantrolina 11
Figura 6: Estrutura de difração de raios X do complexo..... 12
Figura 7: Representação das estruturas do NAMI-A e KP1019..... 15
Figura 8: Estrutura do primeiro complexo de Ru (II) utilizado como fotossensibilizador em PDT (TLD1433) 16
Figura 9: Representação do mecanismo de intercalação entre um complexo metálico e do DNA 22
Figura 10: Estrutura cristalina da albumina sérica humana (HSA) e a localização de seus principais sítios de ligação..... 23
Figura 11: Esquema da reação geral de Condensação aromática para obtenção dos ligantes (1-4)..... 38
Figura 12: Representação do efeito das correntes e linhas de força induzidas no benzeno 40
Figura 13: Estruturas dos ligantes 2 - 4 com as respectivas numerações dos átomos de carbono e hidrogênio referentes às atribuições dos espectros ^1H, ^{13}C, COSY, HMQC e HMBC 41
Figura 14: Espectro de 1H - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz)..... 41
Figura 15: Espectro HMQC (^1H - ^{13}C), (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz) 42
Figura 16: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2..... 43
Figura 17: Espectros eletrônicos dos ligantes (1-5) em DMSO 44
Figura 18: Representação das estruturas dos ligantes (1-5) 46
Figura 19: Curvas de titulação espectrofotométrica (absorbância versus pH) para os ligantes (dppn (A), dppz (B), $dppzCH_3$ (C), dppzCl (D), phen (E)) 47
Figura 20: Espectros na região do IV dos ligantes (1-5) obtidos em pastilha de KBr ... 50

Figura 21: Voltamogramas cíclicos dos ligantes (1-5, A - E) em DMSO seco,..... 52
Figura 22: Representação da estrutura do ligante 2 (dppz) 53
Figura 23: Fluxograma referentes às 5 etapas de sínteses realizadas para obtenção dos novos complexos 54
Figura 24: Esquema geral da síntese do precursor (1) $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]^+$ 55
Figura 25: Esquema geral da síntese do precursor (2) $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_2(CO)]$ .. 55
Figura 26: Esquema geral da síntese do precursor (3) $[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CO)]$ 56
Figura 27: Esquema geral da síntese do precursor (4) $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)(py)_2]^+$... 56
Figura 28: Esquema geral da síntese do complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$..... 57
Figura 29: Representação do modo de ligação do Carbono (L) com um íon metálico M 59
Figura 30: Espectro ESI-MS do complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ adquirido no modo positivo 61
Figura 31: Esquema geral da dissociação do íon complexo..... 62
Figura 32: Espectro ESI-MS do complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$ adquirido no modo positivo 63
Figura 33: Espectro ESI-MS do complexo (4) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ adquirido no modo positivo 64
Figura 34: Espectro ESI-MS do complexo (5) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ adquirido no modo positivo 64
Figura 35: Espectros de EPR experimetal dos complexos (1-5), obtidos em DCM, (T = 10K)..... 65
Figura 36: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 69
Figura 37: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M 70
Figura 38: Representação da estrutura geral do cluster (5), com as respectivas posições relativas de cada hidrogênio 72
Figura 39: Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios das metilas dos grupos acetato (posição 1) com o pKa dos ligantes bidentados para os clusters 1-5 73
Figura 40: Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios das metilas dos grupos acetato (posições 2 (A),3 (B),4 (C) e 5 (D)) com o pKa dos ligantes bidentados para os clusters 1-5..... 74

Figura 41: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$, com destaque para os sinais duplicados dos prótons das metilas (1-5), obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 76
Figura 42: Representação dos isômeros para o complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]PF_6$ (A e B) 77
Figura 43: Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios dos ligantes bidentados (posição a) com o pKa dos ligantes bidentados para os clusters 1-5..... 79
Figura 44: Espectro eletrônico e perfil de deconvolução do precursor 1 (10^{-5} M) em metanol 80
Figura 45: Espectros eletrônicos qualitativo do intermediário reduzido, precursor (2) ($[Ru_3O(OAc)_6(H_2O)_2(CO)]$) - (A), (3) ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CO)]$), (4) ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(H_2O)]^+$) - (B) em metanol..... 81
Figura 46: Espectros eletrônicos dos complexos (1-5) em diclorometano..... 83
Figura 47: Representação da estrutura do cluster (2) ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]PF_6$ otimizada por TD-DFT 85
Figura 48: Estrutura do complexo (4) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ 86
Figura 49: Espectros na região do IV dos complexos (1-5) obtidos em pastilha de KBr 87
Figura 50: Espectro na região do IV do complexo (3), com destaque para os estiramentos dos grupos acetatos (ν_s(COO)) e (ν_{as}(COO)), obtido em pastilha de KBr 89
Figura 51: Voltamogramas cíclicos dos complexos (1-5), (A-E), em CH_2Cl_2 seco, ($5{,}0\times10^{-3}$ M, 0,1 M, $TBAPF_6$ Ag/AgCl)..... 92
Figura 52: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (1), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)..... 96
Figura 53: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (2), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)..... 96
Figura 54: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (3), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)..... 97
Figura 55: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (4), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)..... 97

Figura 56: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (5), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN) 98
Figura 57: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (5), registrados após aplicação de potencial positivo, mostrando o processo oxidativo $[Ru_3O]^{+1/+2}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN) 98
Figura 58: Esquema proposto para os processos de oxidação e redução dos complexos (1-4) após a aplicação de diferentes potenciais 99
Figura 59: Esquema geral do equipamento de flash-fotólise 104
Figura 60: Espectros de absorção de transientes: descoramento do estado fundamental (linha tracejada), emissão estimulada (linha pontilhada), absorção de estado excitado (linha contínua), soma dessas contribuições (linha cinza) 106
Figura 61: Espectro de absorção do complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)](PF_6)$ durante os experimentos de fotólise (150 W - Lâmpada de Xe), em solução de metanol (Tempo total de irradiação = 60 minutos) 110
Figura 62: Soluções do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)](PF_6)$ antes e depois da fotólise, utilizando-se lâmpada de Xe 111
Figura 63: Espectros de absorção dos transientes (femtosegundos) para os complexos (1-5) - (A - E) e para o precursor (4) - (F), em DCM, ... 112
Figura 64: Espectros de absorção dos transientes obtidos por fotólise a laser de 532 nm de ZnTPP (0,05 mM) na presença de $[Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]PF_6$ (0,1 mM) em AN saturado com AR: (O) 0,2μs e (O) 6μs. Gráfico Interno: Perfis de tempo de absorção em 840 e 940 nm. 116
Figura 65: Espectro eletrônico do complexo (2) ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^n$), oxidado e após a redução com solução de hidrazina, em DCM 118
Figura 66: Espectros de absorção dos transientes (femtosegundos) para o complexo (2) oxidado ((A) λ_{exc} = 700 nm, 4 μJ) e reduzido ((B) λ_{exc} = 800 nm, 4 μJ) em DCM 120
Figura 67: Espectros de variação da absorção obtidos após a redução e oxidação eletroquímica do complexo (1), em DCM (0,1 M NBu_4PF_6) 121
Figura 68: Representação da reação de conversão do MTT (coloração amarela a formazan (colaração violeta λ_{max} = 500 nm) 131
Figura 69: Efeito citotóxico, em células B16F10, para os complexos ( ) (1-5; A-E) e os ligantes bidentados livres ( ) (dppn (A), dppz (B), $dppzCH_3$ (C), dppzCl (D), phen (E)), em diferentes concentrações, após 24 horas de incubação. Os dados apresentados

estão relacionados com as médias ± S.E.M. de 3 experimentos realizados de forma independente. Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos controles, considerando p <0,05 de acordo com os testes ANOVA e Newman-Keuls 132
Figura 70: Efeito citotóxico, em células não tumorais L929, para os complexos ( ) (1-5; A-E) em diferentes concentrações, após 24 horas de incubação. Os dados apresentados estão relacionados com as médias ± S.E.M. de 3 experimentos realizados de forma independente. Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos controles, considerando p <0,05 de acordo com os testes ANOVA e Newman-Keuls 135
Figura 71: Representação das diferentes formas de separação do DNA plasmidial eletroforese em gel de agarose..... 139
Figura 72: Clivagem do DNA plasmídico (pUC19) seguida de eletroforese em gel de agarose (90 minutos, 70 volts) após incubação por 2 horas. Para os dois complexos (1 e 2), as linhas de 1 a 6 seguem a seguinte ordem: (Linha 1 = apenas *ct*-DNA; Linha 2 = DNA + complexo[10μM]; Linha 3 = DNA + complexo[20μM]; Linha 4 = DNA + complexo[50μM]; Linha 5 = DNA + complexo[50μM] + λ_{irr} = 450 nm (1 hora); Linha 6 = DNA + $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ [50μM] + λ_{irr} = 450 nm (10 min)..... 139
Figura 73: Espectros de absorção na região do UV-Vis registrados da titulação espectrofotométrica, a 25ºC, dos complexos (1-5, A-E, 20 μM) com *ct*-DNA (base pairs) [0 μM a 40 μM], em solução tampão Tris pH=7,5..... 141
Figura 74: Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos complexos (1-5, A-E, 20 μM) durante a titulação com o *ct*-DNA [0 μM a 40 μM], 25ºC 143
Figura 75: Gráficos de van´t Hoff para as interações dos complexos (1-5, A-E) com o *ct*-DNA em diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 31ºC, 37ºC)..... 144
Figura 76: Espectros de absorção da região do UV-Vis referentes à comparação entre a intensidade da última curva da titulação espectrofotométrica e a concentração equivalente de ct-DNA livre, [Complexo/DNA] = 42 μM e [DNA] = 42 μM, em solução tampão Tris pH=7,5, 25ºC..... 147
Figura 81: Gráficos de Van't Hoff, HSA (10^{-6} M) dos complexos (1-5, A-E) em 1diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 31ºC e 37ºC)..... 163
Figura 82: Perfil de decaimento da fluorescência da interação entre os complexos 165
Figura 83: Espectros de absorção CD da HSA pura [1,0x10^{-6} M] em 167

Figura 84 Espectros de absorção CD da HSA [1,0x10^{-6} M] na presença dos complexos (1-5, A-E) em Tampão Tris-HCl pH 7,4 à temperatura ambiente..... 168
Figura 86: Espectro de ^{1}H - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3..... 198
Figura 87: Espectro de ^{1}H - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4..... 198
Figura 88: Espectro de ^{1}H - ^{1}H COSY(400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2..... 199
Figura 89: Espectro de ^{1}H - ^{1}H COSY (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3..... 200
Figura 90: Espectro de ^{1}H - ^{1}H COSY (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4..... 200
Figura 91: Espectro de ^{13}C - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 201
Figura 92: Espectro de ^{13}C - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3 (dppz-CH_3) 201
Figura 93: Espectro de ^{13}C - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 202
Figura 94: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMQC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3 203
Figura 95: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMQC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 203
Figura 96: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3..... 204
Figura 97: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4..... 204
Figura 98: Representações das purificações dos complexos (1-5)..... 205
Figura 99: Espectro ESI-MS do complexo (1) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$ adquirido no modo positivo 206
Figura 100: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 207
Figura 101: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 208
Figura 102: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 209
Figura 103: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 210
Figura 104: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 210
Figura 105: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M 212
Figura 106: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 212
Figura 107: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M..... 213

Figura 108: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M 213
Figura 109: Registros dos equipamentos de flash fotólise (nanosegundos e femtosegundos) do Center for Chemical and Biophysical Dynamics, laboratório Profa. Dra. Claudia Turro – The Ohio State University..... 214
Figura 110: Curvas de decaimento associadas aos complexos estudados (1-5, A-E) .. 215
Figura 111: Espectros UV-Vis dos complexos (1-5), (A-E) na presença do meio de cultura celular. Os espectros foram registrados no intervalo de 0 h a 24 h 217
Figura 112: Espectros de absorção na região do UV-Vis registrados da titulação espectrofotométrica, a 31ºC, dos complexos (1-5, A-E) com *ct*-DNA 218
Figura 113: Espectros de absorção na região do UV-Vis registrados da titulação espectrofotométrica, a 37ºC, dos complexos (1-5, A-E) com *ct*-DNA 219
Figura 114: Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos complexos (1-5, A-E) durante a titulação com o *ct*-DNA a 31ºC..... 220
Figura 115: Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos complexos (1-5, A-E) durante a titulação com o *ct*-DNA a 37ºC..... 221
Figura 120: Curvas de Stern-Volmer (F_0/F x [complexo]) da supressão da fluorescência da HSA (λexc= 280 nm) para diferentes concentrações dos complexos (1-5, A-E) em diferentes temperaturas de incubação (25, 31 e 37 ºC) 225
Figura 121: Perfil de decaimento da fluorescência da interação entre os complexos (1-5, A-E) e HSA, em tampão tris (pH=7,2), λexc = 295 nm, à 31 ºC 226
Figura 122: Perfil de decaimento da fluorescência da interação entre os complexos (1-5, A-E) e HSA, em tampão tris (pH=7,2), λexc = 295 nm, à 37 ºC 227

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de λmáx e ε dos ligantes (1-5)..... 45
Tabela 2: Valores de pKa dos ligantes (1-5) obtidos pelo método experimental..... 48
Tabela 3: Valores das frequências observados na região de 4500 cm^{-1} - 450 cm^{-1} para os ligantes (1-5)..... 49
Tabela 4: Valores de $E_{1/2}$ (V vs Ag/AgCl) calculados para os processos redox dos ligantes..... 53
Tabela 5: Resultados calculados e experimentais (m/z) obtidos por meio dos espectros de massa ESI-MS dos complexos (1-5)..... 60
Tabela 6: Deslocamentos químicos dos hidrogênios nos espectros de ^{1}H-RMN para os complexos (1-5)..... 71
Tabela 7: Valores de log ε (L mol^{-1} cm^{-1}) para os $\lambda_{máx}$ dos complexos 1-5 83
Tabela 8: Valores de frequências máximos observados na região 88
Tabela 9: Valores de $E_{1/2}$ (V vs Ag/AgCl) obtidos para os complexos (1-5)..... 93
Tabela 10: Tempos de vida do estado excitado dos complexos obtidos a partir da curva de decaimento biexponencial..... 118
Tabela 11: Porcentagens da redução da viabilidade celular expressa pelos complexos e ligantes em função da concentração 133
Tabela 12: Valores das constantes de ligação (K) e dos parâmetros termodinâmicos para os complexos (1-5) em três temperaturas (25, 31 e 37 ºC), λ_{exc} = 280 nm..... 145
Tabela 13: Constantes de Stern- Volmer (k_{ap}) para diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação (25, 31 e 37 ºC) em 280 nm 159
Tabela 14: Constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) para diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação 160
Tabela 15: Constantes de ligação (K_b) e números de sítios de ligação do supressor (n) para diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação (25 ºC, 31 ºC e 37 ºC)..... 162
Tabela 16: Parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos e a HSA para λ_{exc}= 280 nm 164
Tabela 17: Porcentagens calculadas de α - hélice da HSA, em diferentes concentrações dos complexos (1-5) 169
Tabela 18: Dados espectroscópicos de RMN - ^{1}H, ^{13}C, COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC..... 195
Tabela 19: Dados espectroscópicos de RMN - ^{1}H, ^{13}C, COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC..... 196

Tabela 20:Dados espectroscópicos de RMN - ^{1}H, ^{13}C, COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC (^{1}H - ^{13}C) e HMQC obtidos para o ligante 4 (dppz-Cl)..... 197
Tabela 21: Dados de Viscosidade para o EtBr 222
Tabela 22: Dados de Viscosidade para o complexo (1) 222
Tabela 23:Dados de Viscosidade para o complexo (2) 222
Tabela 24: Dados de Viscosidade para o complexo (3) 223
Tabela 25: Dados de Viscosidade para o complexo (4) 223
Tabela 26: Dados de Viscosidade para o complexo (5) 223
Tabela 27: Dados de Viscosidade para o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 224

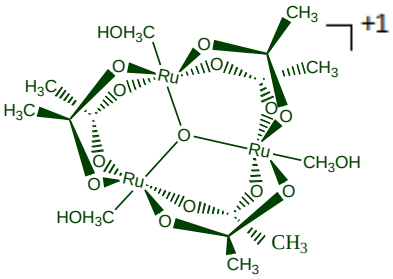
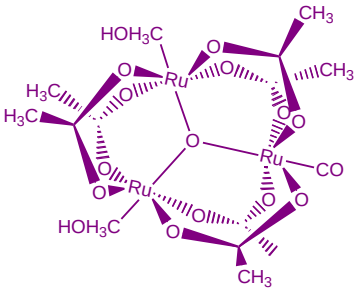
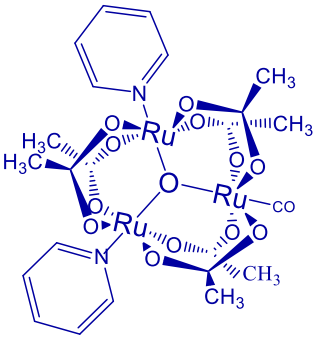
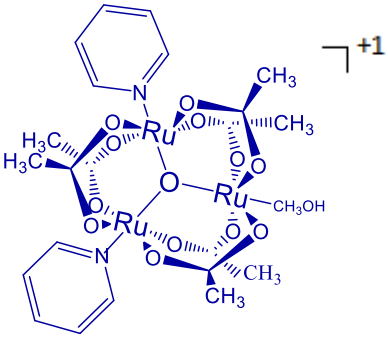
LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....66
Equação 2.....104
Equação 3.....104
Equação 4.....104
Equação 5.....104
Equação 6.....106
Equação 7.....129
Equação 8.....143
Equação 9.....144
Equação 10.....144
Equação 11.....153
Equação 12.....161
Equação 13.....162
Equação 14.....164
Equação 15.....165
Equação 16.....171
Equação 17.....173

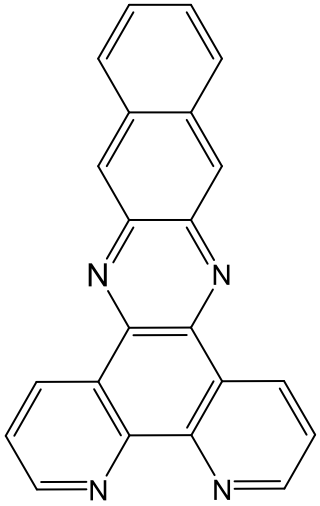
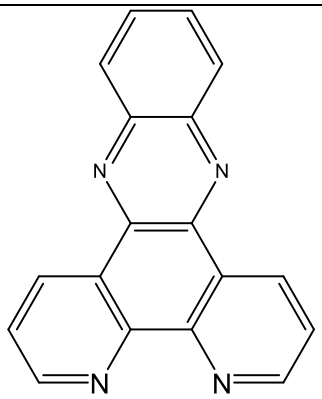
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac	Acetato
ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina do soro bovino
DCM	Diclorometano
TD-DFT	(*do inglês* Time-dependent Density Functional Theory)
DOM	Diagrama de orbital molecular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda (V)
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética
EtBr	Brometo de Etídio
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSA	Albumina do soro humano
IC	Transição Intracluster
IL	Intraligante
IV	Infravermelho
LUMO	Lowest Unoccuppied Molecular Orbital
MeOH	Metanol
pKa	Constante de dissociação
pH	Potencial hidrogeniônico
TCCL	Transição de Transferência de Carga Cluster Ligante
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
OAc	Acetato (CH_3COO^-)
UV-Vis	Ultravioleta-visível
ε	Coeficiente de absortividade molar (L mol^{-1} cm^{-1})
λ	Comprimento de Onda (nm)
K	Kelvin
k	Constante cinética aparente
δ	Deslocamento químico
ν	Frequência de estiramento
ϕ	Rendimento quântico

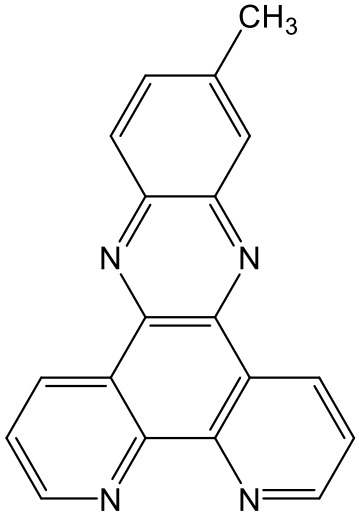
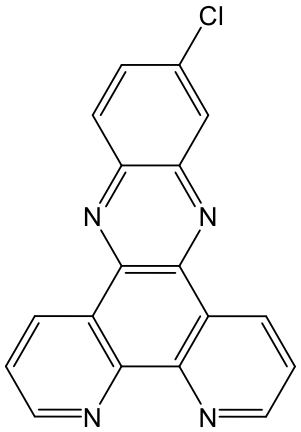
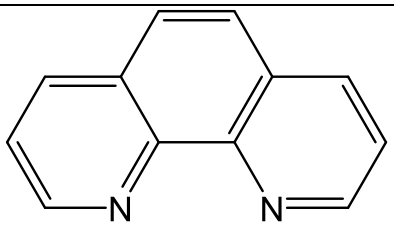
LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS NA TESE

FÓRMULA MOLECULAR / NOME	ARRANJO ESTRUTURAL
$[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$ Precursor 1 cluster mãe	
$[Ru_3O(OAc)_6(CO)(CH_3OH)_2]$ Precursor 2	
$[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CO)]$ Precursor 3	
$[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)]^+$ Precursor 4	

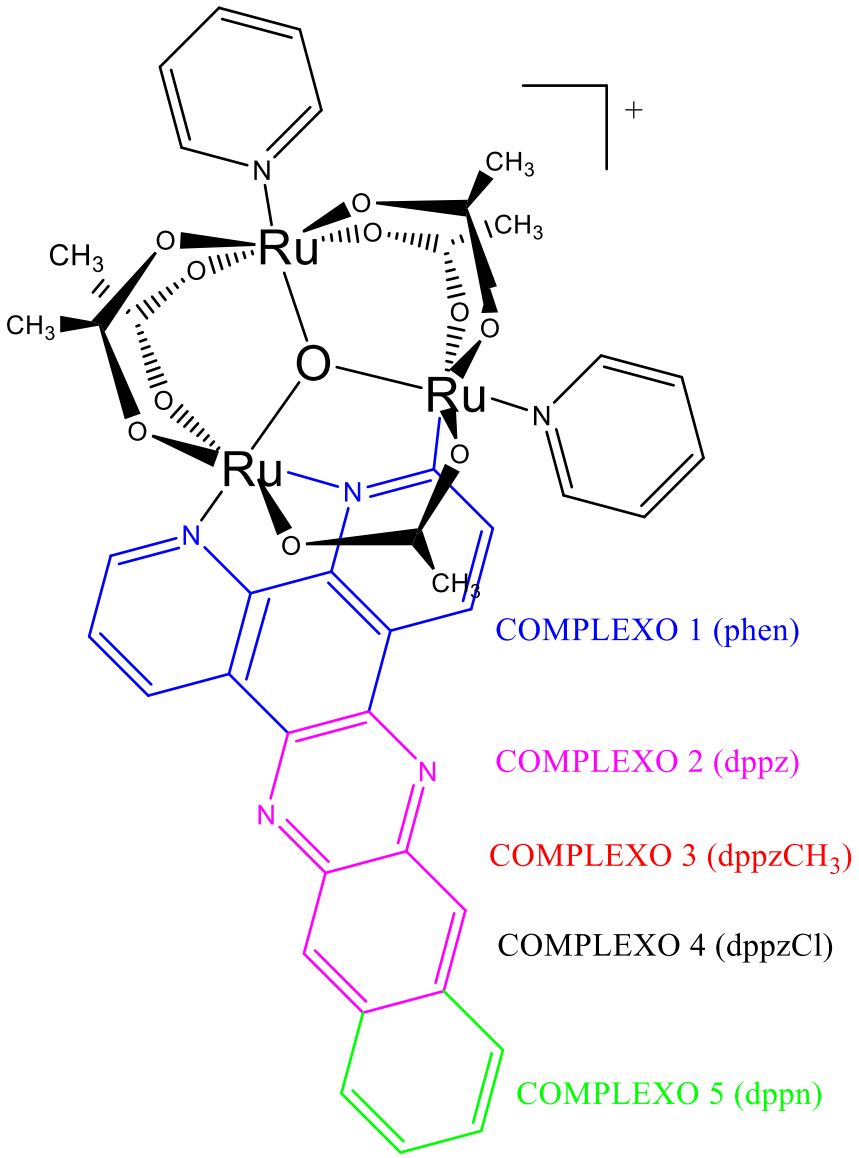
LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS NA TESE

FÓRMULA MOLECULAR / NOME	ARRANJO ESTRUTURAL
Ligante (1) **$C_{22}H_{12}N_4$**	 **(1) dppn**
Ligante (2) **$C_{18}H_{10}N_4$**	 **(2) dppz**

LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS NA TESE

FÓRMULA MOLECULAR / NOME	ARRANJO ESTRUTURAL
Ligante (3) **$C_{19}H_{12}N_4$**	 **(3) dppzCH$_3$**
Ligante (4) **$C_{18}H_9N_4Cl$**	 **(4) dppzCl**
Ligante (5) **$C_{12}H_{12}N_2$**	 **(5) phen**

LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS NA TESE



SUMÁRIO

LISTA DE EQUAÇÕES ..... **XXIV**

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **XXV**

APRESENTAÇÃO DA TESE **1**

CAPÍTULO 1: **2**

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS **2**

1. INTRODUÇÃO GERAL **3**

1. CLUSTERS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO **3**

1.1 Aspectos históricos e principais aplicações **3**

1.2 Sínteses, propriedades eletrônicas e eletroquímicas **5**

1.3 Clusters trinucleares de rutênio com ligantes bidentados **11**

2. APLICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO NA ÁREA BIOLÓGICA **14**

2.1 Utilização dos metalofármacos na terapia do câncer **14**

2.2 Reatividade dos clusters trinucleares de rutênio em modelos biológicos **18**

3. LIGANTES INTERCALADORES E INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS COM BIOMOLÉCULAS ALVO **19**

3.1 Ligantes intercaladores: fenantrolinas estendidas como os derivados da [3,2-a;2',3'-c] fenazina (dppz) **19**

3.2 DNA **20**

3.3 Albumina do soro humano (HSA) **23**

4. OBJETIVOS **25**

4.1 Objetivo geral **25**

4.2 Objetivos específicos **25**

CAPÍTULO 2: **27**

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES BIDENTADOS E CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO: PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESPECTROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS **27**

1. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS **28**

1.1 Procedência dos solventes e reagentes **28**

1.11 Purificação do solvente diclorometano 29

1.2 Sínteses dos ligantes **29**

1.3 Sínteses dos precursores **30**

1.4 Sínteses dos novos complexos (1-5) **32**

1.5 Equipamentos e métodos utilizados **34**

1.51 Determinação do pKa dos ligantes (2-4) 34

1.52 Análise Elementar 34

1.53 Espectrometria de massas 34

1.54 EPR 34

1.55 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN 35

1.56 Espectroscopia eletrônica UV-Visível 35

1.57 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho 35

1.58 Voltametria Cíclica 35

1.59 Espectroeletroquímica 36

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO **37**

2.1 Síntese e caracterização dos ligantes **37**

2.1.2 Sínteses.....37

2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....38

2.2.1 Espectros de H^1 - RMN e COSY dos ligantes (2 - 4).....39

2.2.2 Espectros de C^{13} - RMN e HMQC e HMBC dos ligantes (2 - 4).....42

2.3 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis-NIR.....43

2.4 Determinação dos valores de pKa dos ligantes (1-5).....45

2.5 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....48

2.5.1 Espectros de IV dos ligantes (1-5).....49

2.6 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS DOS LIGANTES 51

2.7 Síntese e caracterização dos complexos.....54

2.7.1 Sínteses.....54

2.8 Espectrometria de Massas.....59

2.9 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....65

2.10 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....67

2.11.1 Espectros eletrônicos dos precursores.....79

2.11.2 Espectros eletrônicos dos novos complexos (1-5).....82

2.12 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....86

2.21.1 Espectros de IV dos complexos (1-5).....86

2.13 Voltametria Cíclica.....91

2.14 Espectroeletroquímica.....94

3. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS 99

***CAPÍTULO 3:* 102**

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DOS CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO..... 102

1. INTRODUÇÃO **103**

2. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS **107**

2.1 Materiais e Métodos **107**

2.11 Estudos de fotoestabilidade dos carboxiltaos trinucleares de rutênio 107

2.12 Estudos fotofísicos 107

2.13 Obtenção do complexo reduzido $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^0$ 108

2.2 Equipamentos e métodos utilizados **108**

2.21 Sistema de irradiação 108

2.22 Espectroscopia resolvida no tempo - fotólise por pulso de laser 108

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO **109**

3.1 Investigação óptica dos espectros de absorção dos transientes do precursor (4) e dos complexos (1-5) **109**

3.2 Investigação da natureza da espécie formada no estado excitado por meio da espectroeletroquímica **121**

4. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS **122**

CAPÍTULO 4: **123**

ESTUDOS DE CUNHO BIOLÓGICO E INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS ALVO (DNA E HSA) **123**

1. INTRODUÇÃO **124**

2. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS **125**

2.1 Procedências dos solventes e reagentes **125**

2.2 Métodos e equipamentos utilizados **125**

2.21 Avaliação da citotoxicidade das células tumorais (B16F10) e não tumorais (L929) na presença dos complexos (1-5) 125

2.22 Ensaios de clivagem do DNA.....126
2.23 Interação com DNA - Titulação espectrofotométrica na região UV-Visível.....126
2.24 Interação com DNA - Viscosidade.....127
2.25 Interação dos complexos (1-5) com albumina do soro humano (HSA).....127
2.26 Medidas do Tempo de vida da HSA na presença dos complexos (1-5).....128
2.27 Interação dos complexos (1-5) com albumina do soro humano (HSA): Dicroísmo Circular.....129

2.3 Equipamentos.....129
2.31 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.....129
2.32 Espectroscopia de fluorescência.....129
2.33 Medidas de tempo de vida.....129
2.34 Dicroísmo circular (CD).....130

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 130

3.1 Estudos biológicos *in vitro*.....130
3.1.1 Avaliação do efeito citotóxico dos complexos (1-5) e ligantes livres em modelos celular pelo ensaio de MTT.....130
3.2 Interação dos complexos (1-5) com DNA.....138
3.2.3 Titulação espectrofotométrica dos complexos (1-5) com o ct-DNA.....140
3.2.4 Viscosidade.....150
3.3 Investigação da interação dos complexos (1-5) com albumina do soro humano (HSA).....153
3.3.2 Tempo de vida da HSA na presença dos complexos (1-5).....164
3.3.3 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD): Análise conformacional da HSA 166

4. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS 171

***CAPÍTULO 5:* 173**

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 173

6. REFERÊNCIAS 178

ANEXOS **195**

ANEXO I **195**

ANEXO II **198**

ANEXO III **199**

ANEXO IV **201**

ANEXO V **203**

ANEXO VI **204**

ANEXO VII **205**

ANEXO VIII **206**

ANEXO XI **214**

Fonte: Autora **214**

ANEXO XII **215**

ANEXO XIII **217**

ANEXO XV **220**

ANEXO XVI **222**

ANEXO XVII **225**

APRESENTAÇÃO DA TESE

As seções desta Tese de Doutorado estão apresentadas na forma de Capítulos, com as respectivas introduções, metodologias, discussões e conclusões parciais.

Os cinco capítulos seguem a seguinte organização:

- Capítulo 1: introdução geral dos principais tópicos discutidos no desenvolvimento do trabalho, bem como os principais referenciais teóricos e objetivos gerais e específicos desta pesquisa.
- Capítulo 2: resultados e discussões das sínteses e caracterização dos ligantes, precursores e complexos inéditos, com enfoque na investigação das propriedades químicas, espectroscópicas e eletroquímicas dos compostos estudados.
- Capítulo 3: investigação das propriedades fotofísicas dos novos complexos;
- Capítulo 4: avaliação das propriedades biológicas dos complexos, com apresentação dos resultados de citotoxicidade contra linhagens celulares, tumoral (B16F10) e não tumoral (L929), bem como interação dos complexos com as biomoléculas alvo DNA e HSA.
- Capítulo 5: considerações finais elaboradas a partir das discussões realizadas nos capítulos anteriores.

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. Clusters trinucleares de rutênio

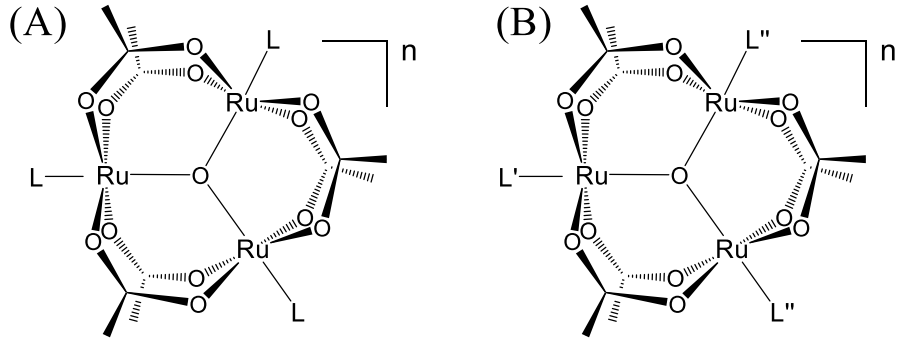
1.1 Aspectos históricos e principais aplicações

Os carboxilatos de rutênio começaram a ser investigados na década de 30 por Mond, o qual apresentou pela primeira vez uma série de carboxilatos binucleares de rutênio (MOND, A.W et al.,1930). Na década de 50, os carboxilatos trinucleares de ferro, vanádio, cromo e cobalto eram bem conhecidos. Inspirados nestes complexos, em 1952 Martin, F.S sintetizou pela primeira vez uma série de carboxilatos trinucleares de rutênio (MARTIN, F.S.,1952). Neste trabalho, não foram publicados resultados de difração de raios X para comprovar as estruturas, mas os dados de caracterização indicavam que os complexos de rutênio obtidos apresentavam as mesmas fórmulas estruturais dos carboxilatos trinucleares de ferro (III) (OLDHAM, C.,1968).

A partir de 1971 houve um grande avanço na elucidação das estruturas dos carboxilatos trinucleares de rutênio e por meio de estudos de difração de raios X, a organização estrutural destes novos complexos com fórmula geral $[Ru_3O(OAc)_6(H_2O)_3]^+$,foi confirmada (COTTON, F.A et al.,1971). Neste período foi isolado o complexo $[Ru_3O(OAc)_6(PPh_3)_3]^0$,sendo o primeiro exemplo de carboxilato de rutênio, no qual os átomos de rutênio apresentaram estados de oxidação Ru(III), Ru(III), Ru(II) (COTTON, F.A et al.,1971; SPENCER, A et al.,1972).

Os primeiros carboxilatos trinucleares de rutênio isolados foram os complexos simétricos, os quais apresentaram três ligantes (L) iguais, Figura 1A. Contudo em 1973 Spencer e Wilkinson reportaram as sínteses e caracterização de uma nova classe de carboxilatos de rutênio assimétricos, $[Ru_3O(OAc)_6(L')(L'')_2]^n$, onde L' = C_5H_5N, PPh_3 e L'' = CO, NO, CH_3CN, SO_2, Figura 1B, (SPENCER, A et al.,1972).

Figura 1: Representação do complexo simétrico (A), $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$ e assimétrico (B), $[Ru_3O(OAc)_6(L')(L'')_2]^n$, onde L = ligantes axiais



Fonte: Autora.

Uma variedade muito grande de estruturas pode ser obtida com complexos deste tipo, uma vez que diferentes ligantes axiais podem ser coordenados aos três íons metálicos de rutênio e isto resulta na obtenção de importantes propriedades catalíticas e redox. Desta forma, o interesse nos estudos desta classe de complexos motivou o desenvolvimento de muitos trabalhos, os quais estão reportados na literatura e também foram apresentados em dois artigos de revisão (TOMA, H.E et al.,2001; GLOVER, S.D et al.,2010).

Devido à grande versatilidade destes compostos, diversas aplicações estão reportadas na literatura, tais como: construção de materiais eletrônicos utilizados para transferência de elétrons intramolecular, precursores excelentes para a construção de conjuntos moleculares, arquiteturas 3D na superfície de eletrodos e até nanomateriais moleculares (NIKOLAOU, S et al.,2010; TOMA, S.H et al.,2011; TOMA, S.H et al.,2012; ZHANG, H et al.,2014).

Em relação aos principais grupos de pesquisa com trabalhos nesta área, destacam-se: Abe, M e Sasaki, Y no Japão, Kubiak, C.P e Goeltz, J.C nos Estados Unidos e no Brasil os trabalhos pioneiros foram desenvolvidos no grupo do Prof Dr Henrique Eisi Toma na USP - SP (TOMA, H.E et al.,1988; 2002). Na última década o nosso grupo de pesquisa, motivado pela experiência adquirida pela Profa Dra Sofia Nikolaou em seus trabalhos com o pesquisador Toma, tem contribuído com os estudos desta classe de compostos (CARNEIRO, Z et al.,2014; CACITA, N et al.,2015; CACITA, N et al.,2016, MOREIRA, B.M et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017; POSSATO, B et al.,2017; SILVA, C.F.N et al.,2018).

Abe, M e colaboradores têm contribuído principalmente com o estudo destes complexos na área de nanomateriais. Em 2003 apresentaram um trabalho de construção de nanoestruturas funcionais, constituídas de carboxilatos trinucleares de rutênio em superfície de eletrodo de ouro (ABE, M et al.,2003).

O grupo de pesquisa do Kubiak, C.P apresenta estudos detalhados das propriedades espectroscópicas de dímeros de valência mista, bem como a investigação de reações de transferências de elétrons que envolvem os estados excitados dos complexos (HENDERSON, J et al.,2014; PETERSSON, J et al.,2015).

Na Química Supramolecular, muitos trabalhos foram desenvolvidos por Nikolaou, S e Toma, H. E onde exploraram as propriedades eletrônicas dos carboxilatos trinucleares de rutênio na construção de estruturas supramoleculares estendidas, tais como: dendrímeros e hexâmeros (NIKOLAOU, S et al.,2008; NIKOLAOU, S et al.,2010; TOMA, S.H et al.,2012).

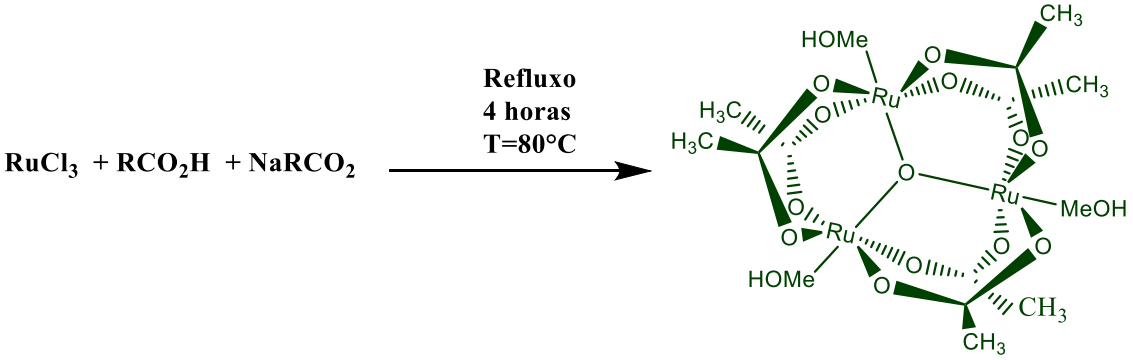
Apesar das diferentes aplicações reportadas para estes compostos, atualmente a literatura ainda é escassa quando se considera a aplicação dos carboxilatos trinucleares de rutênio na área biológica. Na última década, oito trabalhos apresentaram uma potencial aplicação de cunho biológico para complexos deste tipo (LIU, M et al.,2010; FELD, J.D et al.,2012; TAUCHAMAN, J et al.,2014; CARNEIRO, Z et al.,2014; CACITA, N et al.,2015; CACITA, N et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017; SILVA, C.F.N et al.,2018). Todavia, cinco destes trabalhos foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (CARNEIRO, Z et al.,2014; CACITA, N et al.,2015; CACITA, N et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017; SILVA, C.F.N et al.,2018).

1.2 Sínteses, propriedades eletrônicas e eletroquímicas

Os carboxilatos trinucleares de rutênio, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_3]^n$ onde L = ligantes axiais, são obtidos ao reagir cloreto de rutênio III ($RuCl_3.nH_2O$), com acetato de sódio ($NaRCO_2.nH_2O$) em etanol e com o ácido carboxílico correspondente (RCO_2H). A reação para formação destes complexos não apresenta mecanismo elucidado, mas é considerada uma reação de automontagem, pois os íons metálicos de rutênio se auto organizam em um arranjo trigonal, que permanecem ligados em ponte pelo átomo central de oxigênio e seis pontes de acetato, Figura 2, (TOMA, H.E et al.,2001). A formação destes carboxilatos também ocorre na presença de outros metais de transição

(M = Fe, Co, V, entre outros) (ALMOG, O et al.,1993; SASAKI, Y et al.,1993; CANNON, R.D et al.,1988).

Figura 2: Esquema de síntese para a formação do complexo $[Ru_3O(OAc)_6(MeOH)_3]^+$



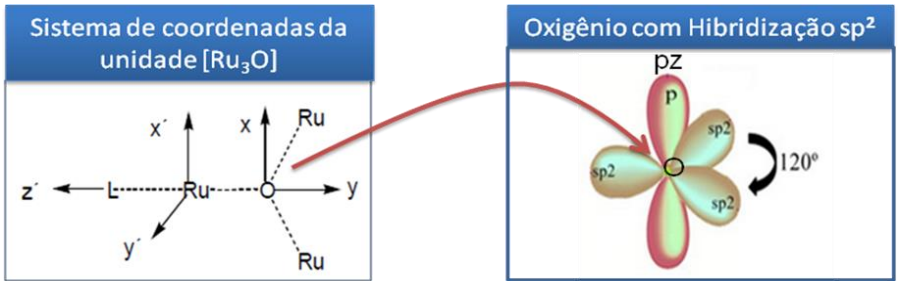
Fonte: Autora.

Os resultados de difração de raios X apresentados em 1972 por Cotton, F.A e colaboradores demonstraram que, quando todos os ligantes coordenados aos íons metálicos de rutênio são iguais, no caso de complexos simétricos, a unidade $[Ru_3O]^n$ apresenta a geometria de um triângulo equilátero e as ligações Ru-O-Ru formam ângulos de aproximadamente 120º graus (COTTON, F.A et al.,1972). No entanto, esta geometria pode sofrer distorções dependendo do ligante axial coordenado e também a distância entre os átomos de rutênio se altera com os estado de oxidação do metal, o que reforça a grande deslocalização eletrônica presente na unidade $[Ru_3O]^n$ (TOMA, H.E et al.,2001; GLOVER, S.D et al.,2010).

Dependendo dos ligantes (L) coordenados ($[(Ru_3O)(OAc)_6(L)_3]^n$), podem ser obtidos dois tipos de complexos simétricos e assimétricos, (simétricos: apresentam todos os ligantes iguais e assimétricos: apresentam ligantes axiais diferentes), os quais apresentam simetrias D_{3h} e C_{2v} respectivamente.

Com isso, em 1972 foi proposto o DOM por Cotton, F.A e discutido detalhadamente por Meyer, T.J em 1978, sendo que este DOM é utilizado na literatura até os dias de hoje (COTTON, F.A et al.,1972; BAUMANN, J.A et al.,1978). Considerando os aspectos qualitativos da construção do DOM para estes complexos, é importante destacar, que o OM foi gerado a partir das combinações de simetria dos orbitais d dos três átomos de rutênio com o orbital pz do átomo de oxigênio, o qual apresenta hibridização sp^2, Figura 3.

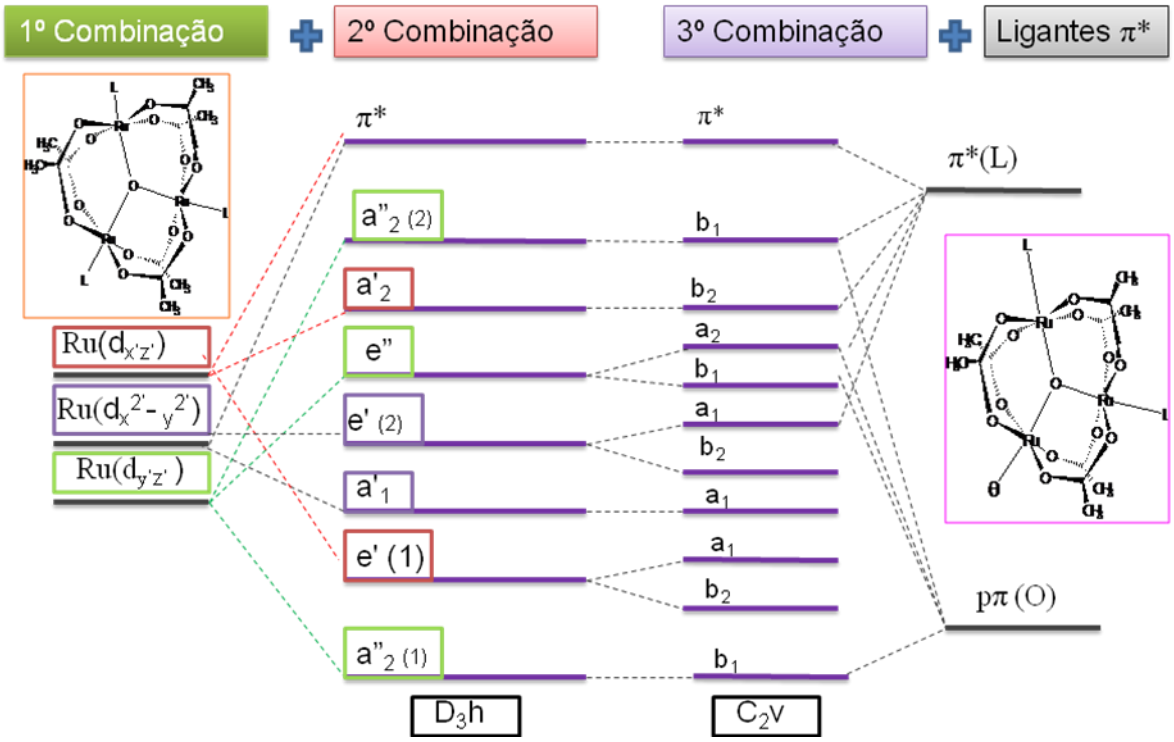
Figura 3: Representação do sistema de coordenadas da unidade $[Ru_3O]^n$ e a hibridização sp^2 do oxigênio central em complexos do tipo $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$



Fonte: Adaptado de BAUMANN, J.A et al.,1978.

Além da combinação dos orbitais d dos átomos de rutênio com o orbital pz do oxigênio central, também foram consideradas as combinações entre os próprios orbitais d dos átomos de rutênio. No DOM também foi considerada a interação da unidade $[Ru_3O]^n$, com os ligantes axiais (L), por exemplo, ligantes N–heterocíclicos como piridina, tem orbitais π e π* de simetria apropriada para combinar-se com os orbitais dπ dos íons Ru, Figura 4.

Figura 4: Representação do DOM para complexos simétricos $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$ (simetria D_{3h}) e assimétricos (simetria C_{2v})



Fonte: Adaptado de BAUMANN, J.A et al.,1978.

Com relação a configuração eletrônica, os complexos simétricos com carga formal +1 apresentam configuração eletrônica $(a''_2)^2$ $(e')^4$ $(a'_1)^2(e')^4(e'')^4$ $(a'_2)^1$, com 17 elétrons oriundos dos íons Ru $4d^5$ (estado de oxidação formal III) e 2 elétrons do oxigênio central. Nesta configuração eletrônica, 1 elétron fica desemparelhado, sendo que os complexos simétricos apresentam anisotropia paramagnética.

Neste DOM, Figura 4, considerou-se apenas a combinação entre os orbitais dos três centros metálicos e do átomo central de oxigênio, sendo que as interações que envolvem os orbitais dos grupos acetatos não foram consideradas (NIKOLAOU, S.,2002; TOMA, H.E et al.,2002). No entanto, estudos recentes que envolvem a caracterização detalhada de novas séries de carboxilatos trinucleares de rutênio mostraram que para a compreensão das propriedades espectroscópicas desses complexos, é preciso considerar a mistura eletrônica entre os orbitais metálicos e dos acetatos em ponte (ZHANG, H.X et al.,2014; CACITA, N et al.,2015; MOREIRA, M.B et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017). Neste sentido, estudos de modelagem molecular pelo método TD-DFT e correlações de resultados experimentais de IV, RMN, UV-Vis e voltametria ciclíca com variações estruturais, indicaram que há comunicação eletrônica e mistura orbital entre a unidade $[Ru_3O]^n$ e os acetatos em ponte (MOREIRA, M.B et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017).

Tipicamente, o espectro eletrônico dessa classe de complexos (com carga formal +1), apresenta uma banda na região de 700 nm atribuída à transição centrada na unidade $[Ru_3O]^n$, denominada IC (transição intracluster) e ombros na região entre 300 nm e 400 nm referentes as transições que envolvem os ligantes, TCCL (transição de transferência de carga cluster → ligantes axiais). No entanto, resultados obtidos por TD-DFT para o complexo $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(dmpz)_2]$ sugerem que as transições IC, geralmente atribuídas a transições que envolvem exclusivamenete a unidade $[Ru_3O]^n$, tem origem em um HOMO com grande contribuição dos acetatos e o LUMO com contribuição da unidade $[Ru_3O]^n$ (PEREZ, N.M.,2018). De modo que, em termos gerais, efeitos eletrônicos de doação/retirada de densidade eletrônica, que afetam o HOMO dessa transição influenciam diretamente as características dos acetatos, como o sinal de RMN de duas metilas e os estiramentos observados para o grupo COO^- nos espectros de infravermelho.

De fato essa influência foi observada em estudos pioneiros de caracterização e correlação sistemática das propriedades eletrônicas de uma série de complexos assimétricos, $[Ru_3O(OAc)_6(L)_2(CO)]^0$ onde L = 2,6-dimetilpirazina (dmpz) (**1**),

isonicotinamida (adpy) (**2**), 4-acetil-piridina (acpy) (**3**), 3-metil-piridina (3-pic) (**4**), 4-metil-piridina (4-pic) (**5**), 4-terc-butil-piridina (4-tbpy) (**6**), 4-(dimetil)aminopiridina (dmap) (**7**), and 4-aminopiridina (ampy) (**8**) (MOREIRA, M.B et al.,2016). Ficou demonstrado que os grupos acetatos sofrem os efeitos da densidade eletrônica dos ligantes axiais coordenados aos íons Ru. Esta mistura orbital é esperada, pois os orbitais $d(x_2\text{-}y_2)$', d_x'$_z$' and d_y'$_z$' dos íons Ru apresentam simetria adequada para combinar-se com os orbitais dos acetatos em ponte. Nestes complexos, que apresentam um ligante carbonil (CO), o orbital Ru (II) d_{yz}' interage com o ligante CO, que acaba por influenciar a densidade eletrônica dos grupos acetatos em ponte. Foi observado também que os valores dos deslocamentos químicos das metilas dos acetatos, são influenciados pela acidez/basicidade relativa dos ligantes axiais, como ficou demonstrado pela correlação desses sinais com o pKa dos ligantes (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; MOREIRA, M.B et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017). É importante destacar que neste caso o pKa é apenas uma medida indireta da acidez ou basicidade dos ligantes axiais, o qual reflete o caráter aceitador ou retirador de elétrons dos ligantes.

Recentemente, observou-se também a extensão para a periferia dos complexos trinucleares do sistema π-deslocalizados, para a série de complexos simétricos com ligantes azanaftalenos ($[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]PF_6$ onde L = (1) quinazolina (qui), (2) 5-nitro-isoquinolina (5-nitroiq), (3) 5-bromo-isoquinolina (5-briq), (4) isoquinolina (iq), (5) 5-amino-isoquinolina (5-amiq), (6) 5,6,7,8 tetra-hidro-isoquinolina (thiq). Para estes complexos, embora os três ligantes axiais sejam iguais, os resultados de TD-DFT e DRX indicaram que a simetria dos complexos é C_{2v} e não D_{3h}, como seria o esperado. Foi observada uma distância de ligação maior Ru-Ox central, a qual causa distorção na estrutura dos complexos e consequentemente a quebra de simetria. Além disso, estudos relacionados com a densidade de spin nestes complexos, mostraram que a densidade eletrônica esta principalmente no núcleo $[Ru_3O(OAc)_6]$, mas também há uma contribuição dos ligantes axiais. Neste caso, a densidade eletrônica do elétron desemparelhado apresenta-se parcialmente deslocalizada, não somente na unidade metálica, mas também nos acetatos e ligantes axiais (POSSATO, B et al.,2017).

Os exemplos acima mostram que, apesar destes complexos serem estudados a mais de 80 anos, suas propriedades eletrônicas e eletroquímicas são intrigantes e ainda podem ser exploradas.

Com relação às propriedades eletroquímicas, os carboxilatos trinucleares de rutênio simétricos e assimétricos possuem vários estados de oxidação acessíveis. Os voltamogramas cíclicos de complexos simétricos, em acetonitrila, apresentam uma série de ondas monoeletrônicas reversíveis atribuídas a pares redox sucessivos, de II,II,II a IV,IV,III. Estas ondas apresentam uma separação de cerca de 1V, o que caracteriza um sistema deslocalizado com forte interação entre os íons metálicos de rutênio. O valor de potencial referente a cada processo redox, também depende da natureza dos ligantes axiais coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$, sendo que os potenciais podem ser modulados pela natureza π-receptora ou σ-doadora destes ligantes (TOMA, H.E et al.,2001; POSSATO, B et al.,2017).

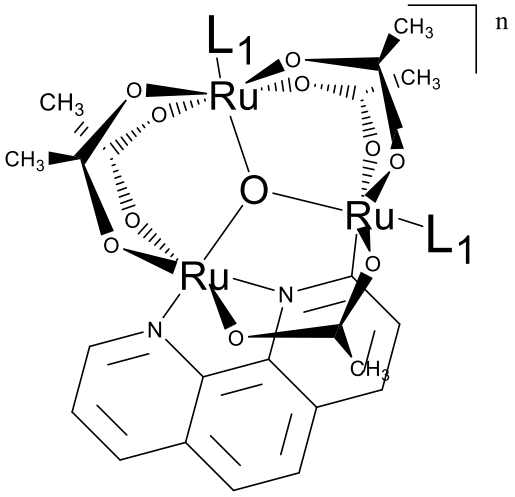
Nos Trabalhos publicados no final de 80 e década de 90, os pesquisadores observaram que o potencial relacionado ao par redox $Ru^{III}Ru^{II}Ru^{II}/Ru^{II}Ru^{II}Ru^{II}$ varia em função do pH. Abaixo de pH = 4 (meio ácido) ocorre a saída do átomo de oxigênio central nos carboxilatos. Este processo é reversível e o comportamento observado em meio aquoso, pode ocorrer em acetonitrila se houver traços de água. O processo eletroquímico pode ser repetido muitas vezes e não é observado decomposição do cluster. De acordo com o comportamento eletroquímico, a dependência do pH observada em solução aquosa, pode estar associada com a eliminação do íon oxigênio central na espécie Ru(III,III,II), pois quando o pH diminui a eliminação do íon oxigênio central é favorável, conduzindo a um produto intermediário Ru(III,II,II) que sofre redução e o produto final é a espécie Ru(II,II,II). A saída do oxigênio está diretamente relacionada com o papel desempenhado por ele na estabilização dos orbitais do rutênio, por meio da doação de elétrons π para os orbitais vazios dos íons Ru (d_{yz}) (TOMA, H.E et al.,1989). Quando o cluster é totalmente reduzido, os orbitais d_{yz} tornam-se "ricos" em densidade eletrônica e este tipo de interação entre os orbitais não é mais favorável, facilitando a transferência do íon oxigênio para as espécies doadoras de próton no solvente (TOMA, H.E et al.,1989).

Com relação às propriedades fotofísicas dos carboxilatos trinucleares de rutênio, ainda há poucos estudos reportados, uma vez que estes complexos apresentam tempo de vida muito curto no estado excitado. Kubiak e colaboradores exploraram as propriedades fotofísicas dos carboxilatos (dímeros) para compreender as reações de transferência de elétrons entre estes complexos e porfirinas (KUBIAK, C.P et al.,2014; 2015).

1.3 Clusters trinucleares de rutênio com ligantes bidentados

De maneira geral as estruturas dos carboxilatos apresentam o seguinte arranjo $[(Ru_3O)(OAc)_6(L)_3]^n$. Como descrito anteriormente, os três íons metálicos de rutênio permanecem mantidos em um arranjo trigonal, pelo átomo de oxigênio central e seis pontes de acetato, sendo que diferentes ligantes axiais podem ser coordenados nos átomos de rutênio (TOMA, H.E et al.,2001). Em contraste com os numerosos estudos destes complexos com diferentes ligantes axiais, a substituição de uma das pontes de acetato por um ligante bidentado começou a ser mais explorada nos últimos 14 anos, com a obtenção do seguinte arranjo estrutural $[Ru_3O(OAc)_5(L_1)(L_2)_2]^n$, onde L_1 = ligante bidentado e L_2 = ligantes monodentados, Figura 5 (CHEN, J et al.,2005).

Figura 5: Representação da estrutura geral do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(phen)(L_1)_2]^n$, onde L_1 = piridina e phen = 1,10-fenantrolina



Fonte: Autora.

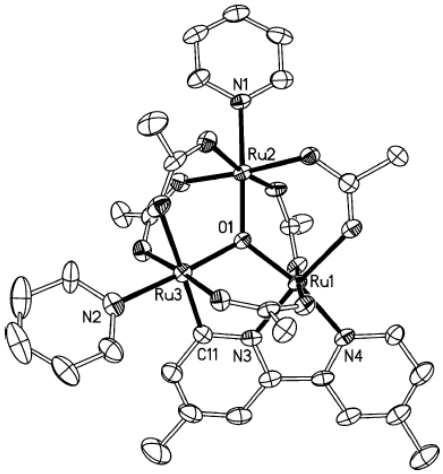
Para os complexos $[(Ru_3O)(OAc)_6(L)_3]^n$ as pontes de acetato são estabilizadas por seis unidades $[Ru_2O(OAc)]$, sendo que para obtenção dos complexos $[Ru_3O(OAc)_5(L_1)(py)_2]^n$ uma destas unidades precisa ser desfeita. Desta forma, a substituição da ponte acetato é muito mais difícil do que a coordenação dos ligantes axiais (CHEN, J et al.,2009).

No que diz respeito às rotas sintéticas para a obtenção destes novos complexos, efeitos como o aumento da temperatura não favorecem sua formação. Estudos reportados na literatura relatam que o núcleo dos complexos pode ser danificado com o

aumento da temperatura (YUN,Y et al.,2007). Em 2005, Chen e colaboradores reportaram as sínteses dos compostos em condições brandas (temperatura ambiente) na presença de ligantes bidentados N-heterocíclico, os quais apresentaram baixa energia dos níveis π* (CHEN, J et al.,2005).

As reações dos novos complexos são originadas a partir do precursor $[(Ru_3O)(OAc)_6(py)_2(MeOH)]PF_6$, o qual apresenta uma molécula de metanol coordenada a um dos íons metálicos de rutênio. Ao reagir este precursor com um ligante bidentado N-heterocíclico, a ligação *orto* C - H deste ligante pode ser ativada e clivada. Desta forma, é possível formar estruturas com uma das pontes de acetato substituídas por um ligante N-heterocíclico, Figura 6. Chen, J e colaboradores destacam, que a utilização deste precursor é muito importante para as sínteses dos novos complexos. Tentativas de sínteses foram realizadas com um precursor simétrico, $[(Ru_3O)(OAc)_6(py)_3]PF_6$ e as reações não ocorreram (CHEN, J et al.,2005).

Figura 6: Estrutura de difração de raios X do complexo $[Ru_3O(OAc)_5\{\mu\text{-}\eta^1(N),\eta^2(N,N)\text{-}4,4'\text{-dimetil-}2,2'\text{ bipiridina}\}(py)_2](PF_6)$



Fonte: Adaptado de CHEN, J et al.,2005.

Dependendo do ligante bidentado coordenado nestas estruturas, a carga formal do complexo pode variar e então ocorrer a formação de complexos oxidados ou reduzidos. Neste caso, os íons metálicos de rutênio apresentam estados de oxidação Ru^{III} Ru^{III} Ru^{III} ou Ru^{III} Ru^{III} Ru^{II} respectivamente. No trabalho de Chen, J e colaboradores foram estudadas as propriedades de complexos oxidados com ligantes bidentados, da classe das bipiridinas substituídas ($[Ru_3O(OAc)_5\{\mu\text{-}\eta^1(C),\eta^2(N,N)\text{-bipiridina}\}(py)_2](PF_6)$) (CHEN, J et al.,2005). Em 2007, estes autores também estudaram as propriedades de complexos reduzidos, coordenados a ligantes bidentados

da classe das azobipiridinas ($[Ru_3O(OAc)_5\{\mu\text{-}\eta^1(N),\eta^2(N,N)\text{-azobipiridina}\}(py)_2](PF_6)$) (YUN, H et al.,2007).

A primeira estrutura de difração de raios X para um carboxilato trinuclear de rutênio, com cinco pontes de acetato, foi apresentada primeiramente em 2005 por Chen, J e colaboradores, para a estrutura do complexo $[Ru_3O(OAc)_5\{\mu\text{-}\eta^1(N),\eta^2(N,N)\text{-4,4'-dimetil - 2,2'bipiridina}\}(py)_2](PF_6)$, Figura 6.

Por meio deste resultado foi possível confirmar que o ligante bidentado se coordena na unidade $[Ru_3O]^n$ da seguinte maneira: $\mu\text{-}\eta^1(C),\eta^2(N,N)$. Isto sugere que os dois átomos de nitrogênio do ligante bidentado estejam coordenados a um centro de rutênio, enquanto que o carbono *orto* em relação a um nitrogênio se liga ao outro átomo de rutênio (CHEN, J et al.,2005). Observou-se que os comprimentos das ligações $Ru\text{-}O_{central}$ para os três íons metálicos de rutênio apresentam pequenas variações, quando comparados aos valores observados para os complexos: $[(Ru_3O)(OAc)_6(py)_3]PF_6$ e $[(Ru_3O)(OAc)_6(py)_2(L)]PF_6$. Tal fato indica que os complexos deste tipo apresentam carga formal +1 (CHEN, J et al.,2005). Observou-se também que os três centros de rutênio se encontram em ambientes com geometria octaédrica distorcida, sendo que o ângulo de ligação Ru-O-Ru coordenado ao ligante bpy, é maior do que os ângulos Ru-O-Ru onde estão coordenados os ligantes piridínicos axiais (36,5º>18,8º>13,0º). Esta observação sugere que realmente o ligante bidentado substitui uma das pontes de acetato durante a reação (CHEN, J et al.,2005).

No que tange ao desenvolvimento deste Projeto de Pesquisa, o objetivo principal foi explorar as características e propriedades químicas, dessa nova classe de carboxilatos trinucleares de rutênio com ligantes bidentados da classe das fenazinas. Estes ligantes derivados das fenantrolinas são classificados como intercaladores, pois apresentam grande capacidade de intercalação com o DNA, lipofilicidade e também citotoxicidade frente a algumas linhagens celulares (KOMOR, A.C et al.,2013). Desta forma, estudos de cunho biológico também foram realizados para investigar as atividades citotóxicas destes novos complexos, bem como os modos de interação com biomoléculas alvo, como o DNA e HSA.

2. Aplicação dos compostos de coordenação na área biológica

2.1 Utilização dos metalofármacos na terapia do câncer

Em tempos remotos já se utilizavam ervas e drogas com a intenção de curas de dores e indisposições, as quais eram manipuladas por feiticeiros (ZANINI, C. A.,1982). Essas práticas e utilizações eram tão comuns que no início do século XX William Osler mencionou: "*o que diferencia os homens dos animais é o desejo dos primeiros serem medicados"* (DELUCIA, R.,2007).

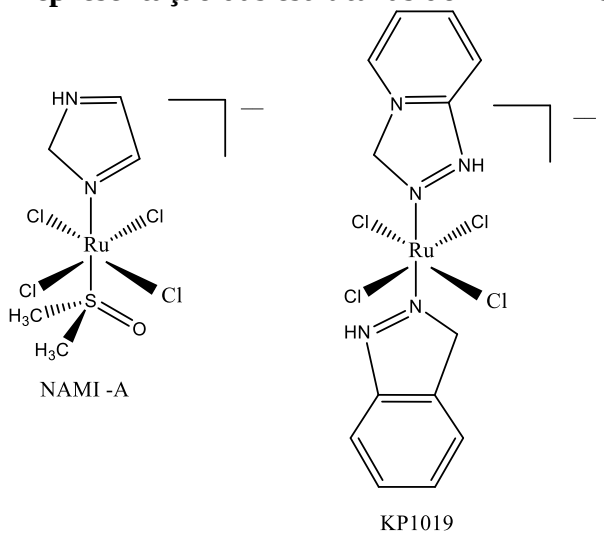
Neste cenário, o interesse por compostos químicos no tratamento do câncer teve ínicio em 1942, quando se observou a redução de um caso de linfoma em um paciente tratado com mecloretamina (mostarda nitrogenada), (ROBERTS JR, T.G et al.,2005). Após 20 anos resultados interessantes foram obtidos, relacionados à cura de leucemia em camundongos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida (DEVITA, V.T et al.,2008). Com o avanço nas pesquisas, muitos quimioterápicos foram aprovados para comercialização visando o tratamento do câncer, no entanto a busca do fármaco ideal permanece até os dias de hoje (PASETO, L.M et al.,2006; FDA.,2019).

Neste sentido, os compostos contendo íons metálicos em sua constituição começaram a ser investigados quanto às suas propriedades para as aplicações biológicas (ORVIG, C et al.,1999). Os metalofármacos se destacam, pois além de apresentarem um íon metálico em sua constituição, também apresentam propriedades farmacológicas interessantes (RANG, H.P et al.,2007; SILVA, D.O.,2010; ALESSIO, E et al.,2017). No final da década de 60, um dos primeiros metalofármacos investigado e que apresentou atividade antitumoral muito importante foi o complexo *cis*-diaminodicloroplatina(II), cisplatina, responsável pela cura de diferentes tipos de câncer, especialmente câncer de próstata e bexiga. Além da cisplatina, outros metálofármacos a base deste metal também são comercializados mundialmente, como a carboplatina e a oxaplatina (ROSEMBERG, B et al.,1965; FUERTES, M.A et al.,2003).

A descoberta destes metalofármacos despertou o interesse de diversas pesquisas para a utilização de complexos metálicos como possíveis agentes antitumorais, sendo que muitos pesquisadores começaram a estudar as propriedades de complexos metálicos de rutênio para aplicações biológicas (MESTRONI, G et al.,1987, PAVAN, F.R et al., 2010, 2011; SANTOS, E.R et al.,2013). No que diz respeito à utilização destes complexos para o tratamento de câncer, é importante destacar que dois complexos de rutênio chegaram aos testes clínicos: NAMI-A e KP1019, Figura 7. Apesar de

apresentarem baixa citotoxicidade a diferentes linhagens de células cancerígenas, apresentaram efeito inibitório pronunciado e seletivo em tumores em fase de metástase (SAVA, G et al.,2003; MESSORI, L et al.,2000).

Figura 7: Representação das estruturas do NAMI-A e KP1019

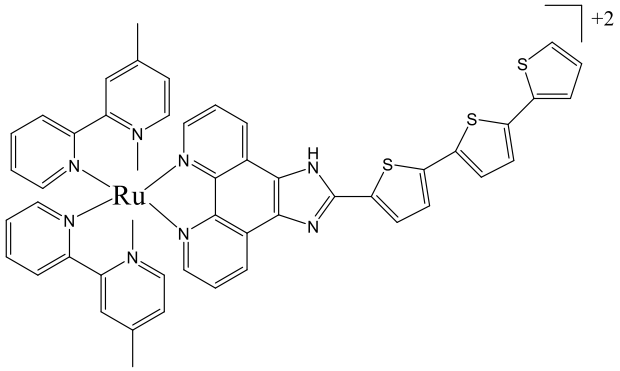


Fonte: Autora.

A síntese do NAMI-A foi apresentada em 1989 e cerca de 10 anos depois foram reportados os resultados referentes a utilização deste complexo na fase I e II dos ensaios clínicos. No entanto não houve continuidade na pesquisa com o NAMI-A, pois testes em humanos mostraram que o complexo apresenta toxicidade significativa (KEPPLER, B.K., et al.,1986; PACOR, S et al.,1991).

As propriedades biológicas dos complexos de rutênio também têm sido investigadas para aplicações destes complexos como fotossensibilizadores, em TFD (terapia fotodinâmica) para o tratamento do câncer (ALBANI, B.A et al.,2014; ARORA, K et al.,2018). Nos últimos anos houve um progresso significativo nos estudos destes complexos. Em 2018 o primeiro complexo fotossensibilizador de Ru (II), (TLD1433 - Figura 8) começou a ser investigado em testes clínicos em humanos para aplicação em TFD, especificamente no tratamento não invasivo do câncer de bexiga (MONRO, S et al.,2018).

Figura 8: Estrutura do primeiro complexo de Ru (II) utilizado como fotossensibilizador em PDT (TLD1433)



Fonte: Autora.

Considerando as aplicações destes complexos, muitos trabalhos foram apresentados na literatura com hipóteses e conteúdos, ressaltando a importância da utilização de complexos contendo o íon metálico de rutênio em aplicações biológicas (ALESSIO, E,.2017; NIKOLAOU, S et al.,2018).

Por muito tempo, algumas hipóteses, relacionadas às propriedades dos complexos de rutênio, foram reconhecidas como verdades absolutas e apresentadas em diversos trabalhos reportados na literatura. Contudo, recentemente Alessio, E, um dos pesquisadores envolvido com as pesquisas do NAMI-A, apresentou de forma bem detalhada os "mitos" e "verdades" que estão relacionados com o papel dos complexos contendo íons metálicos de rutênio no organismo (ALESSIO, E,.2017). Recentemente este texto foi revisado por nosso grupo de pesquisa, que publicou em revista nacional um texto fazendo uma crítica ao uso indiscriminado desses "mitos" na construção dos textos sobre metalofármacos de rutênio (NIKOLAOU, S et al.,2018). Apresenta-se abaixo uma discussão geral desses trabalhos (ALESSIO, E,.2017; NIKOLAOU, S et al.,2018).

Muitos trabalhos apresentados na literatura justificam a utilização dos complexos de rutênio com a apresentação das seguintes hipóteses:

(1) Os compostos de rutênio têm baixa toxicidade porque o rutênio mimetiza o ferro;

(2) Os compostos de Ru(III) apresentam constantes lentas na troca de ligantes, comparáveis com os fármacos de Pt(II);

(3) Os mecanismos de ação dos complexos de rutênio poderiam estar relacionados com a hipótese de ativação destes fármacos por redução, uma vez que os íons metálicos de rutênio apresentam diversos estados de oxidação;
(4) Os compostos de rutênio acumulam-se especificamente em tecidos de câncer;
(5) A absorção dos compostos de rutênio pode ser mediada pela transferrina.

O rutênio é um metal de transição e encontra-se na Tabela Periódica na mesma família do ferro, um metal essencial para o organismo. Com relação à abordagem química, muitos elementos da mesma família podem compartilhar das mesmas propriedades. Contudo, a comparação das propriedades do ferro e rutênio deve ser analisada com muito cuidado, uma vez que ao levar em consideração a formação de complexos, os ligantes coordenados nos íons metálicos interferem diretamente nas propriedades dos complexos. (KAPITZA, S., et al.,2005; ALESSIO, E,.2017, NIKOLAOU, S et al.,2018).

Muitos trabalhos também discutem que os compostos de rutênio apresentam constantes lentas na troca de ligantes, comparáveis com os fármacos Pt(II), O mecanismo de ação da cisplatina está relacionado com a perda dos ligantes cloretos, os quais são substituídos por moléculas de água no meio intracelular e com isso favorece a ligação covalente da cisplatina nas bases nitrogenadas do DNA, e como consequência desta ligação ocorre a inibição da replicação celular (KOMOR, A.C et al.,2013). No caso dos complexos de rutênio, as considerações sobre as cinéticas de substituição dos ligantes devem ser discutidas considerando aos estados de oxidação dos íons metálicos de rutênio (Ru(II) ou Ru(III)) (SEDDON, E.A., 2013; ALESSIO, E,.2017).

As três hipóteses (3-5), relacionadas basicamente com o mecanismo de ação dos complexos de rutênio, apresentam argumentos generalistas. Estudos indicam que o ambiente de uma célula ou tecido tumoral é redutor como consequência do metabolismo acelerado destas células neoplásicas, as quais consomem muito oxigênio e liberam metabólitos reativos no meio intracelular. Desta forma, pesquisadores atribuem a hipótese de ativação dos complexos de Ru por redução, uma vez que íons metálicos de rutênio podem apresentar diversos estados de oxidação, sendo esta uma discussão muito geral e pouco realista (ALESSIO, E,.2017).

Em relação ao acúmulo e absorção dos complexos de rutênio no organismo Alessio, E destaca que este tipo de característica é especifica de cada arranjo estrutural e que necessita de estudos detalhados, uma vez que o ambiente fisiológico é muito complexo e a utilização de experimentos modelos como interação com alvos

específicos: albumina, DNA, transferrina, hemoglobina, devem ser realizados e analisados com rigor científico para não levar a atribuições equivocadas dos mecanismos de ação dos complexos (ALLARDYCE, C.S et al.,2001; ALESSIO, E,.2017).

Neste sentido, é importante destacar que no campo da pesquisa algumas generalizações das teorias ou/e hipóteses podem levar a interpretações equivocadas dos resultados, principalmente nos estudos relacionados com o desenvolvimento de novos compostos para aplicações biológicas. Uma vez que o meio biológico é bem complexo e o comportamento *in vivo* não é algo previsível, pois nem sempre obedece a uma teoria pré-estabelecida (ALESSIO, E,.2017).

No entanto, o nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos sistemáticos com o objetivo de compreender as propriedades químicas dos carboxilatos trinucleares de rutênio em atividades biológicas (CARNEIRO, Z et al.,2014; CACITA, N et al.,2015, CACITA, N et al.,2016).

2.2 Reatividade dos clusters trinucleares de rutênio em modelos biológicos

Os carboxilatos trinucleares de rutênio podem ser investigados para diversas aplicações (TOMA, H.E et al.,2001; GLOVER, S.D et al., 2010). Contudo, no que diz respeito à área biológica, poucos trabalhos investigaram a atividade destes complexos.

Em meados de 2002 e 2005 Toma, H. E e colaboradores apresentaram os estudos de dois complexos nitrosilos $[Ru_3O(OAc)_6(L)_2(NO)]PF_6$ (L = piridina e 4-picolina) indicados como potenciais liberadores de óxido nítrico (NO) (TOMA, H.E et al.,2002; TOMA, H.E et al.,2005) No ano de 2010 Liu, M e colaboradores investigaram, por meio de modelagem molecular e comparação com outros complexos de rutênio, a atividade (teórica) do cluster $[Ru_3O(OAc)_6(MeOH)_3]^+$ com a HSA, sendo que os resultados obtidos sugerem a formação de um aduto do cluster com a HSA (LIU, M et al.,2010). Em 2012 Felds, J. D e colaboradores estudaram a aplicação dos carboxilatos trinucleares de rutênio como biossensor eletroquímico de proteínas (FELD, J.D et al.,2012). Recentemente, em nosso grupo de pesquisa cinco trabalhos investigaram a interação com biomoléculas e a atividade biológica de alguns carboxilatos trinucleares de rutênio. Avaliou-se a citotoxicidade dos nitrosilos complexos $[Ru_3O(OAc)_6(L)_2(NO)]PF_6$(onde L = 4-picolina, 4-acetil-piridina e 4-tert-butil piridina) na presença de células tumorais e sadias (CARNEIRO, Z et al.,2014; SILVA, C.F.N et

al.,2018). Os complexos nitrosilos também demonstraram ser eficientes para promover o efeito de vasodilatação em aortas de ratos (CACITA, N et al.,2015; SILVA, C.F.N et al.,2018). Além disso, os modos de interação destes carboxilatos com a HSA e os parâmetros termodinâmicos desta interação foram determinados (CACITA, N et al.,2015; CACITA, N et al.,2016; SILVA, C.F.N et al.,2018). No caso dos carboxilatos simétricos com ligantes azanaftalenos, uma investigação detalhada mostrou que os complexos apresentam atividade tripanocida em diferentes concentrações (POSSATO, B et al.,2017). Testes *in vitro* foram realizados e ficou demonstrado que cluster $[Ru_3O(OAc)_6(THIQ)_3]PF_6$ apresenta atividade maior que a droga de referência (no Brasil, o benzinidazol) tanto para a forma tripomastigota do parasita T. Cruzi (fase aguda da doença de Chagas) quanto para a forma amastigota (fase crônica da doença), sem apresentar citotoxicidade para linhagem de célula saudável.

O nosso grupo de pesquisa tem contribuído para o estudo desta classe de compostos na área biológica, sendo que até o presente momento foram investigadas as atividades biológicas de alguns complexos com diferentes ligantes axiais. Além da observação das propriedades biológicas, nosso grupo também verificou que a atividade anticâncer dos complexos parece depender fortemente dos ligantes axiais L, enquanto a vasodilatação não. Neste sentido, estudos recentes têm o objetivo principal de compreender os mecanismos de interação destes carboxilatos com biomoméculas alvo, DNA e HSA. Estudos desta natureza podem fornecer resultados da distribuição e transporte de futuros metalofármacos no organismo (LIU, H.K et al.,2011; PAGES, B.J et al.,2017; TIMERBAEV, A.R et al.,2006).

3. Ligantes intercaladores e interação dos complexos metálicos com biomoléculas alvo

3.1 Ligantes intercaladores: fenantrolinas estendidas como os derivados da [3,2-a;2',3'-c] fenazina (dppz)

Os ligantes dipiridofenazinas (dppz), também conhecidos como fenantrolinas estendidas combinam propriedades interessantes, como planaridade e rigidez, além de possuírem uma estrutura altamente conjugada e aromática, bem como capacidade de coordenação bidentada (FEES, J. et al.,1993). Os ligantes (dppz, dppz-CH_3, dppz-Cl e

dppn) apresentam a extensão do sistema π devido à presença da porção diaza nas estruturas. Estes ligantes são conhecidos como intercaladores, pois a coordenação destes ligantes orgânicos em metais de transição pode levar à interação com DNA e como consequência influenciar diferentes atividades biológicas.

Os complexos metálicos coordenados com estes ligantes apresentam uma ampla faixa de aplicações reportadas na literatura, como exemplo: elevada citotoxicidade em linhagens de células tumorais, resistência menor do que a cisplatina e interação com o DNA (FRICKER, S.P.,2007).

Muitos estudos desta natureza foram conduzidos pelo grupo da pesquisadora Jacqueline K Barton. Em 1992 foi demonstrado que os complexos com ligantes dppz ($[Ru(bpy)_2DPPZ]^{2+}$, $[Ru(phen)_2DPPZ]^{2+}$), devido a extensão da conjugação π, são mais eficientes na intercalação com o DNA em comparação com o complexo $[Ru(phen)_3]^{2+}$. Além do mais, foram exploradas as propriedades luminescentes destes complexos (HARTSHORN, R.M et al.,1992).

Devido à capacidade de coordenação destes ligantes em diferentes íons metálicos, (Pt^{+}, Rh^{3+}, Ru^{2+}, Fe^{2+}), e à possibilidade de obtenção de diferentes arranjos estruturais, essa classe de ligantes têm sido bem explorada (TERBRUEGGEN, R.H et al.,1998; HOLMLIN, R.E et al.,1998; WIJAYA, K et al.,2004). Recentemente Liao e colaboradores reportaram a capacidade do complexo $[Ru(phen)_2DPPZ]^{2+}$ inibir a bactéria *M. smegmatis*, causadora da tuberculose (LIAO, G et al.,2017).

3.2 DNA

O DNA (ácido desoxirribunucleíco), molécula da vida, é constituído por unidades monoméricas de nucleotídeos (CALLADINE, C.R et al.,2004; NEVES, A.P et al.,2011). Cada nucleotídeo consiste de um açúcar de 5 carbonos (desoxirribose), uma base contendo nitrogênio ligada ao açúcar e um grupo fosfato, sendo que o DNA é formado por quatro tipos diferentes de nucleotídeos, diferindo apenas da base nitrogenada (adenina, citosina, guanina e timina) (CALLADINE, C.R et al.,2004; NEVES, A.P et al.,2011). Os ácidos nucleicos estocam e transmitem a informação genética nas células, fornecendo instruções sobre quais proteínas devem ser sintetizadas. Com relação à sua estrutura, o DNA é uma macromolécula de cadeia dupla (dupla hélice de DNA), na qual duas cadeias polinucleotídicas, unidas por forças termodinâmicas fracas, formam uma molécula de DNA (CALLADINE, C.R et al.,2004; NEVES, A.P et al.,2011).

No que diz respeito a pesquisas de novos medicamentos, o DNA é um alvo biológico importante de muitos fármacos que são usados em terapias medicinais ou estão em fase de clínica de estudos (WARING, M.J.,1981). Sabe-se que ao atingir o DNA pode-se regular as funções celulares, por meio da modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação celular (KOMOR, A.C et al.,2013).

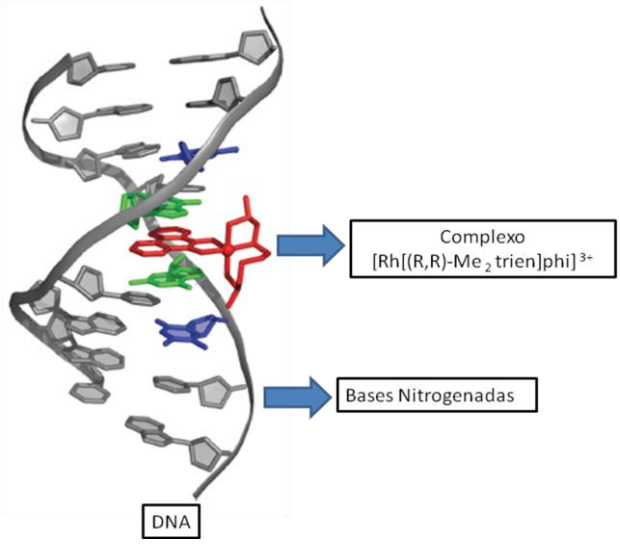
O DNA representa um importante alvo para os complexos metálicos, com os quais pode interagir por meio de interações covalentes e não covalentes (KOMOR, A.C et al.,2013).

As interações covalentes ocorrem basicamente pela formação de adutos na presença de moléculas pequenas, os quais causam à inibição completa do DNA e consequentemente a morte celular. Como exemplo mais conhecido destaca-se a cisplatina (KOMOR, A.C et al.,2013).

As interações denominadas não covalentes são geralmente reversíveis e podem mudar a conformação do DNA, gerando vários efeitos na expressão genética. Essas interações são conhecidas como: intercalação, inserção e ligação nas cavidades do DNA (KOMOR, A.C et al.,2013).

O processo de intercalação foi observado pela primeira vez por Dwyer, em meados de 1950, durante o estudo da atividade biológica do complexo $[Ru(phen)_3]^{2+}$ (phen = 1,10 fenantrolina) (DWYER, F.P et al.,1952). Desde então, outros estudos também investigaram os modos de interação desse complexo com o DNA e os parâmetros termodinâmicos envolvidos nesta interação (MUDASIR et al.,1999). Para ocorrer a intercalação, é necessário que o complexo apresente um ligante heterocíclico aromático e neste tipo de interação ocorre o empilhamento entre os dois pares de bases adjacentes do DNA, com sobreposição de elétrons π, Figura 9. Neste processo de intercalação pode ocorrer a deformação da estrutura do DNA e a inibição da replicação celular. Os complexos metálicos que assumem este tipo de interação são denominados metalointercaladores e muitos avanços nesta classe de complexos foram explorados pelo grupo da pesquisadora Jacqueline K. Barton (HARTSHORN, R.M.,et al.,1992; WEIDMANN, A.G et al.,2015). A caracterização estrutural de um complexo que apresenta este tipo de interação foi reportada em 1995, para o complexo de ródio (Δ-α-$[Rh[(R,R)\text{-}Me_2trien]phi]^{3+}$), (HUDSON, B.P et al.,1995; KOMOR, A.C et al.,2013).

Figura 9: Representação do mecanismo de intercalação entre um complexo metálico e do DNA



Fonte: Adaptado de KOMOR, A.C et al.,2013.

A inserção pode ocorrer quando o complexo apresenta pelo menos um ligante heterocíclico planar, sendo que o complexo se insere completamente no DNA deslocando as bases nitrogenadas (KOMOR, A.C et al.,2013).

Para os compostos se ligarem nos sulcos do DNA é necessário a presença de varios anéis aromáticos em sua estrutura, os quais apresentam rotação livre e permitem a formação de interações hidrofóbicas ou ligações hidrogênio. Além disso, a estrutura do composto deve ser curvada para permitir o "encaixe" no DNA, como exemplo: a netropsina e distamisina (KOMOR, A.C et al.,2013).

Além dos tipos de interações descritas acima, outro mecanismo pode levar a modificação e dano na estrutura do DNA. A clivagem do DNA está relacionada a importantes mecanismos biológicos, pois por meio desta interação pode ocorrer transcrição, tradução celular e também ocorrer transformações que levam ao dano do DNA (KR, S.G et al.,2014). O mecanismo de clivagem pode ocorrer por vias oxidativas ou por hidrólise da ligação fosfodiéster presente na estrutura do DNA. Neste sentido os complexos metálicos têm sido amplamente investigados, pois suas propriedades redox bem como a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singleto, podem induzir a clivagem do DNA (SUN, Y et al.,2010).

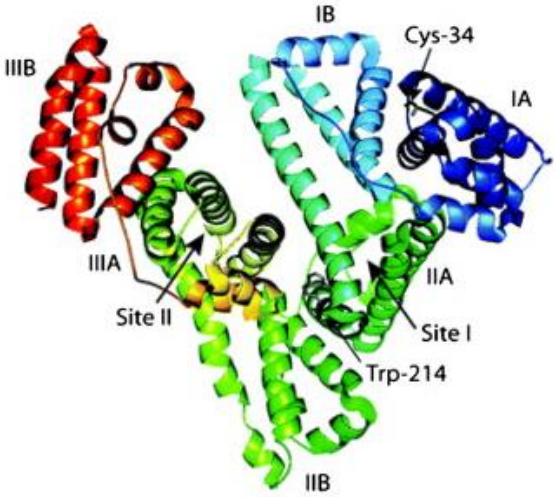
A compreensão destes modos de interação é importante para o design de novos complexos que apresentem estruturas que favoreçam a interação com o DNA. Como

discutido anteriormente o DNA é um alvo valioso e a compreensão dos modos de interação dos complexos metálicos com o DNA é ainda desafiadora.

3.3 Albumina do soro humano (HSA)

A albumina do soro humano (HSA) é uma proteína globular (66kDa) sendo a mais abundante do plasma sanguíneo, a qual representa mais de 50% das proteínas séricas (PETERS, T.Jr.,1995; FANALI, G et al.,2012; SLEEP, D et al.,2013). A HSA apresenta forma de coração e sua estrutura primária é constituída por 585 resíduos de aminoácidos, dispostos em uma cadeia polipeptídica (FANALI, G et al.,2012; SLEEP, D et al.,2013). A estrutura da HSA apresenta três domínios pincipais e cada um apresenta dois subdomínios (A e B), sendo que os subdomínios IIA e IIIA são responsáveis pelo armazenamento de compostos e são conhecidos como sítios I e II de Sudlow (PETERS, T. Jr.,1995), Figura 10.

Figura 10: Estrutura cristalina da albumina sérica humana (HSA) e a localização de seus principais sítios de ligação



Fonte:Protein Data Bank 1ha2.

Destaca-se como principal função fisiológica da albumina a ligação e transporte de muitos compostos, dentre eles: ácidos graxos, hormônios e fármacos (Peters, 1996). A HSA pode ligar-se reversivelmente a diferentes tipos de ligantes e estas interações, principalmente de fármacos influenciam na sua absorção, metabolismo, distribuição e excreção (ESPÓSITO, B.P et al.,2002). Desta forma, estudar os mecanismos de interação entre novos metalofármacos e a HSA é muito importante, principalmente para

determinação de características importantes como: biodisponibilidade e toxicidade (ESPÓSITO, B.P et al.,2002).

Neste sentido, muitos trabalhos publicados investigam os modos de interação de potenciais fármacos com a HSA (TIMERBAEV, A.R et al.,2006; CACITA, N et al.,2015;2016; ČANOVIĆ, P et al.,2017; DA SILVA, C.F.N et al.,2018). As interações fármacos-HSA geralmente são monitoradas por técnicas que permitem avaliar alterações na conformação da proteína na presença dos fármacos. Como exemplo, é possível acompanhar alterações na fluorescência da albumina por meio de medidas de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, uma vez que a HSA apresenta resíduos de aminoácidos fluorescentes (triptofano - posição 214 e tirosina) (FANALI, G et al.,2012).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa contribuir com as discussões acerca das propriedades químicas dos clusters trinucleares de rutênio. Neste sentido o objetivo principal deste trabalho foi sintetizar uma nova classe de clusters trinucleares de rutênio com ligante bidentado ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]PF_6$, onde py = piridina, **$L_1$** = benzo[i]dipirido[3,2-a:2′,3′-c]fenazina (dppn), **L_2** = dipirido[3,2-a:2’,3’-c]fenazina (dppz), **L_3** = 7-metildipirido[3,2-a:2’,3’-c]fenazina ($dppzCH_3$), **L_4** = 7-clorodipirido[3,2-a:2’,3’-c]fenazina (dppzCl), **L_5** = 1,10 fenantrolina (phen), e por meio das técnicas de caracterização, investigou-se o efeito nas propriedades eletrônicas e eletroquímicas após a substituição de uma ponte acetato por um ligande bidentado. Além do mais, foram estudadas as propriedades fotofisicas destes novos clusters, bem como a atividade biológica em modelos celulares e de interação com as biomoléculas alvo, HSA e DNA.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar os ligantes bidentados (dppz, $dppzCH_3$, dppzCl e dppn), bem como caracterizá-los por meios das técnicas de espectroscopia UV-Vis, IV, RMN (^1H - RMN, ^{13}C - RMN, COSY, HMQC, HMBC) e determinar o pKa dos ligantes.

- Sintetizar os novos clusters trinucleares de rutênio (**1-5**), ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]PF_6$, onde (**1**) L_1 = dppn, (**2**) L_2 = dppz, (**3**) L_3 = $dppzCH_3$, (**4**) L_4 = dppzCl, (**5**) L_5 = phen);

- Caracterizar os clusters **(1-5)** por meio de técnicas espectrocópicas (UV-Vis, IV, RMN, EPR), eletroquímica (voltametria ciclíca), espectrometria de massas e análise elementar;

- Estudar as propriedades fotofísicas dos clusters trinucleares de rutênio;

- Avaliar a citotoxicidade dos clusters na presença de células tumoral (B16F10) e não tumoral (L929) em modelos *in vitro;*

- Investigar a interação dos clusters **(1-5)** com biomoléculas alvo, DNA e HSA, por meio de diferentes técnicas.

Capítulo 2:

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES BIDENTADOS E CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO: PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESPECTROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS

1. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Procedência dos solventes e reagentes

Os reagentes listados abaixo foram obtidos comercialmente e não passaram por purificação prévia.

Solventes	Procedência
Acetona	Neon
Acetonitrila	J.T.Baker
Acetonitrila-d_3	Sigma Aldrich
Acetonitrila deuterada	Sigma Aldrich
Benzeno	Cinética Química
Diclorometano	Neon
diclorometano-d_2	Sigma Aldrich
Etanol	Synth
Éter etílico	Chemco
Metanol	Synth
Ligantes	**Procedência**
Piridina	Sigma Aldrich
4-acetilpiridina	Sigma Aldrich
4-terc-butilpiridina	Sigma Aldrich
1,10-fenantrolina	Sigma Aldrich
Reagentes	**Procedência**
Ácido acético glacial	Sigma Aldrich
Ácido fórmico	Neon
Ácido nítrico	Neon
Ácido sulfúrico	Synth
Acetato de sódio trihidratado	Ecibra
Alumina, Al_2O_3, 150 mesh, 58 Å	Sigma Aldrich
Brometo de potássio	Sigma Aldrich
Br_2	Merck
Cloreto de mercúrio	Sigma Aldrich

Hidrazina	Vetec
Hexafluoro fosfato de amônio	Sigma Aldrich
Hexafluorofostato de tetrabutilamônio	Hexafluorofostato de tetrabutilamônio
$RuCl_3.3H_2O$	Sigma Aldrich
Peneira molecular	Sigma Aldrich
Tris base, $NH_2C(CH_2OH)_3$, 99%	Merck

1.11 Purificação do solvente diclorometano

Foi realizada a purifição para o diclorometano, sendo este o principal solvente utilizado nas sínteses dos novos complexos. A purifição foi realizada de acordo com procedimento reportado na literatura (ARMAREGO, W.L.F; LI LIN CHAI, C.,2009).

1.2 Sínteses dos ligantes

As sínteses dos ligantes foram realizadas de acordo com o descrito por Butsch e colaboradores (BUTSCH, K et al.,2010). De maneira geral, as sínteses das dipiridofenazinas consistem na reação da 1,10-fenantrolina-5,6-diona com a diamina substituída de interesse. O ligante (**5**) phen foi obtido comercialmente (Sigma Aldrich) e não foi previamente purificado. O ligante (**1**) dppn foi sintetizado, caracterizado e fornecido pelo grupo de pesquisa da Profa Dra Claudia Turro (FOXON, S.P et al.,2012). Desta forma, para elaboração deste trabalho foram sintetizados os ligantes (**2-4**), dppz, dppzCH_3 e dppzCl.

Síntese do ligante (2) *dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina* (dppz): A 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,400 g; 1,90 mmol) foi solubilizada em 40 mL de etanol a quente. A esta solução foi adicionado o-fenilenodiamina (0,34 g, 3,15 mmol), previamente solubilizado em 5 mL de etanol. A reação foi mantida sob agitação, em refluxo (T = 60 ºC), por 4 horas. A solução amarela tornou-se laranja e houve formação de precipitado. O sólido foi isolado por filtração e lavado com etanol gelado, com 20 mL de uma solução 0,5 M de $NaHCO_3$ e com água em abundância. Obteve-se 0,41 g do ligante, $C_{18}H_{10}N_4$, (MM=282,30 g/mol, 1,45 mmol, η= 77%).

Síntese do ligante (3) *7-metildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina* (dppzCH$_3$): Em um balão de 50 mL solubilizou-se a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,400 g; 1,90 mmol) em 40 mL de etanol a quente. A esta solução foi adicionado o 3,4-diaminotolueno (0,232 g; 1,90 mmol) solubilizado em 5 mL de etanol. A reação foi mantida no sistema de refluxo (T = 60ºC), em agitação por 4 horas. Em seguida, o aquecimento foi desligado e a reação foi mantida sob agitação por mais 20 horas. O solvente foi rotoevaporado e o sólido obtido foi recristalizado em etanol gelado. O sólido isolado apresenta coloração bege. Obteve-se 0,31 g do ligante, $C_{19}H_{12}N_4$, (MM= 296,33 g/mol, 1,05 mmol, η= 55 %).

Síntese do ligante (4) *7-clorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina* (dppzCl):A 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,400 g; 1,90 mmol) foi solubilizada em 40 mL de etanol a quente. A esta solução foi adicionada a 4-cloro-o-fenilenodiamina (0,270 g; 1,90 mmol) solubilizada em 5 mL de etanol. A reação foi mantida sob agitação, em refluxo (T = 60ºC), por 4 horas e no final o volume da solução foi reduzido no rotaevaporador. Ocorreu mudança de coloração do meio reacional de amarelo para roxo. Quando a solução atingiu a temperatura ambiente houve formação de precipitado, que foi isolado por filtração e lavado com etanol gelado. Obteve-se 0,31 g do ligante, $C_{18}H_9N_4Cl$, (MM= 316,74 g/mol, 0,98 mmol, η= 52 %).

1.3 Sínteses dos precursores

As sínteses dos precursores foram realizadas de acordo com adaptações de rotas sintéticas descritas na literatura (BAUMANN, J.A et al.,1978; SPENCER, A et al., 1972; TOMA, H.E et al.,2001).

<u>Etapa 1:</u> Síntese do precursor (1) [Ru$_3$O(OAc)$_6$(CH$_3$OH)$_3$]CH$_3$COO: Em um balão de 500 mL adicionou-se 5 g de $RuCl_3.3H_2O$ (MM=261,47 g/mol, 19,12 mmol) com 10 g de $Na(CH_3COO).3H_2O$ (MM=136,08 g/mol; 73,49 mmol) em uma mistura de 125 mL de etanol e 125 mL de ácido acético glacial. O sistema foi mantido em refluxo por 4 horas (T = 80°C). A solução obtida foi armazenada em geladeira por uma noite para decantar o excesso de $Na(CH_3COO).3H_2O$. O sólido formado foi separado por filtração, e o filtrado rotoevaporado até a formação de um óleo. Neste produto adicionou-se 100 mL de metanol e rotoevaporou-se novamente até a secagem. Repetiu-se o procedimento

três vezes. Após esta etapa adicionou-se 200 mL de acetona para a precipitação do complexo, o qual foi isolado por filtração, com sucessivas lavagens de éter etílico e seco ao ar sob vácuo em dessecador contendo sílica gel. A coloração do meio reacional se alterou de marrom-avermelhado para verde. Obteve-se 5,15 g do cluster mãe (MM= 828,64 g /mol, 6,21 mmol).

<u>Etapa 2:</u> Síntese do precursor (2) [$Ru_3O(OAc)_6(CO)(CH_3OH)_2$]: Em um balão de 100 mL de três bocas, protegido da luz, adicionou-se 60 mL de metanol e 1,0 g do cluster mãe. Neste balão conectou-se o sistema gerador de CO (gerado a partir da reação entre HCOOH e H_2SO_4), ambos os balões foram desaerados com argônio por 20 minutos e mantidos em agitação. Em seguida abriu-se a conexão entre os dois sistemas e saturou-se o meio reacional com $CO_{(g)}$ por 20 minutos. Em seguida adicionou-se no meio reacional seis pastilhas de amálgama de zinco recém preparadas. O meio reacional permaneceu em banho de gelo e protegido da luz em borbulhamento contínuo de CO durante 6 horas. A solução inicial passou da coloração verde para roxo. A solução resultante foi rotoevaporada até a secagem e o sólido roxo obtido foi mantido em dessecador com sílica gel até secagem. Obteve-se 0,26 g do complexo (MM= 765,56 g/mol, 0,34 mmol, η=28%).

<u>Etapa 3:</u> Síntese do precursor (3) [$Ru_3O(OAc)_6(CO)(py)_2$]: Em um balão de fundo redondo de 100 mL dissolveu-se 0,50 g do precursor **(2)**, [$Ru_3O(OAc)_6(CO)(CH_3OH)_2$], em 50 mL de metanol e 0,35 mL (4,33 mmols) de piridina. Este sistema foi desaerado com argônio por 30 minutos e a reação foi mantida em agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Após a síntese, o balão foi mantido em geladeira por uma noite. Houve a precipitação de um sólido muito fino, o qual foi isolado por centrifugação e em seguida mantido em dessecador com sílica gel e abrigo da luz até a secagem completa. Nesta reação o meio reacional modificou-se de roxo para azul. Obteve-se 0,25 g do precursor **(3)** (MM= 859,68 g/mol, 0,29 mmol, η=45%).

<u>Etapa 4:</u> Síntese do precursor (4) [$Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)(py)_2$]$PF_6$: Em um balão de 500 mL, 0,50 g (0,58 mmol) do precursor **(3)** [$Ru_3O(OAc)_6(CO)(py)_2$] foi dissolvido em 230 mL de CH_2Cl_2, e adicionou-se, lentamente, 50 mL de uma solução de Br_2, 0,15 M, em CH_2Cl_2. A solução foi agitada por 20 minutos e em seguida rotoevaporou-se até a secagem completa. O composto foi dissolvido em 40 mL de metanol e mantido em

refluxo por 30 min. Em seguida, adicionou-se 10x de excesso de NH_4PF_6 solubilizado em um pequeno volume de metanol. A solução foi mantida em geladeira por 12 horas e o precipitado, (coloração azul), formado foi filtrado e em seguida seco ao ar. Obteve-se 0,20 g de complexo precipitado (MM= 1008,68 g/mol, 0,20 mmol, η= 34 %).

1.4 Sínteses dos novos complexos (1-5)

As sínteses dos complexos (**1-5**) foram realizadas de acordo com adaptações da rota sintética reportada por Chen, J e colaboradores (CHEN, J et al.,2005). Os complexos 1-4 são inéditos e o complexo (5) foi anteriormente sintetizado por Chen, J e colaboradores. Contudo também serão apresentados os resultados e discussão das caracterizações deste complexo com o ligante phen para fins de comparação com dados coletados todos nas mesmas condições experimentais.

Síntese do complexo (1) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]PF_6$: Em um balão (50 mL) de três bocas solubilizou-se o precursor (**4)** (100,08 mg, 0,10 mmol) e o ligante $\mathbf{L_1}$ (98,8 mg, 0,297 mmol) em 25 mL de diclorometano seco e tratado previamente. O sistema foi protegido da luz e mantido em atmosfera de argônio seco e agitação por 2 dias a temperatura ambiente. A coloração do meio reacional modificou-se de azul para marrom escuro. A solução obtida foi concentrada a vácuo e o produto foi purificado por coluna cromatográfica empacotada com alumina neutra e utilizou-se como fase móvel DCM/ACN (1/1(v)). Obteve-se 0,054 g do complexo purificado (MM= 1249,95 g/mol, 0,043 mmol, η= 45%). Análise elementar (%) calculada para $C_{42}H_{37}F_6N_6O_{11}PRu_3$; C:40,25; H:2,97; N:6,71. Experimental: C:40,50; H:2,94; N:6,68.

As sínteses dos complexos (**2-5**) foram realizadas de acordo com o procedimento descrito para obtenção do complexo (1), sendo que em cada etapa foi utilizado o respectivo ligante L_2 - L_5 de interesse.

Síntese do complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]PF_6$: Em um balão (50 mL) de três bocas solubilizou-se o precursor (**4)** (100 mg, 0,10 mmol) e o ligante $\mathbf{L_2}$ (41,3 mg, 0,14 mmol) em 25 mL de diclorometano seco e tratado previamente. O sistema foi protegido da luz e mantido em atmosfera de argônio seco e agitação por 2 dias a temperatura ambiente. Houve modificação da coloração do meio reacional de azul para verde. A solução obtida foi concentrada a vácuo e o produto foi purificado por coluna

cromatográfica empacotada com alumina neutra e utilizou-se como fase móvel 80% DCM e 20% ACN. Obteve-se 0,062 g do complexo purificado (MM= 1199,89 g/mol, 0,052 mmol, η= 52%). Análise elementar (%) calculada para $C_{38}H_{35}F_6N_6O_{11}PRu_3$; C:37,51; H:2,98; N:6,90. Experimental: C:37,58; H:2,98; N:6,89.

Síntese do complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]PF_6$: No caso do complexo **(3)**, foram utilizados (100,0 mg, 0,10 mmol) do precursor **(4)** e (38,6 mg, 0,13 mmol) do ligante **(L_3)**. O meio reacional ao final da síntese apresentou coloração verde. A solução foi rotoevaporada e o sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica com alumina neutra (fase estacionária) e 50% DCM e 50% ACN (fase móvel). Obteve-se 0,055 g do complexo purificado (MM= 1213,92 g/mol, 0,045 mmol, η= 46%). Análise elementar (%) calculada para $C_{39}H_{37}F_6N_6O_{11}PRu_3$;C:38,48; H:3,06; N:6,91. Experimental: C:38,43; H:3,04; N:6,89.

Síntese do complexo (4) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]PF_6$. Para o complexo **(3)** utilizou-se (100,0 mg, 0,10 mmol) do precursor **(4)** e (41,2 mg, 0,13 mmol) do ligante **(L_4)**. O sistema foi mantido em agitação por 2 dias e o meio reacional passou de azul para verde. A solução foi rotoevaporada e o sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica, onde se utilizou como fase estacionária sílica gel e fase móvel 50% DCM/ACN. Obteve-se 0,058 g do complexo purificado (MM= 1234,35 g/mol, 0,047 mmol, η= 47%). Análise elementar (%) calculada para $C_{38}H_{34}F_6N_6O_{11}ClPRu_3$; C:36,89; H:2,77; N:6,80. Experimental: C:36,85; H:2,76; N:6,81.

Síntese do complexo (5) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]PF_6$: Para obtenção deste complexo, solubilizou-se o precursor **(4)** (128,0 mg, 0,12 mmol) e o ligante L_5 (22,2 mg, 0,12 mmol) em 25 mL de diclorometano seco e tratado previamente. Após 48 h de agitação, foi observado modificação da coloração do meio reacional de azul para verde. A solução obtida foi concentrada a vácuo e o produto foi purificado por coluna cromatográfica empacotada com alumina neutra e utilizou-se como fase móvel 50% DCM/ACN. Obteve-se 0,060 g do complexo purificado (MM= 1097,80 g/mol, 0,055 mmol, η= 46%). Análise elementar (%) calculada para $C_{32}H_{33}F_6N_4O_{11}PRu_3$; C, 34.91; H,5,09; N, 3,02. Experimental: C, 34.89; H, 5.07; N, 3.01

1.5 Equipamentos e métodos utilizados

1.51 Determinação do pKa dos ligantes (2-4)

Os valores de pKa dos ligantes **(2–4)** foram determinados por procedimento experimental, utilizando-se o método espectrofotométrico (CUNHA, C.J.,1989). As soluções tampão foram preparadas na faixa de pHs de 1,00 a 8,00, pelas misturas dos seguintes sais: (Tampão Ácido Cítrico - Na_2HPO_4 e Tampão Tris·HCl, $NH_2C(CH_2OH)_3$), (MORITA, T; ASSUMPÇÃO, M.V.,1976). Para todas as soluções, utilizou-se 2 % de DMSO, devido à baixa solubilidade dos ligantes em meio aquoso. As mudanças espectrais foram registradas em um espectrofotômetro modelo HP8453, AGILENT, em comprimentos de onda máximos específicos de cada ligante.

1.52 Análise Elementar

As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio %C, %H, %N foram obtidas no equipamento: Analisador elementar - Perkin Elmer 2400 series ii, presente na Central Analítica - Instituto de Química - USP - São Paulo e também no CENTC Elemental Analysis Facility University of Rochester, NY 14627 USA

1.53 Espectrometria de massas

Os espectros foram obtidos em Espectrômetro de Massas (ultrOTOFQ - ESI-TOF Mass Spectrometer - Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Condições experimentais: bomba de infusão (MODELO: COLE PARMER) 300,0 µl/h; End Plate: 500 V; Capilaridade: 2500 V; Saída de capilaridade: 300,0 Volts. As amostras foram solubilizadas em acetato de etila, alíquotas dessas amostras foram retiradas, adicionadas em uma mistura de metanol: água (8:2 v/v) e avaliadas no modo de detecção negativo e positivo. O Aparelho é de Alta Resolução e necessita de calibração interna antes da realização das análises. Usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10mg/ml(TOF).

1.54 EPR

As análises de EPR foram realizadas no Departamento de Química da Universidade de Ohio (The Ohio State University, CBEC Analytical Spectroscopy Laboratory). Utilizou-se o instrumento Bruker EMXPlus equipado com ColdEdge Cryostat, operando na banda X (frequência, 9.4 GHz; potência 20 mW). As amostras dos complexos (**1-5**)

foram preparadas em solução de acetonitrila, 1,0 mM. Para a obtenção dos espectros de EPR as amostras foram congeladas préviamente em nitrogênio liquído. Os espectros foram registrados em triplicata à 10 K.

1.55 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN

Os espectros de RMN, (^{1}H, COSY, ^{13}C, HMQC, HMBC) para os ligantes sintetizados foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance 300/400/500 MHz, utilizando-se DMSO deuterado (solvente) sendo o TMS a referência interna.

Os espectros de RMN (^{1}H, COSY) foram registrados no espectrômetro 400 MHz Avance III no Departamento de Química da Universidade de Ohio (The Ohio State University). Os espectros foram registrados em DCM deuterado, 10^{-2} M, sendo o TMS a referência interna.

1.56 Espectroscopia eletrônica UV-Visível

Os espectros eletrônicos foram obtidos no espectrofotômetro UV-visível – Agilent - modelo 8453, com varredura na região de 190 nm a 1100 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1.0 cm de caminho óptico. Os máximos de absorção foram determinados diretamente dos espectros obtidos e utilizados para determinação do coeficiente de absortividade molar (ε), por meio da Lei de Lambert-Beer.

1.57 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho dos complexos foram registrados em pastilhas de KBr, na região de 450 a 4500 cm^{-1}, em um espectrofotômetro IR Prestige 21 Shimadzu com resolução de 2 cm^{-1}. Para as análises pesou-se aproximadamente 3 mg dos compostos e 200 mg de KBr.

1.58 Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em um potenciostato/galvanostato de EG & G Applied Research Princeton, modelo 273, utilizando-se eletrodos de platina (trabalho e auxiliar) e Ag/AgCl como eletrodo de referência, em uma solução 0.1 M do eletrólito suporte hexafluorofosfato de tetrabutilamônio ($TBAPF_6$), nos seguintes solventes: solução de acetonitrila (complexos) e solução de dimetilsufóxido (ligantes), sendo que os solventes foram previamente secos. Como padrão interno, após as medidas, utilizou-se ferroceno. Desta forma comparou-se as ondas redox do complexo em estudo com o potencial do par ferrocino/ferroceno, que apresenta uma onda em 0,4 V (*vs* EPH),

assim foi possível eliminar os erros da medida devido ao potencial de junção líquida (SKOOG et al.,2006).

1.59 Espectroeletroquímica

As medidas de espectroeletroquímica foram realizadas com um potenciostato (Autolab modelo PG stat 30) acoplado ao espectrofotômetro (Agilent 8453, com faixa espectral na região de 190 a 1100 nm) e uma célula eletroquímica fornecida pelo Prof. Koiti Araki (Instituto de Química - USP - SP), para realização dos estudos. A célula eletroquímica consiste de uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm, um eletrodo de trabalho de ouro (mini *grid* 2,0 x 0,9 cm) com espessura menor que 0,2 mm, e um cubo de quartzo polido, cuja função é limitar o caminho óptico (0,2 mm). Desta forma, a solução permanece diretamente em contato com o *grid*, e isto evita os processos relacionados à difusão. O eletrodo auxiliar utilizado foi de platina e o eletrodo de referência Ag/AgCl, ambos devidamente dimensionados para a miniaturização do sistema. Para os complexos (**1-5**) os experimentos foram realizados em solução de acetonitrila ($5{,}0 \times 10^{-4}$ M), com aplicação de diferentes potenciais (0,00 V a -1,50 V).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Síntese e caracterização dos ligantes

2.1.2 Sínteses

As sínteses dos ligantes (dppz, dppzCH_3, dppzCl) foram realizadas conforme descrito na literatura (BUTSCH, K. et al.,2010). O ligante (**1**) dppn foi sintetizado, caracterizado e fornecido pelo grupo de pesquisa da Profa Dra Claudia Turro (FOXON, S.P et al.,2012). No entanto, neste trabalho serão discutidos os principais resultados de caracterização dos ligantes (**2-4**), dppz, dppzCH_3, dppzCl.

Os ligantes bidentados (**1-4**) pertencem à classe das dipiridofenazinas. As sínteses destes ligantes consistem na condensação de diaminas aromáticas substituídas com dionas aromáticas. Estas reações são favorecidas por solventes polares-próticos, os quais favorecem o ataque nucleofílico da amina primária no carbono carbonílico, (C=O), sendo esta espécie parcialmente deficiente de elétrons (CLAYDEN, J et al.,2006).

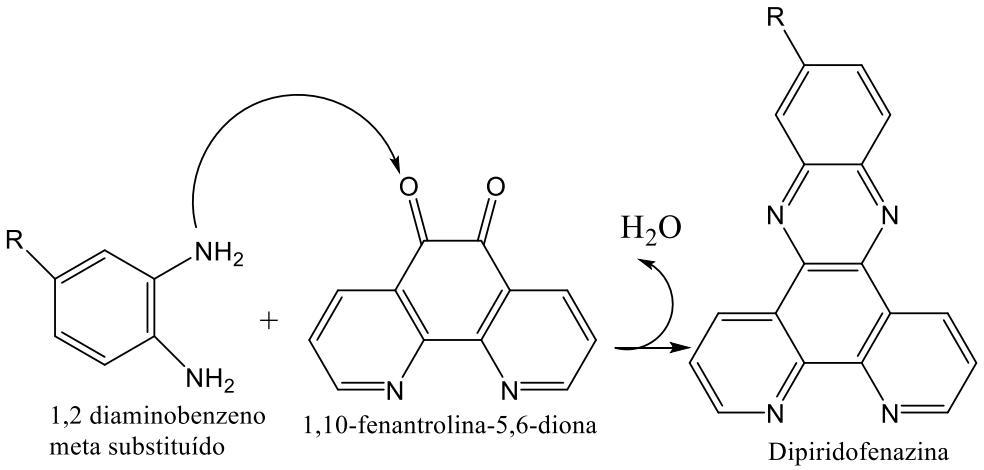
O produto final desta reação é uma imina, as quais são formadas pela reação de cetonas com aminas primárias (LOUDON, M et al.,2009). O mecanismo de formação da imina começa como uma adição nucleofílica ao grupo carbonila da cetona. Neste caso, o nucleófilo é a amina (diaminas aromáticas), que reage com a cetona (1,10-fenantrolina-5,6-diona), o que gera um produto de adição instável chamado carbinolamina, Figura 11. A carbinolamina apresenta em sua estrutura um grupo amina (LNH_2, LNHR ou LNR_2) e um grupo hidroxi no mesmo carbono, Figura 11 (LOUDON, M et al.,2009). Este ataque nucleofílico ocorre, pois os nitrogênios da diamina aromática apresentam densidade eletrônica para atacar os carbonos da dicetona, os quais apresentam carga parcial positiva, devido à maior eletronegatividade do átomo de oxigênio ligado a este carbono.

Em seguida ocorre um rearranjo na estrutura do intermediário (carbinolamina) e formação de duas moléculas de água, que são excelentes *grupos abandonadores* e como consequência são formadas as ligações duplas nitrogênio-carbono e a estrutura final obtida corresponde ao ligante dipiridofenazina.

De maneira geral, esta é uma reação de adição seguida de eliminação para formar o produto final (imina).

Na Figura 11, apresenta-se o mecanismo geral destas reações (CLAYDEN, J et al.,2006).

Figura 11: Esquema da reação geral de Condensação aromática para obtenção dos ligantes (1-4)



R = H (dppz), CH_3 (dppzCH_3), Cl (dppzCl), C_6H_6 (dppn)

Fonte: Adaptado de CLAYDEN, J et al.,2006.

Estes ligantes da classe das fenazinas estendidas combinam propriedades interessantes, tais como: arranjo aromático planar altamente conjugado, rigidez estrutural e habilidade de coordenação de modo bidentado com diversos centros metálicos (DICKESON, J.E et al.,1970).

Nas estruturas dos ligantes **(1-5)**, os átomos de nitrogênios localizados na porção do anel fenantrolínico são sítios excelentes para a coordenação no modo bidentado com um único centro metálico.

2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Nesta etapa do estudo os resultados obtidos por meio da técnica de RMN foram fundamentais para a caracterização estrutural dos ligantes sintetizados **(2-4)**. É importante destacar que os ligantes não são inéditos, contudo na literatura há poucos trabalhos que apresentam as caracterizações dos ligantes livres (MIRANDA, F.S et al.,2008). Desta forma, por meio dos espectros de ^{1}H, ^{13}C e também com as análises dos espectros de correlação COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC (^{1}H - ^{13}C) e HMQC (^{1}H - ^{13}C) foi

possível confirmar as estruturas dos ligantes sintetizados (**2-4**) (SILVERSTEIN, R.M.,1991; PAVIA, D.,2008).

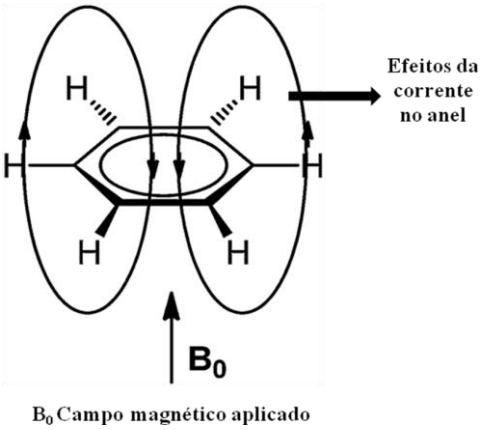
As atribuições dos sinais de ^{1}H e ^{13}C foram realizadas de acordo com as correlações observadas nos espectros e também por meio da comparação dos valores de deslocamento químico reportados na literatura, para os ligantes e estruturas de moléculas análogas. Para as atribuições também foram considerados os efeitos indutivos e magnéticos presentes nas estruturas das moléculas (MIRANDA, F.S et al.,2008). Nas Tabelas 19-21 presentes no **ANEXO I** apresentam-se todos os valores dos deslocamentos químicos atribuídos para os ligantes 2-4.

2.2.1 Espectros de H^1 - RMN e COSY dos ligantes (2 - 4)

Para todos os ligantes (**2-4**), os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram observados na região de campo baixo (7,5 - 9,5 ppm). De maneira geral, isto é observado devido à anisotropia diamagnética, ou seja, o efeito de corrente dos anéis aromáticos presentes nas estruturas dos ligantes contribuem para a grande desblindagem dos hidrogênios dos anéis aromáticos (SILVERSTEIN, R.M.,1991; PAVIA, D.,2008).

O efeito de corrente de anel que é observado nos sistemas aromáticos é bem conhecido. De maneira geral este efeito ocorre, pois, ao ser submetido a um campo magnético externo B_0, os elétrons π do anel aromático passam a movimentar-se e como consequência, isto gera um campo magnético local que apresenta sentido oposto ao campo aplicado B_0 (DE OLIVEIRA, K.T et al.,2009). Deste modo, considerando a região acima do anel aromático o efeito que predomina é a blindagem, uma vez que nesta região o campo magnético local é contrário ao campo aplicado B_0 e neste caso o deslocamento é para campo alto (DE OLIVEIRA, K.T et al.,2009). Por outro lado, na região lateral ao anel (onde se localizam os átomos de hidrogênio) ocorre a chamada desblindagem, uma vez que o campo magnético local se soma ao campo aplicado B_0, Figura 12. Desta forma, os prótons aromáticos tem deslocamentos químicos em região de campo baixo, entre 7 ppm e 9 ppm (SILVERSTEIN, R.M.,1991; PAVIA, D.,2008).

Figura 12: Representação do efeito das correntes e linhas de força induzidas no benzeno



Fonte: Adaptado de DE OLIVEIRA, K.T et al., 2009.

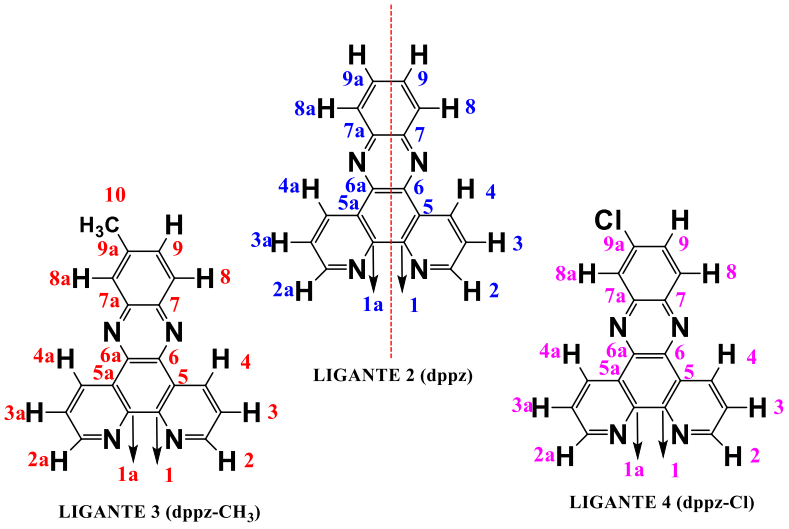
Como demonstrado na Figura 13, a estrutura do ligante **(2)** (dppz) é simétrica, e consequentemente, apresenta hidrogênios equivalentes (H_2=H_{2a} /H_3=H_{3a} /H_4=H_{4a}/ H_8=H_{8a}/ H_9=H_{9a}).A Figura 14 traz o espectro do ligante dppz como representativo da série. A reação de condensação com diaminas substituídas para a obtenção dos ligantes 3 (dppz-CH_3) e 4 (dppz-Cl) resulta em perda do plano de simetria e assim, nos espectros destes ligantes observam-se 7 e 6 sinais de hidrogênios, respectivamente **(ANEXO II).**

Outro efeito observado para todos os ligantes é que o hidrogênio na posição 3 encontra-se mais blindado (~ 7,70 ppm) do que os hidrogênios das posições *orto* 2 e 4, os quais estão desblindados devido ao efeito indutivo da deslocalização de elétrons do átomo de nitrogênio e da porção diaza do anel.

No caso do ligante 3 (dppz-CH_3) os hidrogênios do substituinte CH_3 na posição 9a, aparecem na região de campo alto 2,7 ppm devido ao efeito causado pela maior densidade eletrônica em torno desses hidrogênios **(ANEXO II).**

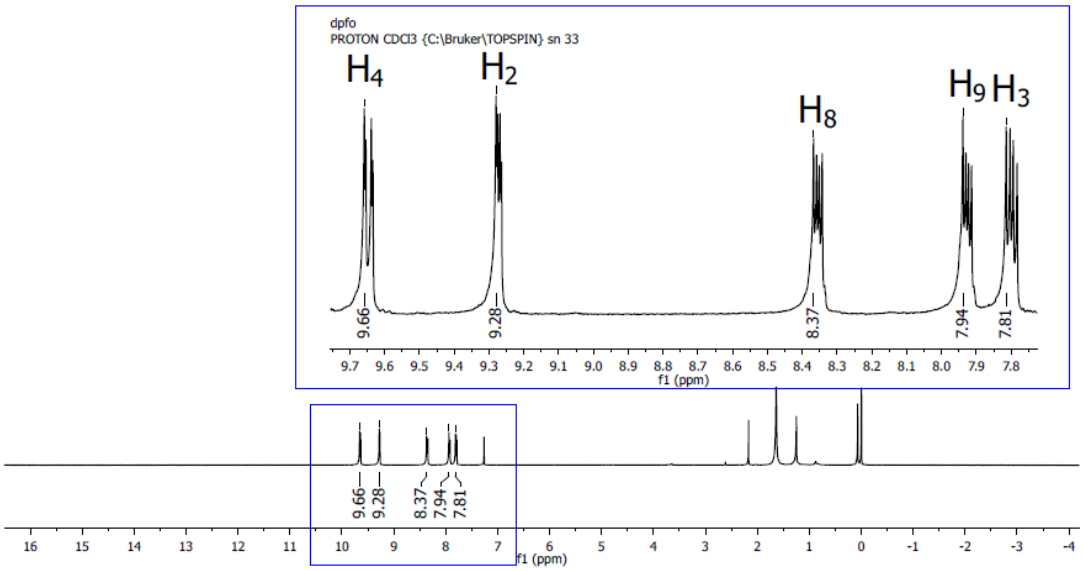
Para o ligante 4 (dppz-Cl) como o átomo de Cl é considerado um doador forte de densidade eletrônica para o anel, os prótons adjacentes a este substituinte tornam-se mais blindados e os sinais aparecem em regiões de campo relativamente alto (H_9 δ=7,82 ppm e H_{8a} δ=8,18 ppm).

Figura 13: Estruturas dos ligantes 2 - 4 com as respectivas numerações dos átomos de carbono e hidrogênio referentes às atribuições dos espectros ^{1}H, ^{13}C, COSY, HMQC e HMBC



Fonte: Autora.

Figura 14: Espectro de 1H - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz)



Fonte: Autora.

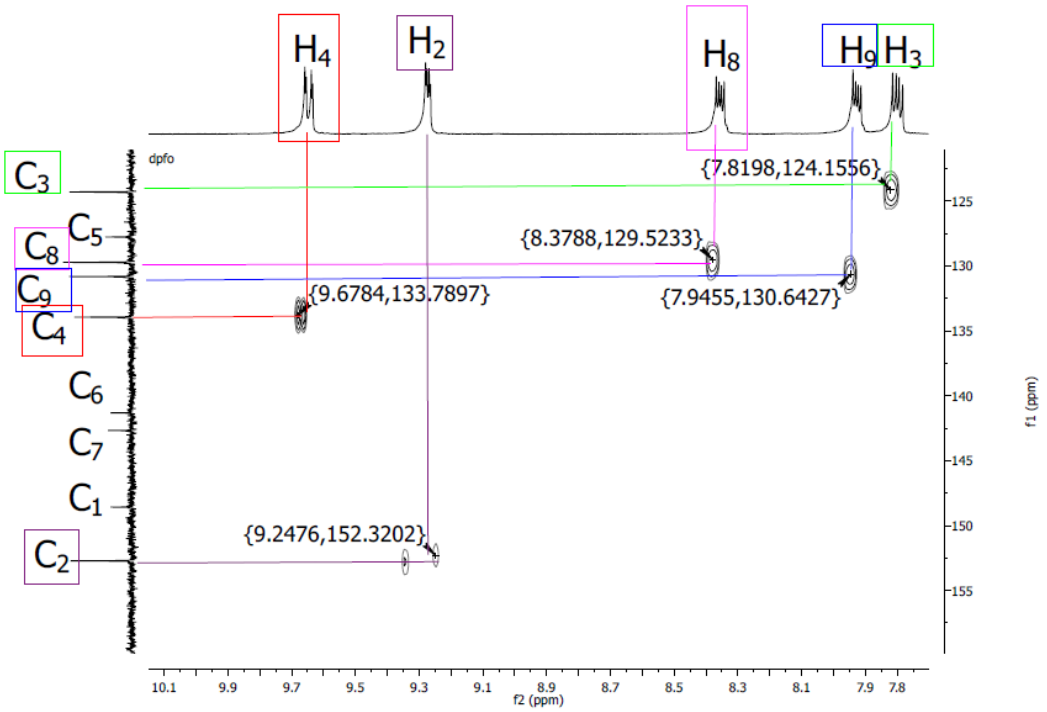
As posições efetivas dos hidrogênios também foram confirmadas por meio das análises dos espectros bidimensionais (2D) de correlação homonuclear ^{1}H-^{1}H COSY, onde foi possível identificar os prótons adjacentes a cada uma das posições analisadas **(ANEXO III).** Por meio dos espectros ^{1}H-^{1}H COSY, foi possível identificar principalmente os prótons das posições 2, 3 e 4.

2.2.2 Espectros de C^{13} - RMN e HMQC e HMBC dos ligantes (2 - 4)

Os espectros de ^{13}C confirmaram os resultados das análises dos espectros de ^{1}H-RMN. Da mesma forma que observado anteriormente, os efeitos indutivos e anisotrópicos influenciam os deslocamentos químicos dos átomos de carbono. Os sinais referentes aos carbonos dos anéis aromáticos foram observados na região de 125 a 150 ppm. Contudo a atribuição correta dos deslocamentos químicos ^{13}C **(ANEXO IV)** apenas foi possível após as análises dos espectros de correlação HMQC e HMBC.

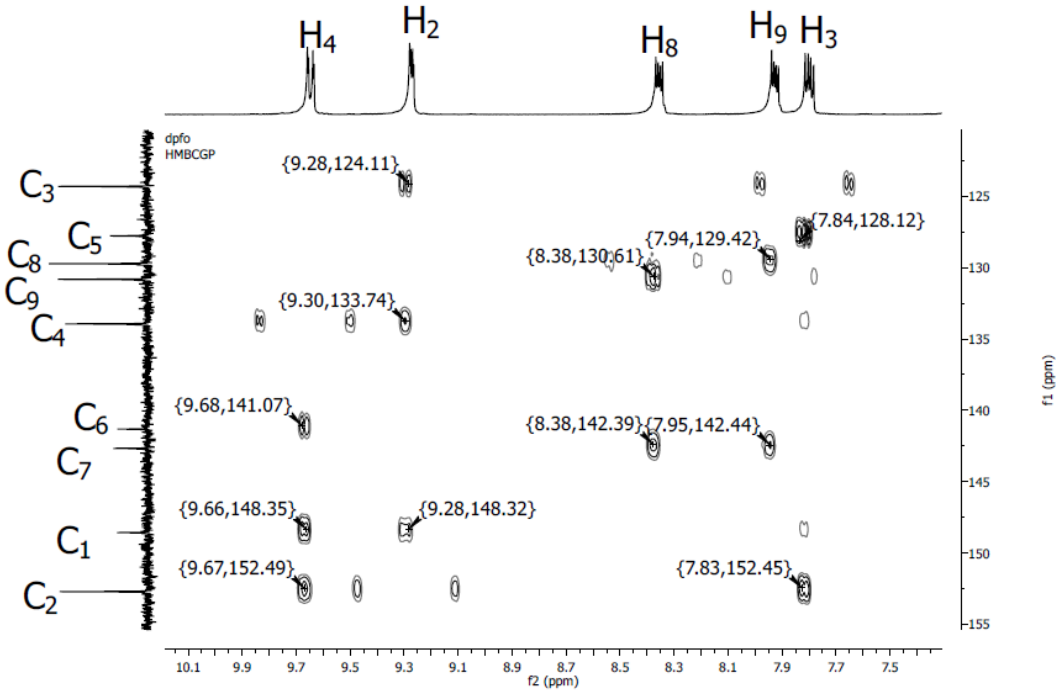
Nos espectros HMQC e HMBC (Figuras 15 e 16) foi possível observar as correlações ^{1}H – ^{13}C a curta distância (J^{1}). Para o ligante 2 (dppz) foram observadas 5 correlações, sendo que os resultados estão de acordo com a estrutura deste ligante, uma vez que há 5 combinações do tipo H - C. No caso dos ligantes 3 (dppz-CH_3) e 4 (dppz-Cl) identificou-se 6 correlações H - C **(ANEXOS V e VI).**

Figura 15: Espectro HMQC (^{1}H - ^{13}C), (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz)



Fonte: Autora.

Figura 16: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz)



Fonte: Autora.

Para completar as atribuições foram analisados os espectros HMBC, o qual permite detectar as correlações ^{1}H – ^{13}C a longa distância, ou seja, apresentam as conexões J^2, J^3 e em alguns casos J^4 **(ANEXOS VI).** Desta forma, os carbonos nas posições 1, 5, 6 e 7, os quais não estão ligados a nenhum átomo de hidrogênio, foram identificados através das correlações com os hidrogênios vizinhos.

O deslocamento químico ^{13}C do CH_3 foi observado na região típica de δ = 22 ppm, confirmando que o ligante com este substituinte foi realmente obtido.

Para todos os ligantes, o deslocamento químico do carbono na posição 2 aparece na região de campo mais em torno de δ = 152 ppm, devido ao efeito indutivo do átomo de nitrogênio vizinho.

2.3 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis-NIR

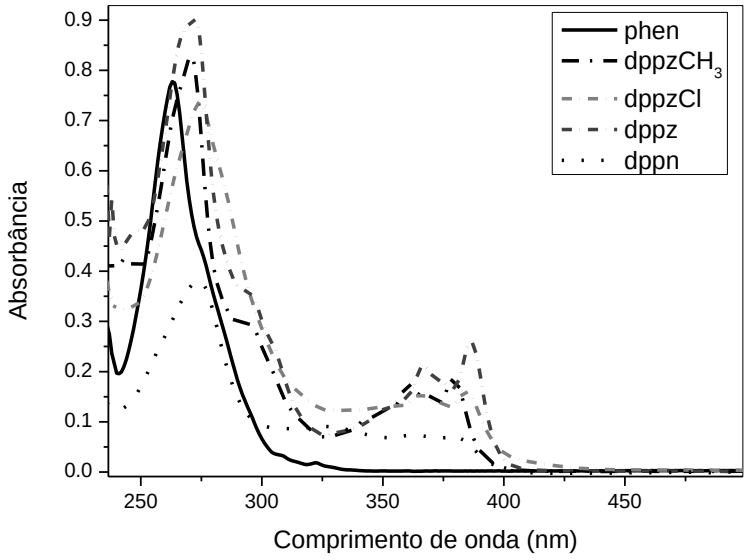
A espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível é uma ferramenta de extrema importância para a caracterização estrutural dos compostos, pois as bandas observadas no espectro eletrônico correspondem às transições eletrônicas entre os níveis

energéticos dos orbitais moleculares de cada composto (PAVIA, D et al.,2008). Neste trabalho todos os ligantes e complexos sintetizados foram avaliados quanto às suas características espectroscópicas na região do UV-Vis e as análises e atribuições das bandas foram realizadas por meio da comparação dos resultados obtidos com trabalhos reportados na literatura (BAUMANN, J.A et al.,1978; TOMA, H.E et al.,1988, 2001; ALEXIOU, A.D.P et al.,2000; CACITA, N et al.,2015; CHEN, J et al.,2005; QIN, J et al.,2012).

Nos espectros eletrônicos dos ligantes (**1-5**), Figura 17, é possível observar bandas na região de alta energia (ultravioleta) associada às transições eletrônicas permitidas π-π* (C=C), (π−π*(aza)) (MIRANDA, F.S et al.,2008). Para os ligantes **(1-4)** também se observa bandas na região de 380 nm que estão relacionadas à extensão do anel aromático e a presença dos grupos substituintes na porção diaza do anel. Estas transições π-π* aparecem nos espectros de moléculas que contém sistemas π conjugados, sendo caracterizadas por alta absortividade molar $\varepsilon_{máx}$>10.000 (PAVIA, D et al.,2008). O perfil de cada espectro esta de acordo com o reportado na literatura (MIRANDA, F.S et al.,2008).

Os valores dos λ_{max} das principais bandas observadas no espectro eletrônico estão apresentados na Tabela 1.

Figura 17: Espectros eletrônicos dos ligantes (1-5) em DMSO



Fonte: Autora.

Tabela 1: Valores de λmáx e ε dos ligantes (1-5)

Ligantes	$\lambda_{máx}$ (nm)/ log ε (mol L^{-1} cm^{-1})
(1) dppn	275 / 4,97 π-π*(phen) 376 / 4,52 π-π*(aza) 330 / 4,45 π-π*(aza)
(2) dppz#	292 / 4,87 π-π*(phen) 268 / 4,71 π-π*(phen) 378 / 4,43 π-π*(aza) 359 / 4,19 π-π*(aza)
(3) dppzCH_3	273 / 4,89 π-π*(phen) 380 / 4,43 π-π*(aza) 362 / 4,41 π-π*(aza)
(4) dppzCl	295 / 4,87 π-π*(phen) 271 / 4,84 π-π*(phen) 387 / 4,53 π-π*(aza) 366 / 4,51 π-π*(aza)
(5) phen#	263 / 4,28 π-π*(phen)

 # Valores retirados da literatura (MIRANDA, F.S., et al.,2008).

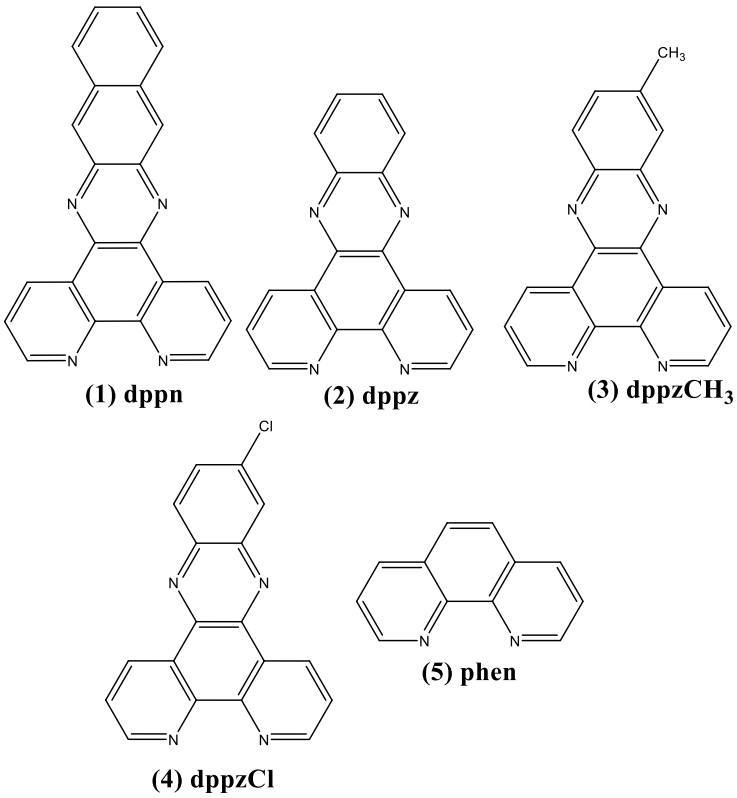
2.4 Determinação dos valores de pKa dos ligantes (1-5)

Com relação aos compostos de coordenação, um aspecto muito discutido é fato de que ligantes coordenados aos centros metálicos afetam diretamente sua reatividade e propriedades. Desta forma, um parâmetro muito utilizado para avaliar a influência dos ligantes nas propriedades dos complexos, é a medida do pKa dos ligantes. Este parâmetro (pKa) é utilizado como uma medida indireta da capacidade dos ligantes de doar ou retirar densidade eletrônica para o complexo metálico (MOREIRA, M.B et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017). Este parâmetro, pKa, está relacionado com a basicidade e reflete a capacidade σ-doadora dos ligantes.Desta forma, com o intuito de se conhecer a influência dos ligantes determinou-se seus valores de pKa por meio de medidas experimentais.

Os valores de pKa dos ligantes, Figura 18, foram determinados experimentalmente, por meio do método espectrofotométrico onde se registrou a

variação da absorbância dos ligantes em um determinado comprimento de onda, em função da variação do pH e os valores de pKa foram determinados a partir da primeira derivada do gráfico de absorbância *versus* pH. Primeiramente, o modelo experimenetal foi investigado para o ligante 1,10 fenantrolina, pois neste caso o valor do pKa pôde ser comparado com o valor de referência da literatura (pKa = 4,80) (PubChem.,*database*).

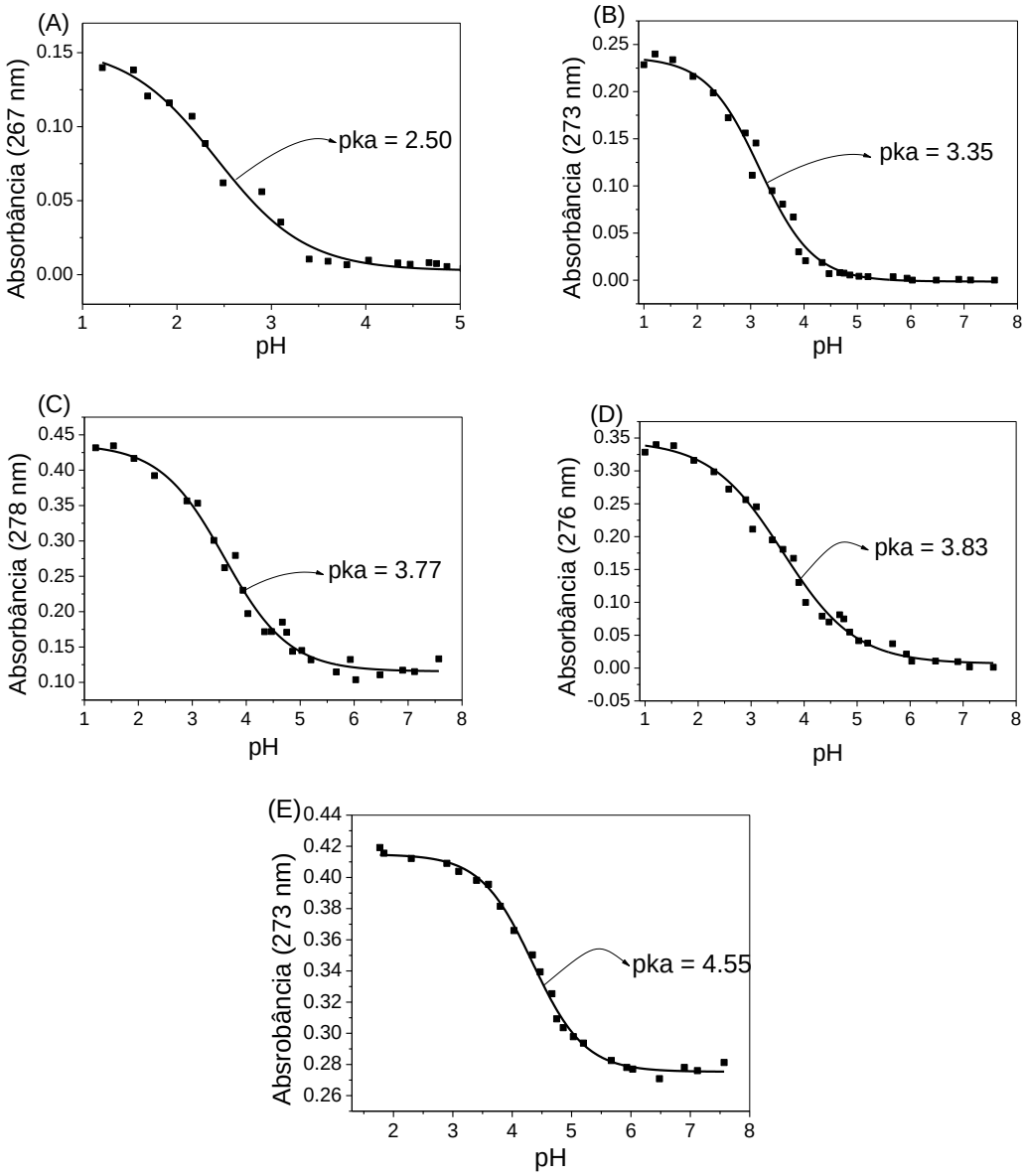
Figura 18: Representação das estruturas dos ligantes (1-5)



Fonte: Autora.

Na Figura 19 apresentam-se os gráficos de absorbância (em determinado comprimento de onda onde se observou variação) *versus* pH. Na Tabela 2 apresentam-se os valores de pKa obtidos pelo método experimental.

Figura 19: Curvas de titulação espectrofotométrica (absorbância versus pH) para os ligantes (dppn (A), dppz (B), dppzCH3 (C), dppzCl (D), phen (E))



Fonte: Autora.

Os valores de pKa obtidos, (Tabela 2), seguem a relação esperada. O ligante (**1**) dppn, o qual apresenta a maior extensão da conjugação π em sua estrutura pode ser considerado o ligante que apresenta a caracteristica mais π - ácida da série.

O ligante (**5**), (1,10 fenantrolina), apresenta o maior valor de pKa, e isto indiretamente indica que este ligante é o que apresenta maior efeito σ-doador, o que esta de acordo com as estruturas dos ligantes (**1-4**). É possível observar que o efeito indutivo dos substituintes CH_3 e Cl nos ligantes (3) e (4) afetam os valores de pKa, sendo o CH_3

um doador fraco de densidade eletrônica tanto por efeito indutivo quanto pelo efeito de ressonância (SOLOMONS. T.W.G et al.,2018). No caso do substituinte Cl há um equilíbrio dos efeitos indutivos e de ressonância, pois este grupo é considerado um retirador forte de densidade eletrônica por efeito indutivo e um doador forte através do efeito de ressonância (SOLOMONS. T.W.G et al.,2018).

Tabela 2: Valores de pKa dos ligantes (1-5) obtidos pelo método experimental

Ligantes	pKa
(1) dppn dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	2,50
(2) dppz dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	3,35
(3) (dppzCH_3) 7-metildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	3,77
(4) (dppzCl) 7-clorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	3,83
(5) phen 1,10 fenantrolina	4,55

Apesar da discussão qualitativa do pKa, neste trabalho, os dados de pKa obtidos foram correlacionados com as propriedades eletrônicas e eletroquímicas dos complexos e as tendências observadas serão discutidas nos próximos itens. Com base nos valores crescentes de pKa dos ligantes bidentados, os complexos foram numerados de 1 a 5 (dppn (**1**), dppz (**2**), dppzCH_3 (**3**), dppzCl (**4**), phen (**5**)).

2.5 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de IV foram registrados para todos os ligantes e complexos sintetizados neste trabalho. Por meio da análise qualitativa das frequências de vibrações para cada composto, as bandas observadas nos espectros de IV foram atribuídas em comparação com os dados de complexos análogos e dos ligantes reportados na literatura (DA SILVA, M.F et al.,2008). Com a utilização das informações obtidas pelos espectros de IV em conjunto com outros dados espectrais foi possível confirmar as

estruturas dos compostos (NAKAMOTO, K.,1997; SILVERSTEIN, R.M.,1991; PAVIA, DONALD.,2008).

2.5.1 Espectros de IV dos ligantes (1-5)

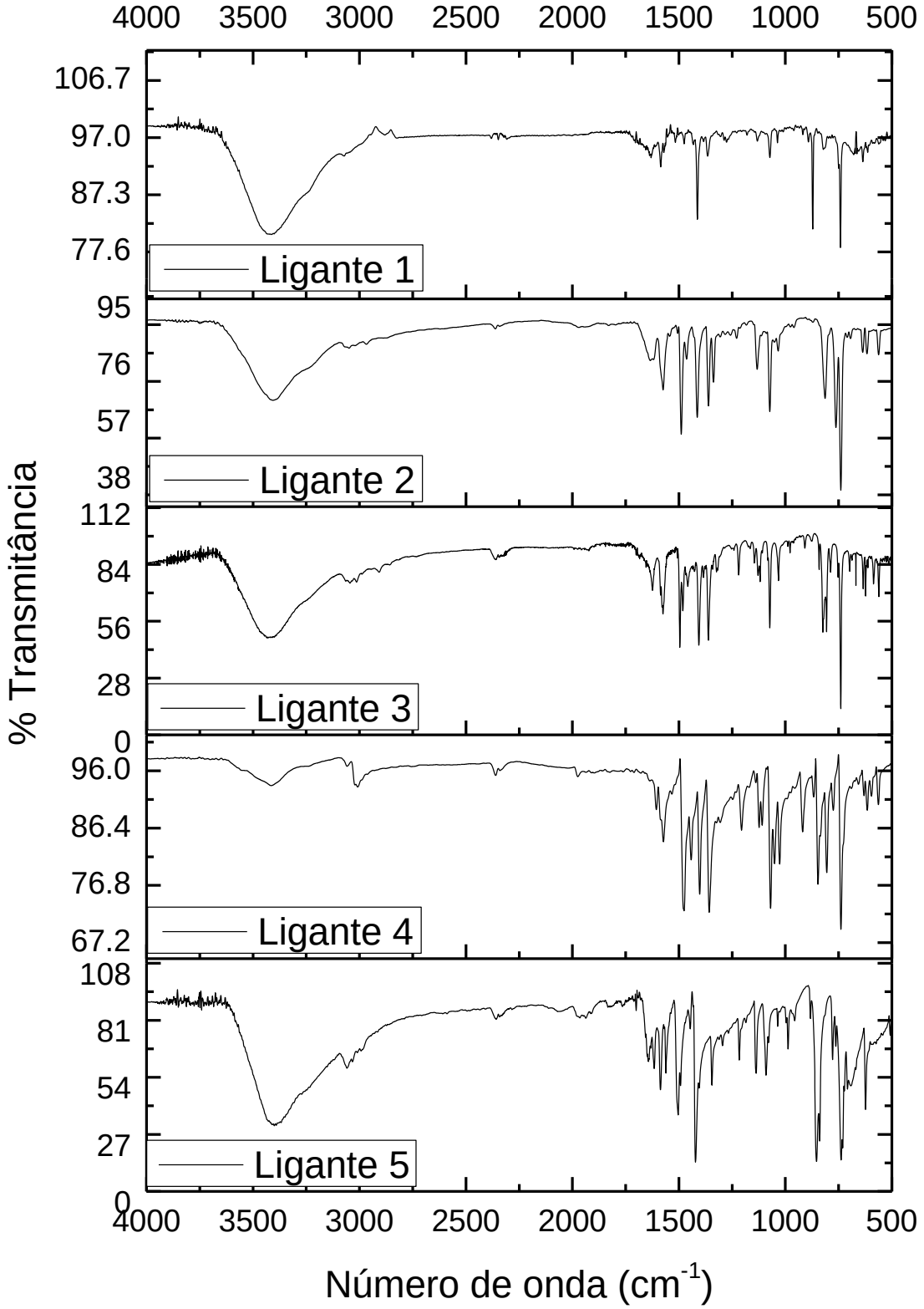
Nos espectros de IV dos ligantes é possível observar muitas bandas, as quais se referem aos modos de vibração dos ligantes, Figura 20. Os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares apresentam absorções características em três regiões do espectro (PAVIA, DONALD.,2008). Na região de 3100 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} observa-se a deformação axial ν(C-H), na faixa de 1497 a 1454 cm^{-1} têm-se bandas referentes à deformação axial das ligações do anel ν(C-C) e de 730 cm^{-1} a 1220 cm^{-1} encontram-se os estiramentos referentes à deformação angular fora do plano ν(C-H) (MIRANDA, F.S.,2008). Para o ligante **(4)** (dppz-Cl) também foi possível observar banda em 921 cm^{-1} atribuída ao estiramento ν(C-Cl) referente ao substituinte deste ligante (Cl). As principais atribuições encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Valores das frequências observados na região de 4500 cm^{-1} - 450 cm^{-1} para os ligantes (1-5)

# Ligante 1 dppn (cm^{-1})	Ligante 2 dppz (cm^{-1})	Ligante 3 dppz-CH_3 (cm^{-1})	Ligante 4 dppz-Cl (cm^{-1})	Ligante5 phen (cm^{-1})	Tentativa de Atribuição
	2969	3034	3015	3060	$\nu(CH)_{aromático}$
1070	1070	1073	1071	1090	β(CH)
817	741	739	737	731	γ(CH)
1070	1207	1220	1190	1217	γ(CH)
1472	1486	1495	1480	1501	ν(CC)
1409	1410	1422	1400	1422	ν(CC)
1274	1351	1352	1352	1344	ν(CN)
-	-	-	921	-	ν(CCl)

 # Valores retirados da literatura (FOXON, S.P et al.,2011).
ν-estiramento, β deformação do ângulo no plano, γ-deformação do ângulo fora do plano.

Figura 20: Espectros na região do IV dos ligantes (1-5) obtidos em pastilha de KBr



Fonte: Autora.

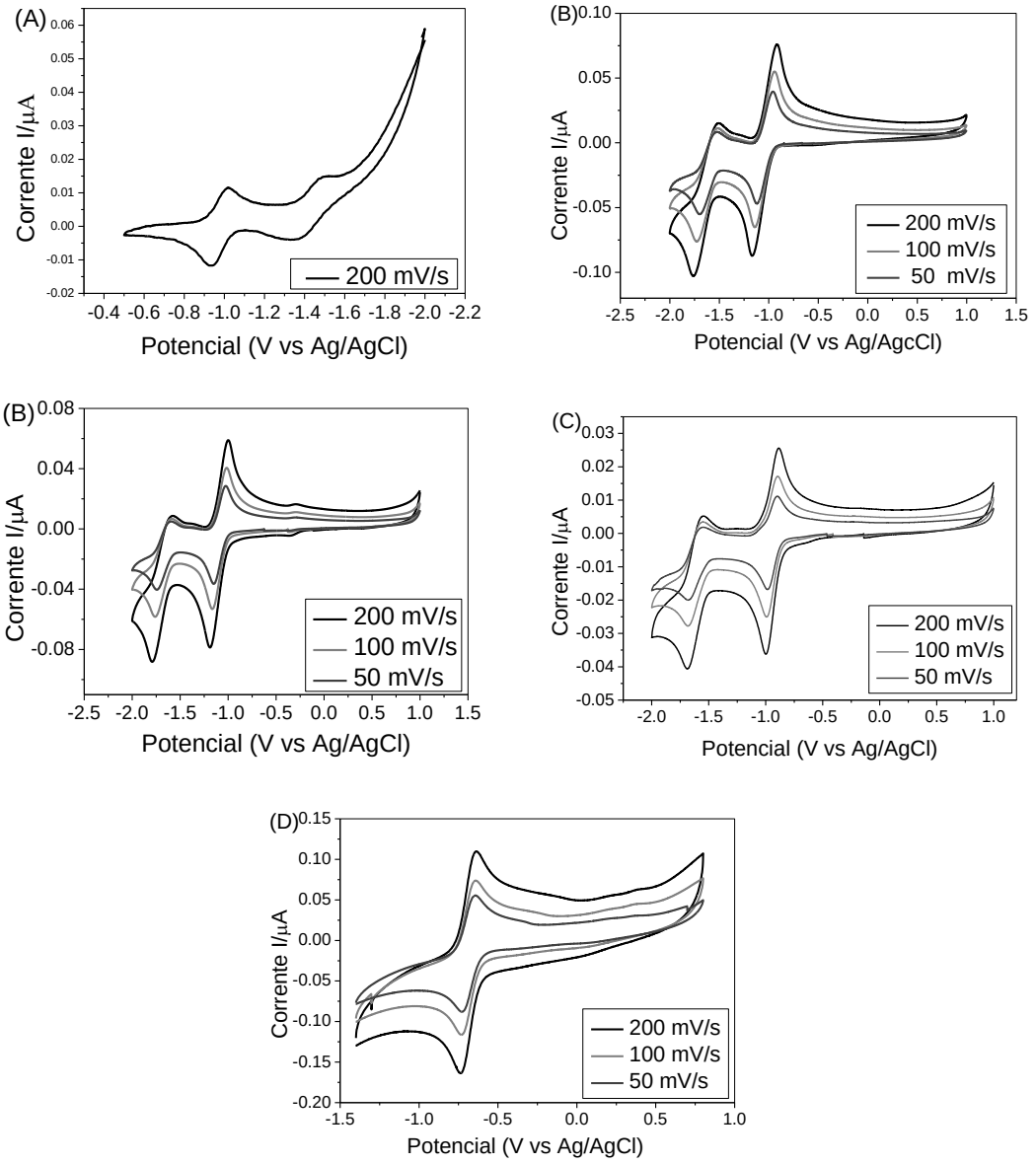
2.6 Propriedades eletroquímicas dos ligantes

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica que se fundamenta na medida da corrente gerada após submeter uma dada espécie em uma varredura de potencial elétrico (BARD, F.,2000). Neste trabalho, esta técnica foi importante, pois permitiu analisar o comportamento eletroquímico dos ligantes livres e dos complexos após a coordenação dos ligantes bidentados.

Nos voltamogramas cíclicos dos ligantes **(1-5),** (Figura 21), é possível observar, na janela de trabalho do solvente utilizado (DMSO), dois pares de ondas em E(V) < 0, sendo um par atribuído ao processo reversível $E^1_{1/2}$(V) e o outro ao processo quase reversível $E^2_{1/2}$(V), sendo que neste caso $i_{pa}/i_{pc} \neq 1$. Para o ligante **(5)** (Figura 21-E), observa-se apenas um único processo reversível.

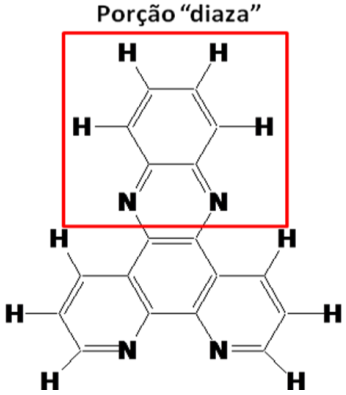
Em 2009 Neves, A e colaboradores realizaram um estudo detalhado de modelagem molecular (TD-DFT), para uma série de ligantes da classe das dipiridofenazinas, onde justificaram que a fácil redução desses ligantes ocorre devido à baixa energia dos orbitais π* dessas moléculas. No caso do dppz e seus derivados os sítios π-receptores estão localizados no grupo fenazínico, ou seja, na porção diaza da estrutura dos ligantes, Figura 22, (MIRANDA, F.S et al.,2008).

Figura 21: Voltamogramas cíclicos dos ligantes (1-5, A - E) em DMSO seco, 1.0x10^{-3} M, 0,1 M, em TBAPF$_6$ registrados com o eletrodo de trabalho carbono vítreo



Fonte: Autora.

Figura 22: Representação da estrutura do ligante 2 (dppz)



Fonte: Autora.

Na Tabela 4 apresentam-se os valores de $E_{1/2}$ (V) calculados para os processos redox dos ligantes.

Tabela 4: Valores de $E_{1/2}$ (V vs Ag/AgCl) calculados para os processos redox dos ligantes

Ligantes / pKa	$E^1_{1/2}$(V)	$E^2_{1/2}$(V)
(1) dppn	-1.04	-1.43
(2) dppz	-1.09	-1.64
(3) dppzCH_3	-1.04	-1.69
(4) dppzCl	-0.94	-1.62
(5) phen	-0.69	____

Estudos de modelagem conduzidos por Neves, A e colaboradores para ligantes da classe das fenazinas mostraram que os orbitais LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) estão centrados nas extensões conjugadas dos ligantes (grupo fenazínico) e não no sítio fenantrolínico (MIRANDA, F.S et al.,2008). Este fato explica a ocorrência de dois processos redox para os ligantes **(1-4)** e apenas um processo para o ligante **(5)**.

O processo observado para o ligante **(5)** se relaciona com o LUMO centrado na porção fenantrolínica, sendo que desta forma o processo observado em -0,69 V está relacionado com o segundo potencial observado para as fenazinas.

Ao comparar os valores de $\mathbf{E^1_{1/2}}$ para os ligantes **(1-4)** observa-se que o ligante **(1)** dppn apresenta potencial mais positivo do que o ligante **(2)** dppz, o que indica que a extensão da conjugação π do ligante **(1)** diminui a energia do LUMO e desta forma torna-se mais fácil a redução deste ligante. No entanto ao comparar os valores de

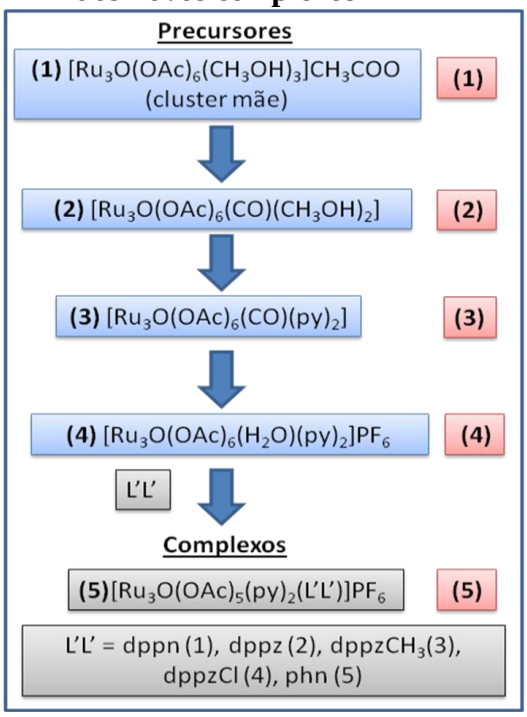
potencial do ligante **(1)** com os ligantes **(3 e 4)** nota-se um desvio desta tendência, o que indica que o efeito do substituinte (CH_3 e Cl) é mais importante do que a extensão da conjugação.

2.7 Síntese e caracterização dos complexos

2.7.1 Sínteses

Para a obtenção dos novos complexos $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]^n$, quatro etapas de sínteses foram realizadas e em cada uma, um precursor foi isolado, conforme representado no esquema, Figura 23.

Figura 23: Fluxograma referentes às 5 etapas de sínteses realizadas para obtenção dos novos complexos

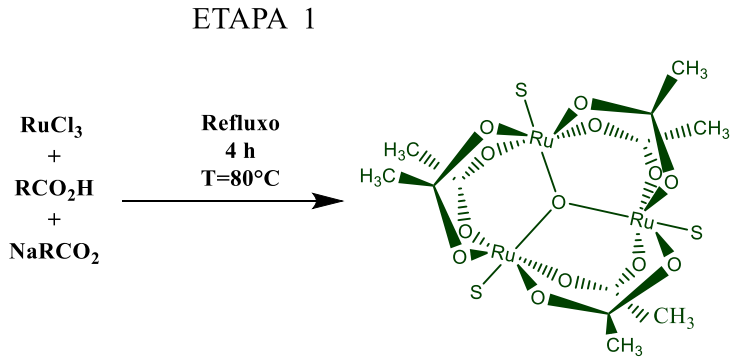


Fonte: Autora.

A primeira etapa de síntese consiste na obtenção do precursor **(1)** denominado cluster-mãe $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]^+$. Não há mecanismos detalhados sobre a formação deste precursor, mas de maneira geral ao reagir $RuCl_3.3H_2O$ com acetato de sódio trihidratado ($Na(CH_3COO).3H_2O$) em uma mistura de etanol e ácido acético glacial, os íons metálicos de rutênio se organizam em um arranjo trigonal, com o átomo

de oxigênio central e seis pontes acetato, sendo que o produto formado é consequência de uma reação de auto-montagem, Figura 24.

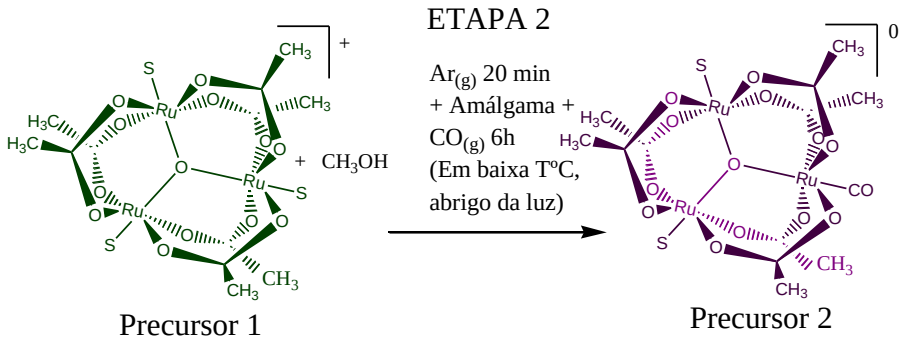
Figura 24: Esquema geral da síntese do precursor (1) $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]^+$



Fonte: Autora.

Na etapa 2, o precursor **(1)** é reduzido com amálgama de zinco e mantido em sistema saturado de $CO_{(g)}$, e ocorre a formação do precursor **(2)** $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_2(CO)]$, o qual é um complexo reduzido com carga formal 0 e apresenta um íon rutênio (II) coordenado ao ligante CO, Figura 25.

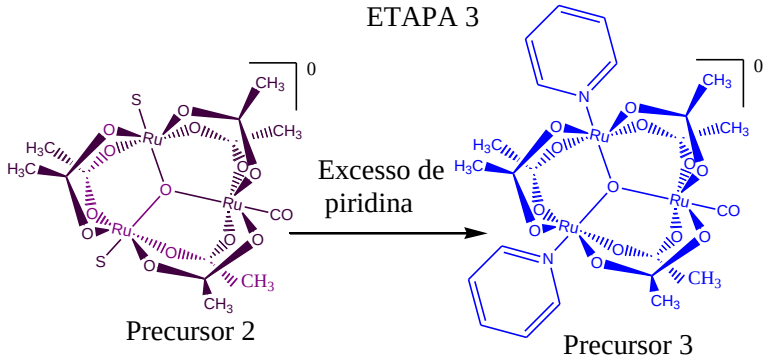
Figura 25: Esquema geral da síntese do precursor (2) $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_2(CO)]$



Fonte: Autora.

Na terceira etapa para a obtenção do precursor **(3)**, as moléculas de solventes que estão coordenadas nos dois íons metálicos de rutênio são substituídas pelos ligantes piridínico de interesse (piridina), uma vez que as moléculas dos solventes (água, etanol) são lábeis. Neste caso, não ocorre a substituição do ligante CO, Figura 26.

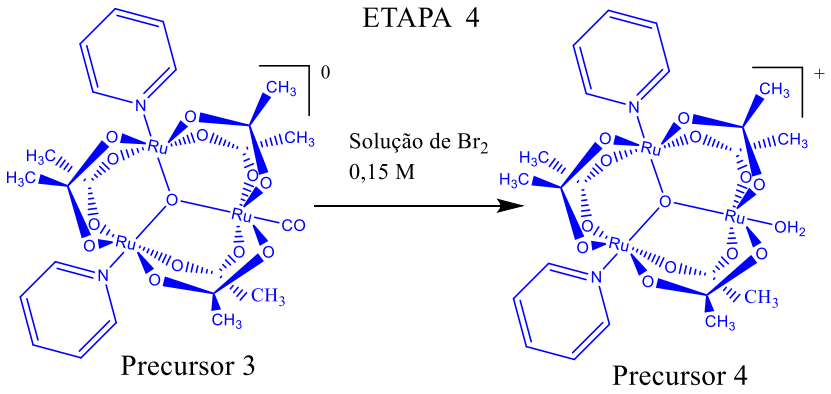
Figura 26: Esquema geral da síntese do precursor (3) [$Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CO)$]



Fonte: Autora.

Finalmente na etapa 4, o precursor **(3)** é oxidado e ocorre a perda do ligante CO, o qual é substituído por uma molécula de solvente. Nesta etapa é obtido o precursor **(4)** $[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)]^+$ na forma de um precipitado azul, Figura 27. É importante destacar que todas as etapas descritas anteriormente consistem de estratégias sintéticas para a obtenção do precursor principal ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)]^+$), o qual será utilizado nas sínteses dos novos complexos.

Figura 27: Esquema geral da síntese do precursor (4) [$Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)(py)_2]^+$

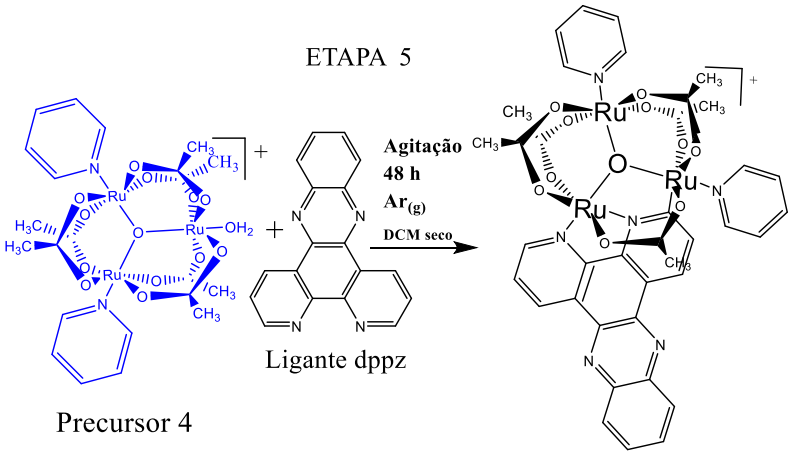


Fonte: Autora.

Na última etapa de síntese o precursor **(4)** é mantido em agitação com o respectivo ligante bidentado, e por um mecanismo não elucidado, ocorre à perda de uma ponte acetato e de uma molécula do solvente, Figura 28.

Após as sínteses, os complexos **(1-5)** foram purificados em coluna cromatográfica, **ANEXO VII.**

Figura 28: Esquema geral da síntese do complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$



Fonte: Autora.

De maneira geral, na literatura encontram-se descritas duas rotas sintéticas diferentes para obtenção dos carboxilatos trinucleares de rutênio com cinco pontes de acetato（CHEN, J et al.,2005; QIN, J et al.,2012). Nas duas descrições, os novos complexos foram sintetizados por meio da reação dos ligantes bidentados com o precursor **(4)** $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)(py)_2]PF_6$.

Na rota sintética descrita por Qin, J e colaboradores a reação entre o precursor **(4)** e o ligante ocorre em sistema de refluxo, mantido em atmosfera de argônio e utiliza-se como solvente DCM seco. Na rota descrita por Chen, J e colaboradores a reação ocorre por meio da agitação do precursor **(4)** com o ligante de interesse por dois dias e utiliza-se como solvente DCM（CHEN, J et al.,2005; QIN, J et al.,2012). Dois aspectos importantes destas sínteses estão descritos na literatura, a utilização do complexo precursor ($[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)(py)_2]PF_6$) é fundamental para a coordenação do ligante bidentado, pois ocorre a substituição do ligante metanol e a perda de uma ponte de acetato para a formação dos novos complexos. No trabalho de Chen, J os autores relatam que tentativas de sínteses foram realizadas a partir da utilização de um precursor simétrico ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_3]PF_6$), no entanto não houve a formação dos novos complexos (CHEN, J et al.,2005). Outro aspecto importante é que em todos os trabalhos, durante as sínteses dos novos complexos, observou-se mudança de coloração do meio reacional de azul para verde (CHEN, J et al.,2005; YUN, H et al.,2006; YUN, H et al.,2007; DAI, F.R et al., 2008; YUGE, H et al.,2009; DAI, F.R et al.,2011; QIN, J et al.,2012).

Neste trabalho, não foi possível obter os complexos **(1-5)** por meio da rota sintética descrita Qin, J e colaboradores, pois durante as etapas de refluxo observou-se degradação dos complexos (QIN, J et al.,2012). Muitas tentativas foram realizadas e mesmo com modificações do tempo de refluxo, temperatura, mudanças na estequiometria do precursor **(4)** e do ligante não foi possível sintetizar os novos complexos por meio desta rota. Desta forma, as sínteses foram conduzidas por meio da rota sintética descrita por Chen, J e colaboradores. É importante destacar que a formação dos novos complexos é favorecida em condições de atmosfera inerte e solvente seco e puro.

Na literatura não há relatos sobre o mecanismo de reação para a formação dos complexos com os ligantes bidentados, contudo estruturas de difração de raios X comprovaram que a coordenação deste ligante ocorre quando os dois átomos de nitrogênio (N) do anel do ligante se coordenam a um íon metálico de rutênio e no outro átomo de rutênio ocorre a ligação com o carbono adjacente ao nitrogênio, dando origem ao seguinte modo de coordenação μ-η^1(C), η^2(N,N) (CHEN, J et al.,2005). Neste caso, a ligação C-H *orto* dos ligantes N-heterocíclico pode ser ativada e clivada o que dá origem a carboxilatos trinucleares de rutênio com uma ponte de acetato substituída por um ligante N-heterocíclico (YUN, H et al.,2006; DAI, F.R et al.,2008; QIN, J et al.,2012;).

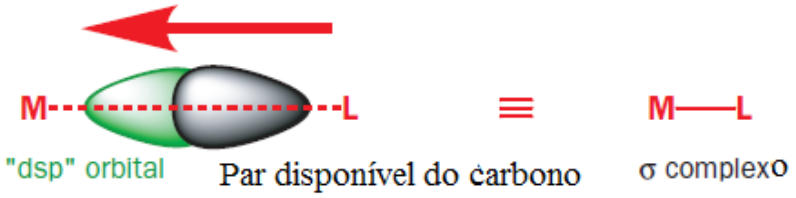
Neste modo de coordenação μ-η^1(C), η^2(N,N) a representação η (hapticidade), indica o número de átomos envolvidos na ligação com metal, onde η^1 indica que um átomo faz uma ligação com o íon metálico. No caso da ligação μ-η^1(C), esta ocorre pois o carbono (C) tem um par de elétrons livres em um orbital 'sp^n' que pode se sobrepor com um orbital vazio do metal '*dsp'* de simetria apropriada para formar uma ligação σ.

A quebra homolítica da ligação C-H gera uma carga formal -1 no ligante, de modo que a ligação μ-η^1(C) confere ao complexo uma carga formal +1. A representação desta ligação pode ser observada na Figura 29 (CLAYDEN, J et al.,2006).

No caso dos complexos **(1-5)** sintetizados neste trabalho, não foi possível caracterizar as estruturas por meio da técnica de difração de raios X. Muitos procedimetos e a utilização de diversos métodos de crescimento de cristais foram aplicados, como exemplo: difusão de solventes. No entanto, de acordo com o cristalógrafo os cristais obtidos não apresentavam tamanho ideal e em alguns casos não difrataram. Contudo, no caso do complexo **(5)** com o ligante phen, com os dados de DRX coletados não foi possível obter a solução e refinamento da estrutura. No geral, o

principal problema foi atribuído a qualidade do cristal, o qual se organizou em placas muito finas e gerou um padrão de difração 'fraco' no equipamento.

Figura 29: Representação do modo de ligação do Carbono (L) com um íon metálico M



Fonte: Autora.

Uma vez sintetizados, a determinação da fórmula estrutural dos compostos requer um conjunto de informações que envolvem propriedades físico-químicas, apresenta-se nos itens abaixo a descrição detalhada das informações que foram obtidas por meio de cada uma das técnicas de caracterização.

2.8 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) é uma técnica muito importante para a investigação estrutural e caracterização dos compostos de coordenação, pois permite a análise de moléculas de alta polaridade, alta massa molecular e grande complexidade estrutural (HENDERSON, W.;2005). Em análises realizadas em equipamentos de alta resolução é possível obter a razão m/z (massa carga) exata do íon complexo e com a expansão do pico de interesse pode-se observar o padrão da distribuição isotópica, o qual está relacionado com o número de isótopos dos elementos presentes na estrutura, bem como sua abundância relativa (HENDERSON, W.;2005).

Nos trabalhos desenvolvidos por Nikolaou, S e colaboradores, os resultados obtidos por ESI-MS foram fundamentais para a elucidação estrutural dos carboxilatos trinucleares de rutênio, sendo que isto confirma a importância da utilização desta técnica em trabalhos nos quais o principal objetivo é sintetizar e caracterizar novos compostos (NIKOLAOU, S et al.,2008; ; MOREIRA, Z.E et al.,2008; EBERLIN, M.N et al.,2006).

Nos espectros de massas dos complexos (**1-5**) foi possível observar o pico do íon complexo que corresponde à massa dos compostos sem o contra-íon PF_6^-, sendo que em

todos os casos confirmou-se que a carga formal do complexo é +1. Com a ampliação de todos os picos apresentados nos espectros de massas foi possível observar o padrão isotópico gerado devido à presença dos três íons metálicos de rutênio nas estruturas dos complexos $[Ru_3O]^n$. O padrão isotópico é observado, pois o rutênio apresenta sete isótopos, ^{104}Ru (18,7%), ^{102}Ru (31,6%), ^{101}Ru (17,0%), ^{100}Ru (12,6%), ^{99}Ru (12,7%), ^{98}Ru (1,88%) e ^{96}Ru (5,52%) (TOMA, H.S., et al., 2004).

Na Tabela 5 apresentam-se os valores m/z calculados e obtidos experimentalmente para os íons intactos e fragmentos dos complexos **(1-5)**.

Tabela 5: Resultados calculados e experimentais (m/z) obtidos por meio dos espectros de massa ESI-MS dos complexos (1-5)

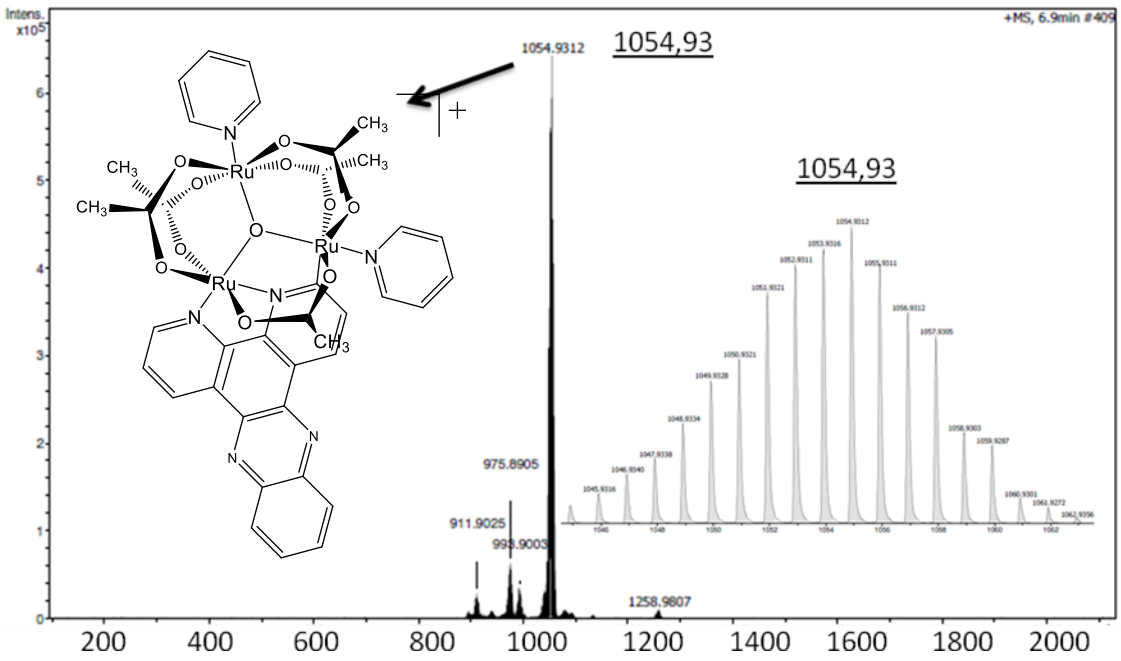
Estruturas dos Complexos e Fragmentos	m/z Teórico	m/z Experimental
Complexo 1		
$[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$	1104.99	1105.01
Complexo 2		
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)_2(dppz)]^+$	1054.93	1054.93
$[Ru_3O(CH_3COO)_4(py)_2(dppz)]^+$	997.94	998.90
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)(dppz)]^+$	975.82	975.90
Complexo 3		
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$	1068.95	1068.95
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)(dppzCH_3)]^+$	989.86	989.91
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(dppzCH_3)]^+$	910.75	911.90
Complexo 4		
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)_2(dppzCl)]^+$	1089.37	1088.90
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)(dppzCl)]^+$	1010.27	1009.86
$[Ru_3O(CH_3COO)_2(py)_2(dppzCl)]^+$	912.24	911.91
Complexo 5		
$[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)_2(phen)]^+$	952.83	952.82

Os valores calculados apresentados na Tabela 5 apresentam grande proximidade com os valores de *m/z* apresentados nos espectros. Os espectros obtidos para o complexo **(1)** encontram-se no **ANEXO VIII**.

Nos espectros obtidos para os complexos 2, 3 e 4, além do pico do íon complexo, também foi possível observar outros picos de menores intensidades, os quais foram atribuídos à fragmentos do íon-molecular.

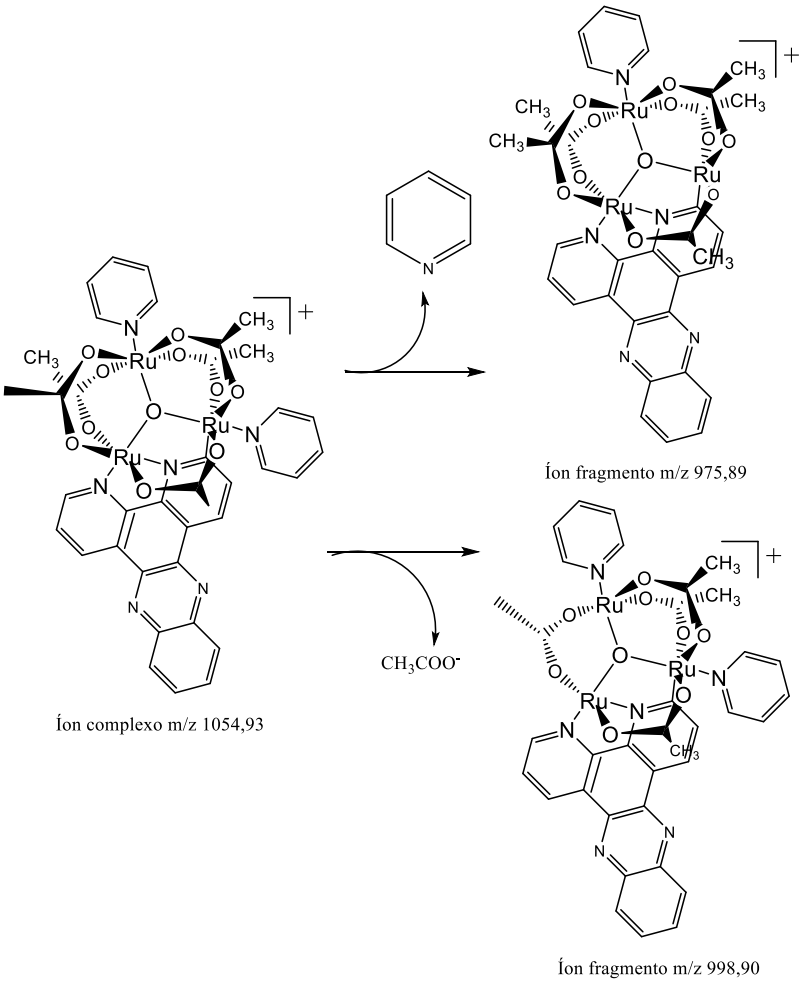
Na Figura 30 apresenta-se o espectro de massas do complexo **(2)**, onde o pico do íon complexo intacto corresponde ao fragmento 1054,93 m/z, o qual apresenta a seguinte estrutura $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$, o pico 998,90 m/z que está relacionado com a perda de uma ponte acetato e o fragmento 975,89 m/z corresponde ao íon após a perda de um a ligante piridínico, Figura 31.

Figura 30: Espectro ESI-MS do complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ adquirido no modo positivo



Fonte: Autora.

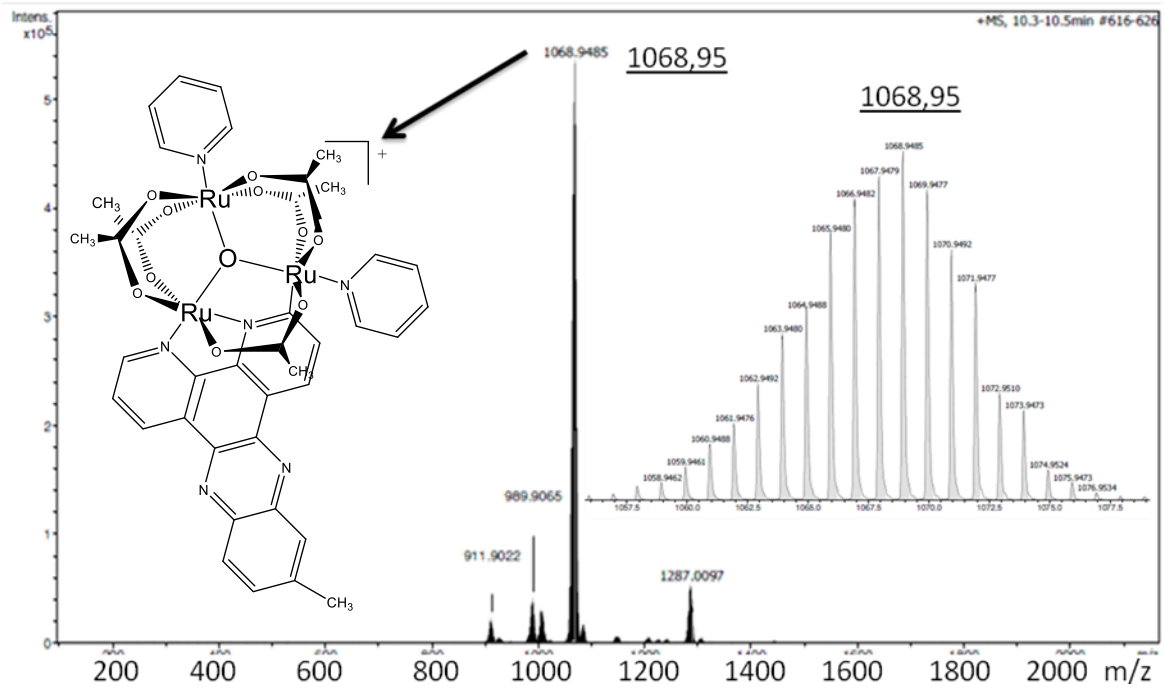
Figura 31: Esquema geral da dissociação do íon complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ (1054,93 m/z) gerando os fragmentos $[Ru_3O(OAc)_5(py)(dppz)]^+$ (975,89 m/z) e $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ (998,90 m/z)



Fonte: Autora.

Na Figura 32, apresenta-se o pico do íon complexo **(3)**, 1068,95 m/z $[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$, e também os fragmentos 989,91 m/z e 911,90 após a perda dos ligantes piridínicos (1-py) $[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)(dppzCH_3)]^+$ e (2-py) $[Ru_3O(CH_3COO)_5(dppzCH_3)]^+$.

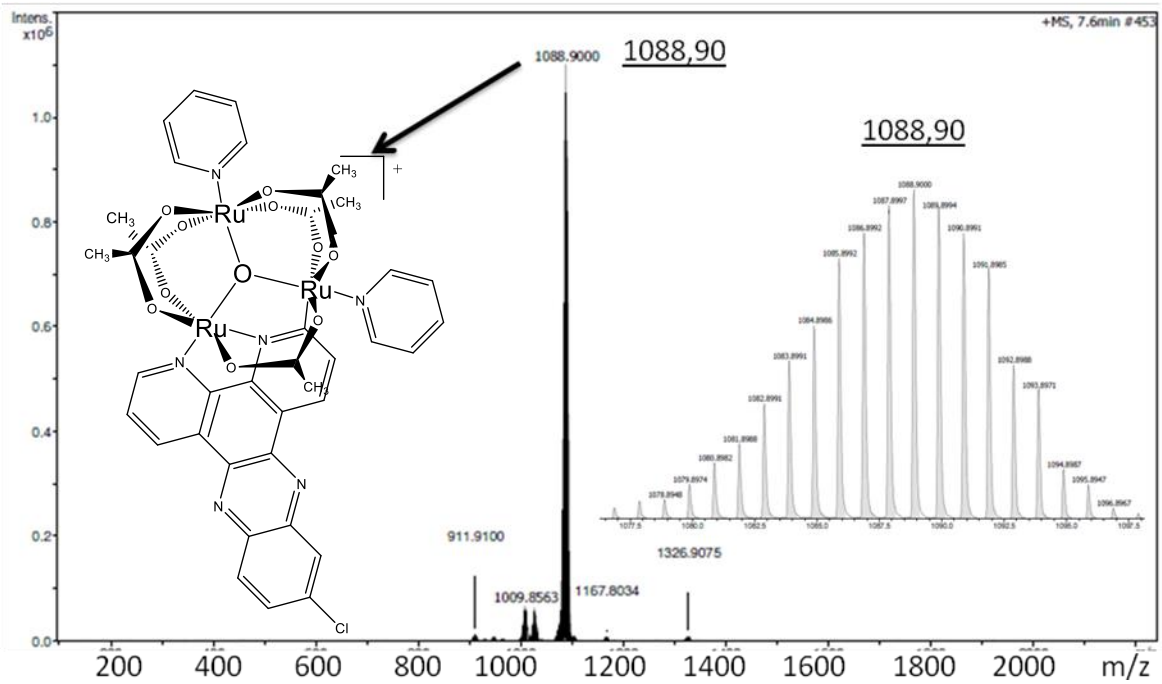
Figura 32: Espectro ESI-MS do complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$ adquirido no modo positivo



Fonte: Autora.

Para o complexo **(4)** foi observado no espectro, Figura 33, o pico do íon complexo 1088,90 m/z $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ e os fragmentos 1009,85 e 911,91 m/z foram atribuídos aos fragmentos $[Ru_3O(OAc)_5(py)(dppzCl)]^+$ e $[Ru_3O(OAc)_2(py)_2(dppzCl)]^+$, respectivamente.

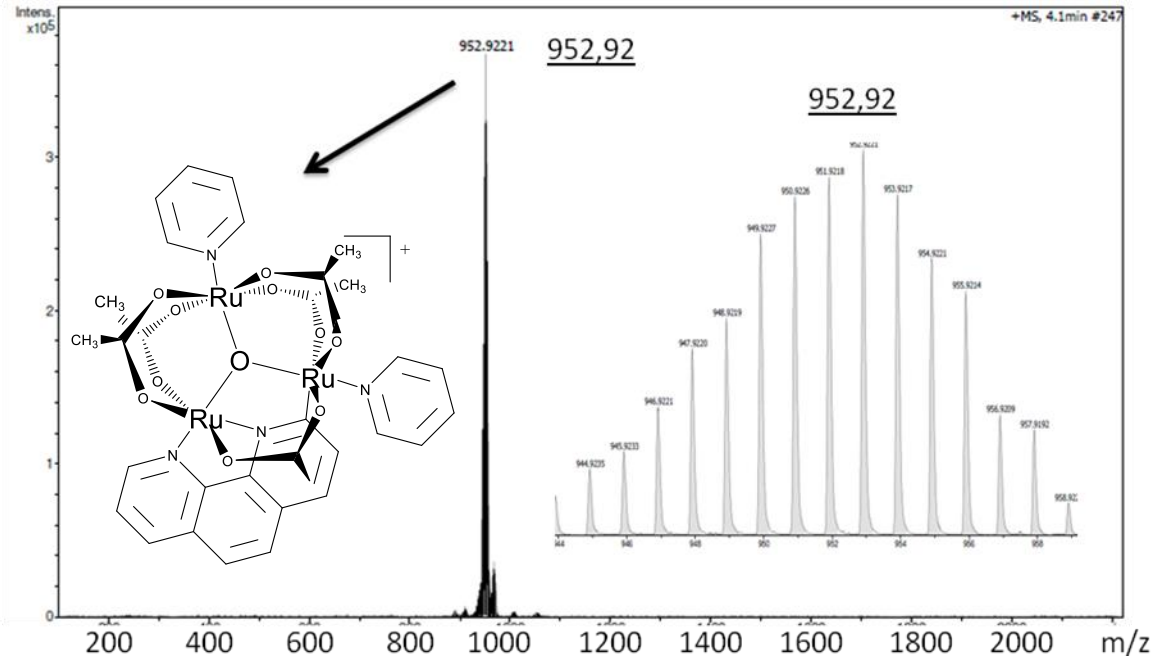
Figura 33: Espectro ESI-MS do complexo (4) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ adquirido no modo positivo



Fonte: Autora.

No caso do complexo 34, apresenta-se o pico do íon molecular para o complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$.

Figura 34: Espectro ESI-MS do complexo (5) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ adquirido no modo positivo



Fonte: Autora.

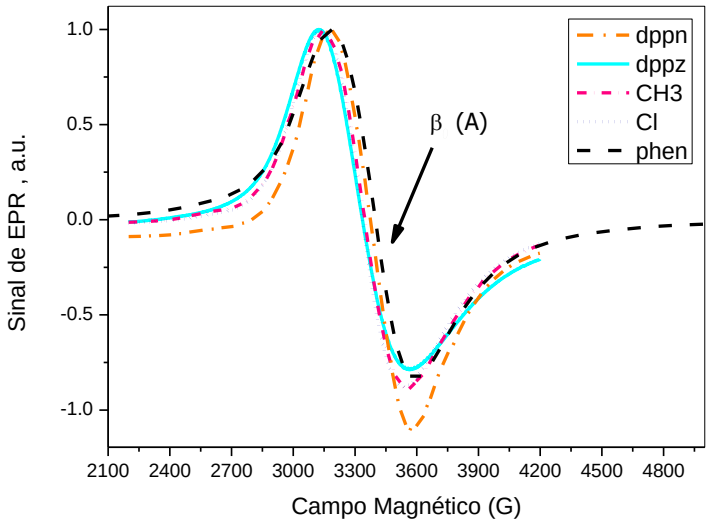
2.9 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A ressonância paramagnética eletrônica (EPR), também conhecida como ressonância de spin eletrônico (ESR) é uma técnica espectroscópica aplicada para substâncias que apresentam elétrons desemparelhados, (substâncias paramagnéticas), tais como: proteínas, íons de metais de transição, radicais livres etc (RHODES, C.J.,2005; CERCHIARO, G et al.,2005; BONINI, M.G. et al.,1999). Em EPR a radiação absorvida pelos íons, moléculas ou elétrons é a frequência de radiação na região do microondas (10^{-9} - 10^{11} s^{-1} ou 1 - 100 GHz), sendo que a absorção da radiação ocorre na presença de um campo magnético aplicado ao sistema (KHULBE, K.C. et al.,2017).

Neste trabalho, a espectroscopia EPR foi utilizada para caracterizar ainda mais os complexos oxidados (**1-5**), os quais apresentam carga formal +1 e um elétron desemparelhado. As soluções dos complexos foram préviamente congeladas e os espectros de EPR foram medidos a 10 K. Não foi possível registrar os espectros dos complexos à temperatura ambiente e o primeiro sinal apareceu na temperatura mais baixa, 10 K.

Os espectros de EPR registrados para os complexos **(1-5)** estão apresentados na Figura 35.

Figura 35: Espectros de EPR experimetal dos complexos (1-5), obtidos em DCM, (T = 10K)



Fonte: Autora.

Como esperado, os espectros de EPR dos complexos, **(1-5)**, apresentaram o mesmo perfil espectral, pois como discutido anteriormente (item 2.8), são complexos oxidados, apresentam carga formal +1 e devido à mistura orbital apresentam um elétron desemparelhado. No entanto, a partir do perfil espectral é possível retirar informações importantes a respeito do arranjo estrutural dos complexos.

Calculou-se o fator g_e experimental para os complexos (**1-5**), Equação 1, (WERTZ, J.A et al.,1994): Este fator g_e, pode ser obtido experimentalmente e pode ser considerado como uma "*impressão digital*" da molécula, (tradução livre) (RAO, C.N et al.,1971).

$$\mathbf{g = h\,\nu / \beta\, B_0} \qquad \text{Equação 1}$$

Sendo que:

g = valor da constante giromagnética do elétron;

$h = 6.626\ 10^{-34}$ J·s;

$\beta = 9.274 \cdot 10^{-28}$ J·G^{-1};

β_0 = valor do campo magnético obtido no ponto A do espectro;

ν = 9,4 GHz.

Os valores de g obtidos para os complexos foram 1.99 **(1)**; 2.01 **(2 e 3)**; 2.02 **(4)** e 1.98 **(5)**. Estes valores de g não foram apresentados anteriormente para nenhum complexo da classe dos carboxilatos trinucleares de rutênio. No entanto, Hudson, A e colaboradores reportaram que g ~ 2,00 para complexos mononucleares de rutênio, com a configuração do íon metálico (Ru^{3+}, $4d^5$, spin baixo), (HUDSON, A et al.,1969).

Para diferentes compostos os valores de g podem sofrer uma variação significativa e isto está diretamente relacionado com o acoplamento spin-órbita em cada arranjo estrutural, ou seja, o momento angular orbital pode ser adicionado ao momento angular de spin (ABRAGAM, A et al.,1970). Sendo assim, um mesmo composto também pode apresentar diferentes valores de g. Como exemplo, os elétrons em um íon metálico que apresenta um ambiente totalmente simétrico têm interações iguais em todas as direções, ou seja, o momento orbital e o momento magnético total são iguais em todas as direções ($\mu_x = \mu_y = \mu_z$, assim também $g_x = g_y = g_z$), (ABRAGAM, A et al.,1970). Neste caso, a magnitude do momento magnético total na direção do campo externo será sempre a mesma para um íon que está em um ambiente totalmente simétrico. Em termos do espectro de EPR será observada somente uma banda de

absorção, pois há apenas um valor de g e um valor do campo magnético externo onde ocorre a ressonância $h\nu = g\beta B$. Este efeito está relacionado diretamente com a anisotropia do sistema, a qual pode ser classificada em 3 diferentes classes, (ABRAGAM, A et al.,1970):

1) Primeira classe:O valor de g é igual em todas as direções ($g_x = g_y = g_z$) o sistema é chamado de isotrópico.

2) Segunda classe: O valor de g em um eixo é diferente dos outros dois valores ($gx = gy \neq gz$), chamado axial.

3) Terceira classe: Chamada de rômbica, o valor de g é diferente em todos os eixos ($gx \neq gy \neq gz$).

Para todos os complexos, foi observado um perfil espectral isotrópico, sendo que este efeito está relacionado com a deslocalização eletrônica nestes complexos, o que reforça a movimentação do elétron desemparelhado e a mistura orbital.

Além do mais, em sistemas com um elétron desemparelhado pode ocorrer dois tipos de interações: o elétron desemparelhado pode interagir com o seu próprio núcleo e também com núcleos adjacentes, estas interações são denominadas: acoplamento hiperfino e super-hiperfino, respectivamente (ABRAGAM, A et al.,1970). Estas interações podem resultar em espectros de EPR bem complexos.

Para os clusters (**1-5**) o perfil espectral é característico de um sistema onde não há nenhum tipo de interação do elétron desemparelhado com os núcleos vizinhos ou com o próprio núcleo. A ausência de acoplamentos hiperfinos também foi observada por outros pesquisadores, nos espectros de EPR de complexos mononucleares de rutênio (HUDSON, A et al.,1969).

2.10 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

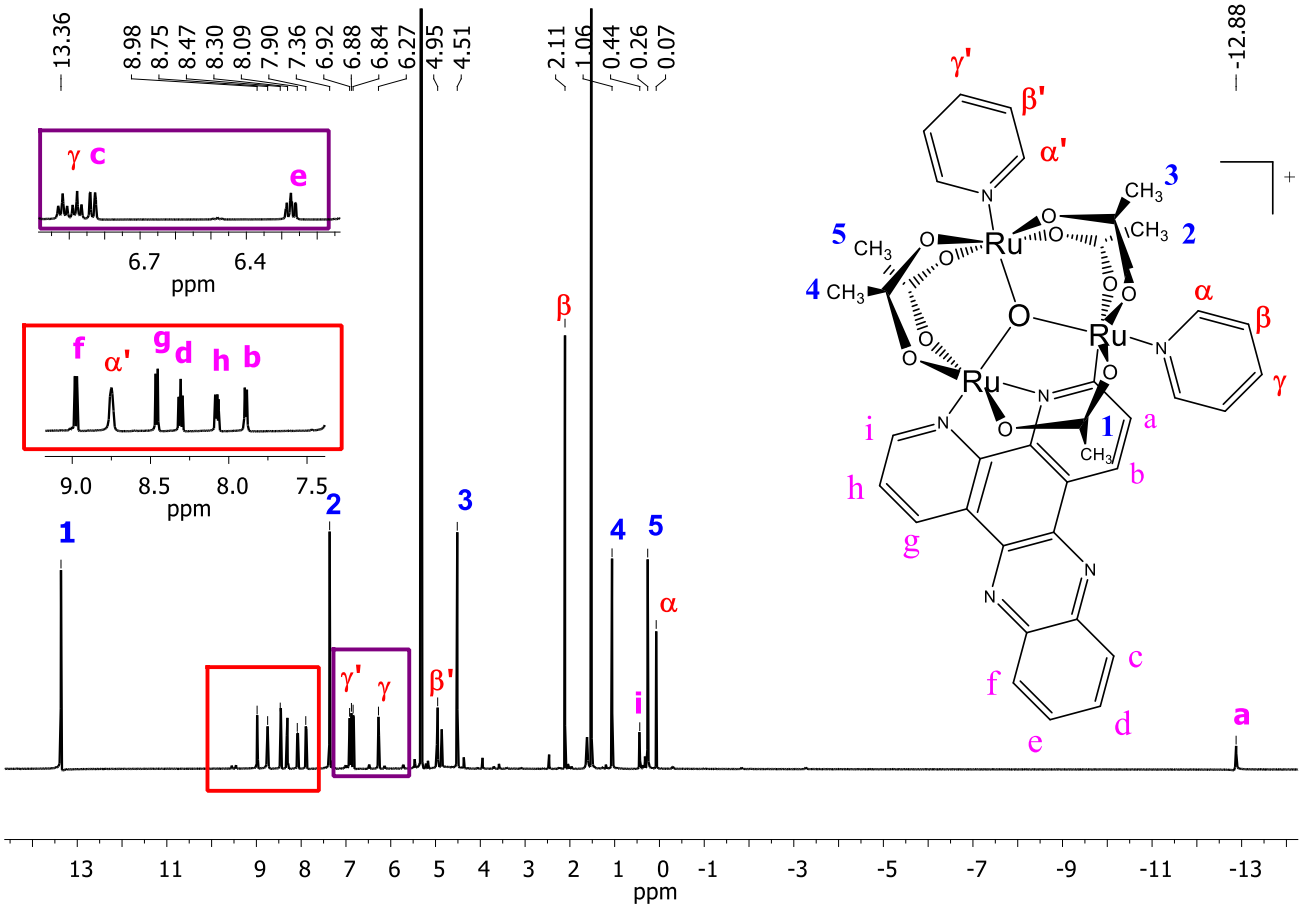
A carga formal dos carboxilatos trinucleares de rutênio, bem como o estado de oxidação dos íons metálicos de rutênio influenciam diretamente nos deslocamentos químicos dos prótons dos acetatos e dos ligantes coordenados à unidade $[Ru_3O]^n$ (NIKOLAOU, S.,2002; TOMA, H.E et al.,2001). Os clusters (**1-5**) sintetizados neste trabalho apresentam os íons metálicos de rutênio com estados de oxidação +3 e o ligante bidentado desprotonado mantém-se coordenado à unidade $[Ru_3O]^n$ através de um modo de coordenação pouco usual ((μ-η^1(C), η^2(N,N)). Cada íon de rutênio (Ru^{3+}, $4d^5$) apresenta um elétron desemparelhado, são complexos paramagnéticos (item 2.9).

No entanto, com a formação dos complexos, estes elétrons não permanecem localizados nos orbitais 4d devido à mistura entre os orbitais da unidade $[Ru_3O]^+$, das pontes acetatos e dos ligantes axiais. Consequentemente ocorre a deslocalização eletrônica nestes sistemas. Desta forma, apesar da anisotropia paramagnética foi possível atribuir os sinais de hidrogênios nos espectros de ^{1}H - RMN destes complexos, pois a influência do elétron desemparelhado nas propriedades magnéticas é minimizada pela intensa deslocalização eletrônica (POSSATO, B et al.,2017; CHEN, J et al.,2005; QIN, J et al.,2012).

Contudo, devido ao efeito da anisotropia paramagnética foi possível observar que os sinais dos ligantes coordenados à unidade $[Ru_3O]^n$, encontram-se extremamente deslocados em relação aos sinais observados dos ligantes livres (item 2.4) (TOMA, H.E et al.,2002; 2005). Devido à coordenação do ligante bidentado, as estruturas destes complexos apresentam baixa simetria e consequentemente muitos sinais de prótons foram observados nos espectros de ^{1}H-RMN, os quais foram atribuídos com base nos espectros de correlação COSY (^{1}H-^{1}H) e por meio da comparação dos espectros de complexos análogos reportados na literatura. Nas Figuras 36 e 37 apresentam-se os espectro ^{1}H-RMN e COSY registrados para o complexo **(2)**, respectivamente. Os espectros ^{1}H-RMN e de correlação COSY (^{1}H-^{1}H) obtidos para os complexos (**1-5**) encontram-se nos anexos, **(ANEXOS IX e X).**

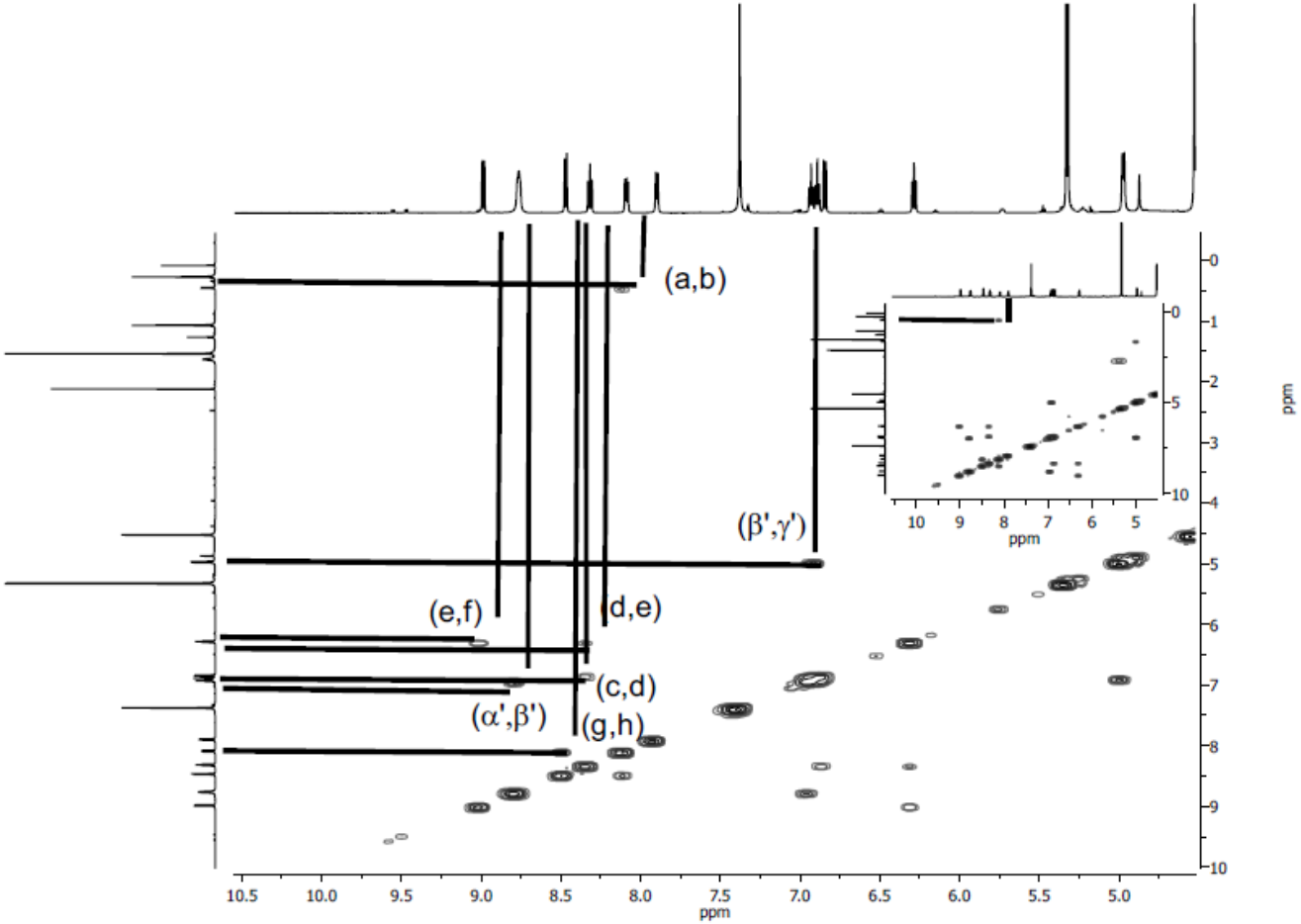
Na Tabela 6 apresentam-se os valores das tentativas de atribuições dos sinais dos hidrogênios registrados para cada complexo **(1-5)**.

Figura 36: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

Figura 37: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

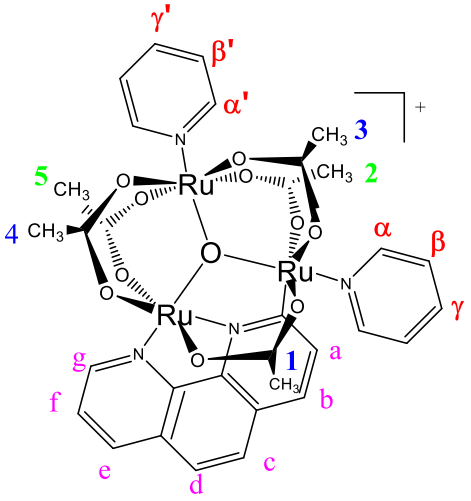
Tabela 6: Deslocamentos químicos dos hidrogênios nos espectros de ^{1}H-RMN para os complexos (1-5)

H^1 NMR	Complexo 1 dppn	Complexo 2 dppz	Complexo 3 dppzCH_3	Complexo 4 dppzCl	Complexo 5 phen
δ Acetato					
1	13.19 (3H, s)	13.36 (3H, s)	13.63 (3H, d)	13.07 (3H, d)	15.70 (3H, s)
2	7.45(3H, s)	7,36 (3H, s)	7.29 (3H, d)	7.49 (3H, d)	7,02 (3H, s)
3	4.86 (3H, s)	4,51 (3H, s)	.4.46 (3H, d)	4.59 (3H, d)	4,26 (3H, s)
4	1.19 (3H, s)	0,26 (3H, s)	0.92 (3H, d)	1.24 (3H, d)	- 1,44 (3H, s)
5	0.38 (3H, s)	1,06 (3H, s)	0.12 (3H, d)	0.44 (3H, d)	- 0,28 (3H, s)
δ(Ligante bidentado)					
a	-13.04 (1H, d)	-12.88 (1H, d)	-13.14 (1H, dd)	-12.51 (1H, dd)	-13.53 (1H, d)
b	6.86 (1H, t)	7.90 (1H, d)	7.79(1H, dd)	7.96 (1H, d)	4.92 (1H, d)
c	4.61(1H, s)	6.84 (1H, dd)	4.87 (1H, s)	8.98 (1H, d)	-0.69 (1H, d)
d	5.75 (1H, s)	8.30 (1H, dd)	-----	-----	9.45 (1H, d)
e	6.95(1H, t)	6.27(1H, dd)	6.07 (1H, dd)	8.50 (1H, t)	4.54 (1H, d)
f	7.34 (1H, s)	8.98 (1H, dd)	8.86 (1H, d)	8.10 (1H, q)	8.26 (1H, q)
g	6.50 (1H, t)	8.47 (1H, d)	6.70 (1H, t)	6.98 (1H, t)	-4.24 (1H, d)
h	8.71 (1H, d)	8.09 (1H, q)	8.11 (1H, dd)	8.87 (1H, d)	-----
i	1.53 (1H, s)	0.44 (1H, d)	0.26 (1H, s)	1.54 (1H, s)	-----
j	8.07 (1H, q)	-----	-----	-----	-----
k	0.80 (1H, s)	-----	-----	-----	-----
CH_3	-----	-----	1.54 (3H, s)	-----	-----
δ (py')					
α '	9.98 (1H, s)	8.75 (1H, s)	8.74 (1H, s)	8.23 (1H, dd)	8.96 (1H, s)
β '	2.12 (1H, s)	4.95 (2H, d)	5.04 (1H, t)	4.87 (1H, s)	5.45 (2H, s)
γ '	6.60 (1H, t)	6.92 (2H, t)	6.91(1H, t)	6.81 (1H, q)	6.60 (2H, t)
δ (py)					
γ	6.36 (1H, s)	6.88 (1H, t)	8.34 (1H, d)	6.93(1H, d)	7.68 (1H, t)
β	1.97 (1H, s)	2.11 (2H, s)	4.55 (1H, s)	3.43 (1H, q)	5.85 (2H, d)
α	0.09 (1H, s)	0.07 (2H, s)	2.07 (1H, s)	1.15 (1H, t)	3.76 (2H, s)

s=singleto, d=dubleto, t-tripleto, q=quarteto, dd=duplo dubleto

Nos espectros de ^{1}H-RMN observam-se os sinais dos hidrogênios das metilas dos acetatos, os sinais dos hidrogênios das piridinas e os sinais dos hidrogênios do ligante bidentado, Figura 38 (CHEN, J et al.,2005; YUN, H et al.,2006; YUN, H et al.,2007; DAI, F et al., 2008; YUGE, H et al.,2009; DAI, F et al.,2011; QIN, J et al.,2012).

Figura 38: Representação da estrutura geral do cluster (5), com as respectivas posições relativas de cada hidrogênio



Fonte: Autora.

Em relação aos grupos acetatos, foi possível observar cinco sinais diferentes dos hidrogênios das metilas, o que reflete os diferentes ambientes químicos destes grupos, os quais são sensíveis aos ligantes coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$.

Devido à baixa simetria dos complexos, dois sinais das metilas encontram-se deslocados para campo mais baixo (15,70 ppm - 13,07 ppm) e 3 sinais deslocados para campo mais alto (-1,44 ppm - 4,86 ppm).

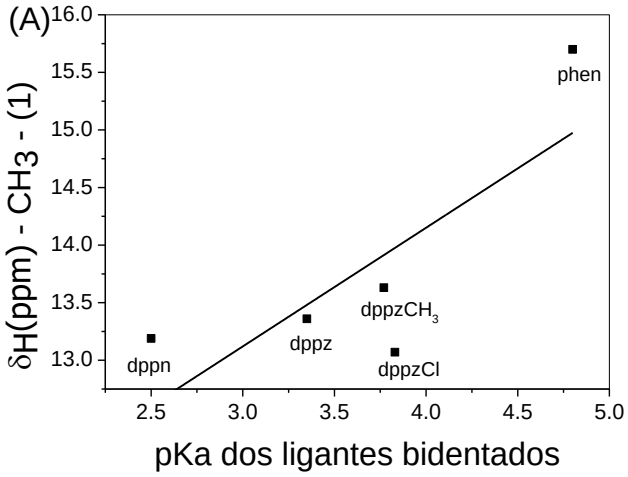
Ao comparar os valores dos deslocamentos químicos dos protóns das metilas dos acetatos foi possível estimar a posição relativa de cada grupo acetato, Figura 38.

Para todos os complexos **(1-5)**, com relação à metila da posição 1, observa-se que os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios são deslocados para campo baixo (15,70 ppm - 13,07 ppm), Figura 39.

De acordo com o arranjo estrutural dos complexos **(1-5)**, a metila na posição 1 se encontra voltada para a lateral do ligante bidentado, na direção dos hidrogênios a e b. Portanto, sofre o efeito de desblindagem da corrente do anel aromático dos ligantes que apresentam sistema π conjugado.

No caso do complexo **(5)**, o próton da metila na posição 1 apresenta menor frequência de ressonância, ou seja, é mais desblindada em relação aos outros complexos. Este efeito pode estar relacionado com o fato deste ligante (phen) apresentar maior densidade eletrônica em relação aos outros ligantes e neste caso o efeito da corrente é maior e os prótons desta metila tornam-se mais desblindado.

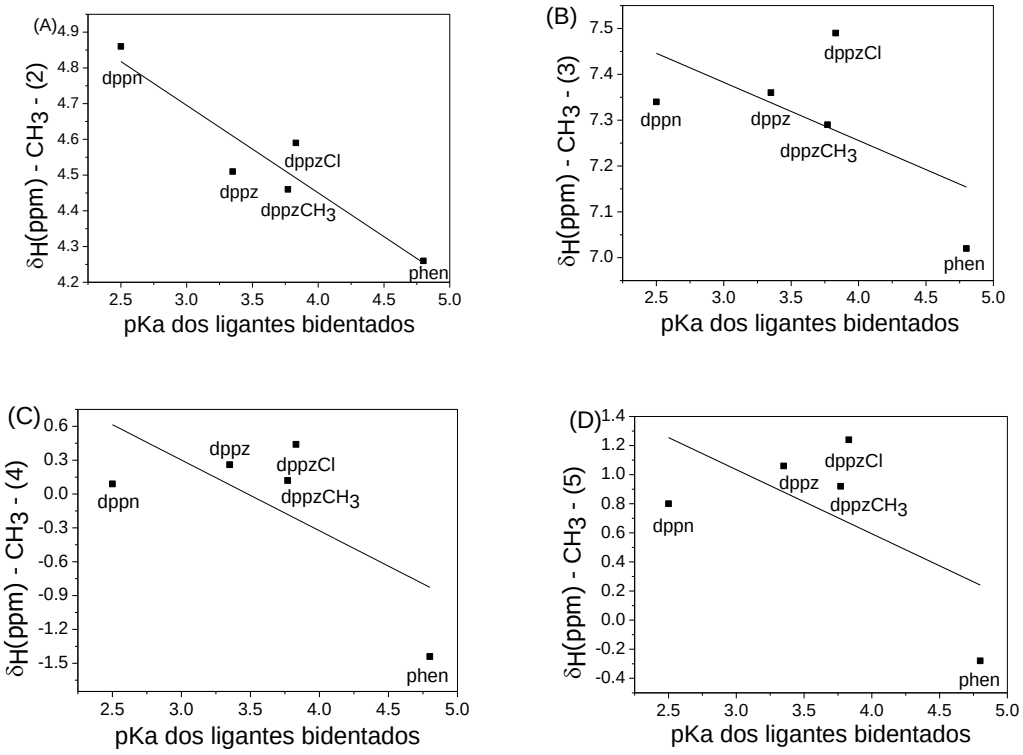
Figura 39: Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios das metilas dos grupos acetato (posição 1) com o pKa dos ligantes bidentados para os clusters 1-5



Fonte: Autora.

Para o complexo **(5)**, com o ligante phen (maior pKa) os valores de deslocamento químico mostram que os prótons das metilas **(2, 3, 4 e 5)** estão mais blindados com relação aos outros complexos. Isto sugere que os grupos acetatos da unidade $[Ru_3O]^n$ são influenciados pela doação de densidade eletrônica dos ligantes bidentados. Neste caso, observa-se que para os ligantes que apresentam maiores valores de pKa os sinais destes prótons aparecem deslocados para campo mais alto, Figura 40.

Figura 40: Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios das metilas dos grupos acetato (posições 2 (A),3 (B),4 (C) e 5 (D)) com o pKa dos ligantes bidentados para os clusters 1-5



Fonte: Autora.

Com relação a posição relativa dos grupos acetatos e os valores de δ, pôde-se inferir que os prótons das metilas que estão adjacentes ao ligante bidentado e próximos ao ligante pirídinico (posições 4 e 5), encontram-se deslocado para campo mais alto devido ao efeito de blindagem causado pelos ligantes coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$.

Neste caso, os hidrogênios das metilas são blindados devido à doação de densidade eletrônica pelos ligantes que apresentam maiores valores de pKa e com isso os sinais destes prótons aparecem deslocados para campo mais alto (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; POSSATO, B et al.,2017). Esta tendência indica claramente a deslocalização eletrônica nestes complexos, pois os grupos acetatos da unidade $[Ru_3O]^n$ são influenciados pela doação de densidade eletrônica dos ligantes axiais coordenados aos íons metálicos de rutênio (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; POSSATO, B et al.,2017).

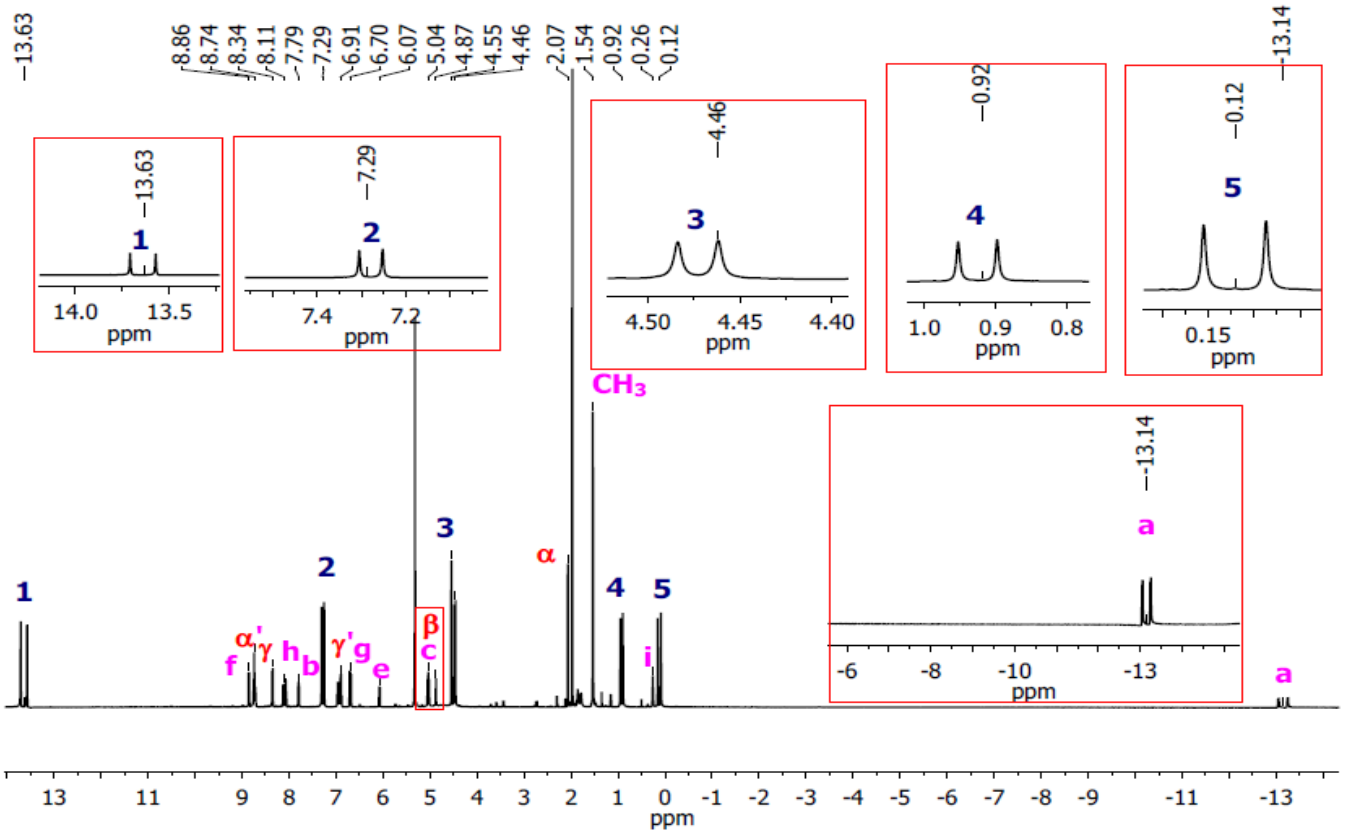
Esta tendência reforça o que foi observado anteriormente para os complexos simétricos, sendo que o ligante phen, considerado o mais básico desta série de ligantes bidentados, doa densidade eletrônica para a unidade $[Ru_3O]^n$ e mantém os hidrogênios

das metilas adjacentes blindados e deslocados para campo mais alto (POSSATO, B et al.,2017).

Os efeitos sentidos pelos grupos acetatos foram estudados para complexos oxidados simétricos, $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^+$, com diferentes ligantes piridínicos (L) e azanaftalenos (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997, POSSATO, B et al.,2017). Para as séries de complexos simétricos, os resultados mostraram que os deslocamentos químicos dos prótons dos acetatos podem ser utilizados para sondar as mudanças na estrutura eletrônica da unidade $[Ru_3O]^n$, a qual se modifica de acordo com a natureza σ-doadora dos ligantes axiais (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; POSSATO, B et al.,2017). Nestes trabalhos, concluiu-se que os deslocamentos de H para as metilas (CH_3 - grupos acetatos) diminuem conforme o pKa do ligante axial aumenta (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; POSSATO, B et al.,2017). Os hidrogênios das metilas são blindados devido à doação de densidade eletrônica pelos ligantes que apresentam maiores valores de pKa e com isso os sinais destes prótons aparecem deslocados para campo mais alto (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; POSSATO, B et al.,2017). Esta tendência indica claramente a deslocalização eletrônica nestes complexos, pois os grupos acetatos da unidade $[Ru_3O]^n$ são influenciados pela doação de densidade eletrônica dos ligantes axiais coordenados aos íons metálicos de rutênio (ALEXIOU, A.D.P et al.,1997; POSSATO, B et al.,2017).

Os sinais das metilas dos acetatos para os complexos simétricos, assim como para os clusters **(1)**, **(2)** e **(5)** são singletos, no entanto para os complexos **(3)** e **(4)** **(dppzCH$_3$ e dppzCl)**, Figura 41 os sinais dos prótons aparecem duplicados. Os complexos **(1-5)** sintetizados neste trabalho apresentam isômeros ópticos e no caso particular do complexo **(3)** e **(4)** devido a presença dos grupos substituintes dos ligantes bidentados **(dppzCH$_3$ e dppzCl)** também pode-se obter isômeros diferentes e consequentemente este efeito pode estar relacionado com a duplicação dos sinais nos espectros de RMN, Figura 42, (DE OLIVEIRA et al.,2009).

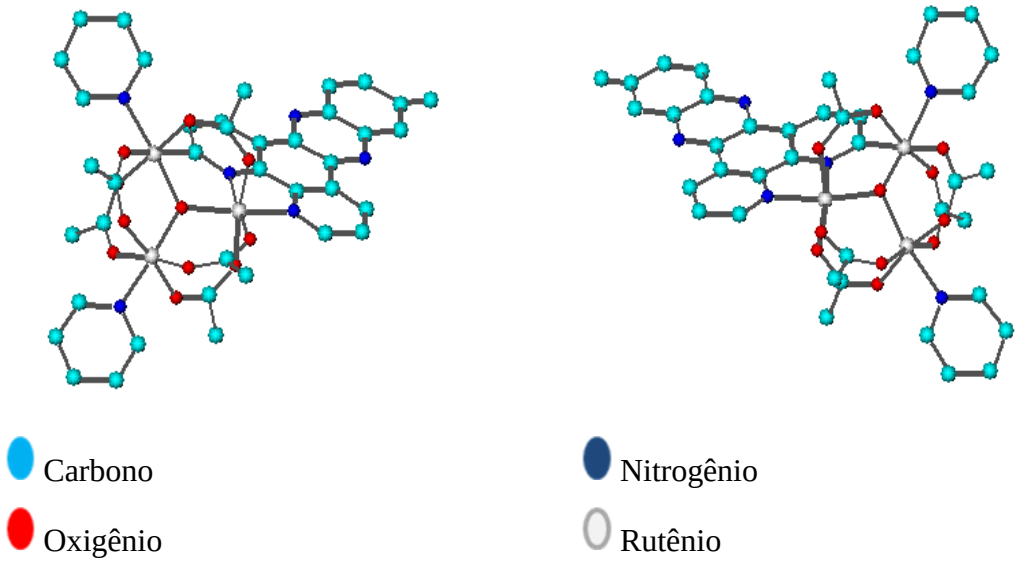
Figura 41: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$, com destaque para os sinais duplicados dos prótons das metilas (1-5), obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

Figura 42: Representação dos isômeros para o complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]PF_6$ (A e B)

(A) Isômero A - complexo (3) **(B) Isômero B - complexo (3)**



Fonte: Autora.

Os sinais dos prótons dos ligantes piridínicos e do ligante bidentado foram atribuídos com base nos espectros de correlação COSY **(ANEXO X)** e por meio da comparação de espectros de complexos análogos reportados na literatura (CHEN, J et al.,2005; YUN, H et al.,2006; YUN, H et al.,2007; DAI, F et al.,2008; YUGE, H et al.,2009; DAI, F et al.,2011; QIN, J et al.,2012).

Outro aspecto importante é que devido à baixa simetria dos complexos, foram observados dois conjuntos de picos separados para os ligantes piridínicos. Os hidrogênios da piridina (py - α, β, δ) mais próxima do ligante bidentado apresentam sinais em região de campo mais alto em relação a piridina (py' - α', β', δ') que se encontra na posição oposta (CHEN, J et al.,2005).

Os hidrogênios da piridina (py) na posição *orto* (Hα) são os que mais sofrem efeito da anisotropia paramagnética e são deslocados para campo alto. Enquanto que os hidrogênios (Hα', Hβ', Hγ') apresentam deslocamentos químicos na região de campo baixo (8.96 ppm - 4.87 ppm).

Para os complexos com substituição da ponte acetato reportados na literatura, foram observados que os prótons adjacentes aos nitrogênios do ligante bidentado são deslocados para campo mais alto (ppm) CHEN, J et al.,2005; YUN, H et al.,2006; YUN, H et al.,2007; DAI, F et al.,2008; YUGE, H et al.,2009; DAI, F et al.,2011; QIN,

J et al.,2012). Este deslocamento é significativo, pois os prótons adjacentes ao nitrogênio no ligante livre são encontrados na região de campo baixo, característica de deslocamento químico de compostos aromáticos (8,00 ppm - 9,00 ppm). Quando estes ligantes estão coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$, os hidrogênios sofrem deslocamento paramagnético e este esfeito pode estar relacionado a uma interação de pseudocontato devido o elétron desemparelhado e a proximidade destes hidrogênios com o centro paramagnético $[Ru_3O]^+$. Tal observação confirma o modo de coordenação μ-η^1(C),η^2(N,N) (CHEN, J et al.,2005).

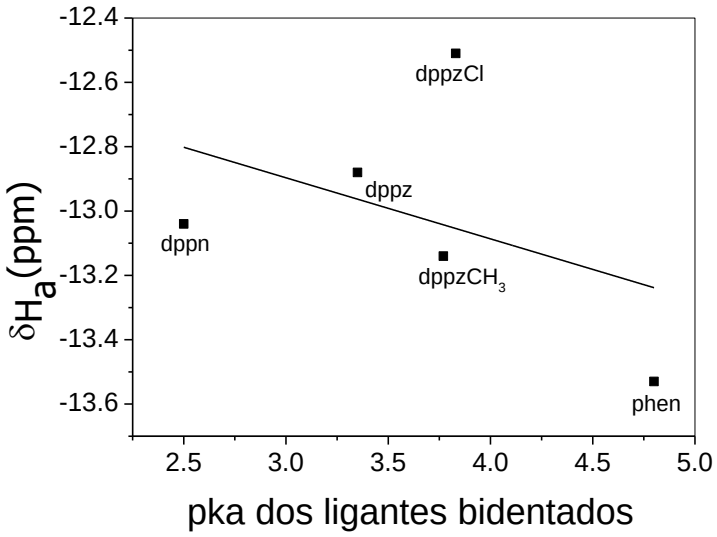
O mecanismo de pseudocontato é um efeito observado como consequência da anisotropia paramagnética apresentada por estes complexos (CHEN, J et al.,2005). Este efeito reforça a deslocalização eletrônica e a mistura orbital que ocorre nestes complexos, uma vez que o elétron desemparelhado influencia nas propriedades magnéticas do sistema. No geral, este mecanismo (pseudocontato) é observado quando o campo magnético gerado pela rotação do elétron desemparelhado interage com o campo magnético aplicado. O campo magnético gerado pelo elétron desemparelhado pode ter direção oposta ou somar-se ao campo magnético aplicado e diferentes valores de deslocamentos químicos podem ser observados. Como este efeito está relacionado com o movimento do elétron desemparelhado, os prótons que estão mais próximos do núcleo paramagnético sofrem maior influência (BERTINI; C.L., 1996).

Para todos os complexos observa-se que os prótons adjacentes ao carbono, o qual participa da ligação com o centro metálico, (**Ru - C**), é o que mais sofre o efeito de blindagem e aparece deslocado para a região negativa (campo alto) do espectro (-13.73 ppm - - 12.51 ppm). Para os complexos simétricos, os prótons adjacentes ao nitrogênio do ligante piridínico também foram influênciados pelo efeito de anisotropia paramagnética e apresentaram deslocamentos químicos na região de campo alto (0.08 ppm - 1.50 ppm). Contudo, de acordo com os valores de δ (ppm) nota-se que para os complexos simétricos este efeito foi menos pronunciado quando comparado com a magnitude do campo para os complexos (**1 - 5**).

Comparando os valores δ (ppm) para os complexos (**1-5**), observa-se que o próton (**a**) do complexo com o ligante phen é o que aparece mais deslocado para campo alto (-13,53 ppm), Figura 43. No caso do ligante phen, dois efeitos podem estar contribuindo com a blindagem deste hidrogênio e consequentemente o deslocamento para campos mais alto. O efeito da anisotropia paramagnética e também no caso do ligante phen a menor extensão do sistema π conjugado reduz o efeito da corrente do

anel aromático, neste caso, os hidrogênios dos anéis aromáticos encontram-se mais blindados.

Figura 43: Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios dos ligantes bidentados (posição a) com o pKa dos ligantes bidentados para os clusters 1-5



Fonte: Autora.

2.11 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis-NIR

2.11.1 Espectros eletrônicos dos precursores

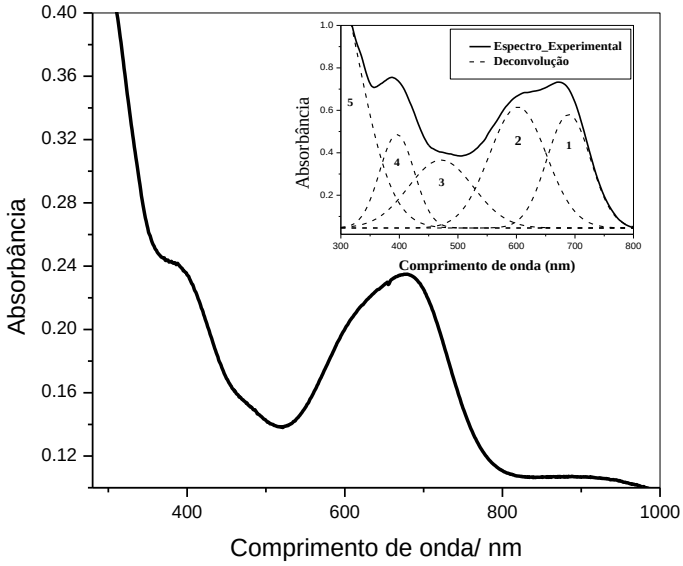
De maneira geral, a classe dos carboxilatos trinucleares de rutênio apresentam bandas de absorção na região do UV-Visível que sofrem deslocamentos de acordo com a carga formal do complexo e também com a dependência da natureza dos ligantes que estão coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$ (TOMA, H.E et al.,2001; MOREIRA, M.B .,et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017).

No espectro do precursor **(1)**, $[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$, denominado cluster mãe, Figura 44, é possível observar duas bandas características, com máximos em 688 nm que corresponde à transição interna da unidade $[Ru_3O]^+$ ou transição intra-cluster (IC) e 388 nm que refere-se à transição de transferência de carga cluster-ligante (TCCL). O perfil espectral observado é característico de complexo oxidado, uma vez que este precursor apresenta carga formal +1 e os íons metálicos de rutênio encontram-se com estados de oxidação Ru(III)Ru(III)Ru(III). Neste precursor, os ligantes periféricos coordenados aos íons metálicos de rutênio são iguais, e desta forma a

simetria deste composto é D_3h e a atribuição das bandas observadas no espectro eletrônico pode ser feita com base no diagrama de orbitais moleculares (DOM) proposto por Cotton, F.A e Meyer, T.J (COTTON, F.A et al.,1972; BAUMANN, J.A et al.,1978).

Na Figura 44, é possível observar as bandas de absorção, para o precursor **(1)**, que foram obtidas após a deconvolução do espectro eletrônico obtido experimentalmente, sendo que o perfil observado está de acordo com o que foi proposto por Alexiou, A.D.P em 1993 para o complexo simétrico $[Ru_3O(OAc)_6(py)_3]^+$ (ALEXIOU, A.D.P.,1993).

Figura 44: Espectro eletrônico e perfil de deconvolução do precursor 1 (10^{-5} M) em metanol



Fonte: Autora.

De acordo com o DOM, (Figura 4), as transições e”→a”2 (1) e a’1→a”2 (2) são permitidas em simetria D_3h. As transições e’→a”2 (3) e a”2→a’2 (4) são proibidas em simetria D_3h e no caso da transição (5) esta foi atribuída a TCCL, a qual ocorre entre o orbital do metal e do ligante ($e'_{(2)} \rightarrow \pi^*$), (BAUMANN, J.A et al.,1978).

Para a síntese do precursor **(2)**, ($[Ru_3O(OAc)_6(CH_3OH)_2(CO)]^0$), o cluster mãe (precursor **1**) foi reduzido e neste caso o precursor (**2**) apresenta carga formal zero e os íons metálicos de rutênio estado de oxidação Ru(III)Ru(III)Ru(II). Em relação ao espectro do precursor **(1)**, descrito anteriormente, ocorre um deslocamento batocrômico das bandas IC 700 → 900 nm e TCCL 388 →500 nm, Figura 45A. Este deslocamento

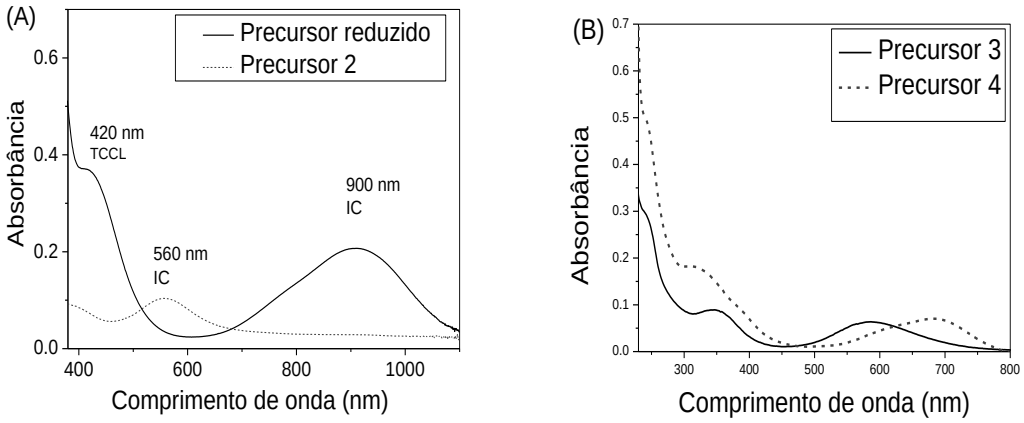
ocorre, pois ao ser reduzido ocorre o aumento de densidade eletrônica nos níveis dπ do metal e consequentemente a repulsão intereletrônica desestabiliza os orbitais e observa-se bandas em $\lambda_{máx}$ maiores (SILVA, C.F.N.,2015; NIKOLAOU, S.,2002).

Quando ocorre a coordenação do ligante carbonil (CO) no complexo reduzido, observa-se claramente no espectro eletrônico que ocorre um deslocamento da banda IC da região de 900 nm para uma região de comprimento de onda menor, em torno de 600 nm, Figura 45A. O deslocamento hipsocrômico observado ocorre devido à retrodoação que existe entre o centro $[Ru_3O]^0$ e o ligante CO, ligante π-receptor, que possui um par de elétrons livres (no átomo de carbono) e orbitais π* vazios, os quais podem comportar pares de elétrons oriundos do metal. Este efeito torna a unidade central deficiente de elétrons, estabilizando os níveis dπ do metal e assim ocorrendo a observação desta banda em maior energia (MOREIRA, M.B et al.,2016).

No espectro eletrônico do precursor **(3)**, observa-se além da transição IC em 600 nm a transição TCCL em 380 nm, atribuída a coordenação dos ligantes piridínicos neste complexo reduzido (precursor 2), Figura 45B.

Após a oxidação do precursor **(3)**, ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CO)]$), é possível observar no espectro eletrônico do precursor **(4)**, ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(H_2O)]^+$), o deslocamento batocrômico da banda IC, que ocorre devido a substituição do ligante CO por moléculas de solventes do meio reacional, Figura 45B.

Figura 45: Espectros eletrônicos qualitativo do intermediário reduzido, precursor (2) ($[Ru_3O(OAc)_6(H_2O)_2(CO)]$) - (A), (3) ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CO)]$), (4) ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(H_2O)]^+$) - (B) em metanol



Fonte: Autora.

O precursor **(4)**, ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(H_2O)]^+$), apresenta carga formal +1, e o arranjo estrutural deste complexo é apropriado para a coordenação dos ligantes bidentados e obtenção dos novos complexos de interesse, $[Ru_3O(Oac)_5(py)_2(L)]^+$ onde L = ligantes bidentados (CHEN, J et al.,2005; QIN.J et al.,2012).

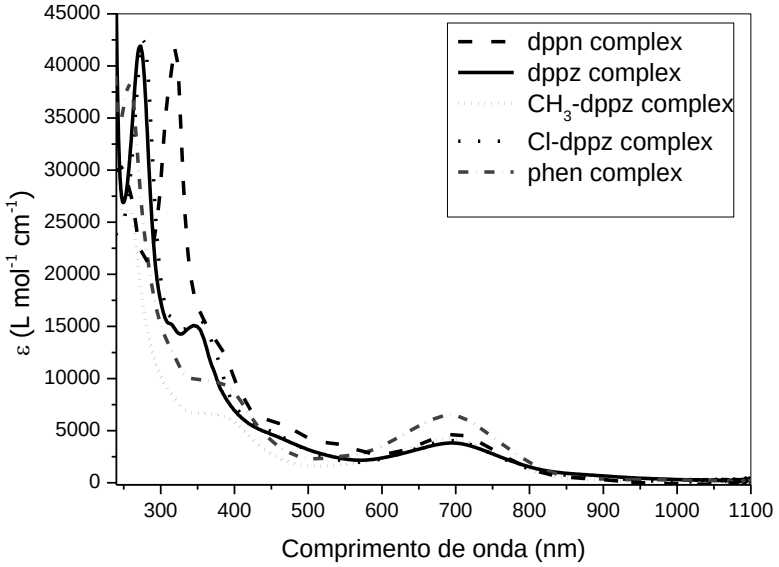
2.11.2 Espectros eletrônicos dos novos complexos (1-5)

Nas estruturas dos complexos sintetizados **(1-5)**, os íons metálicos de rutênio apresentam estado de oxidação +3 (Ru(III), Ru(III), Ru(III)), os acetatos apresentam carga -1 (5 OAc), o oxigênio central -2 e o ligante em ponte -1, o que confere uma carga total +1 para os complexos. Desta forma, a configuração eletrônica destes complexos apresenta 17 elétrons, o que caracteriza estes compostos como paramagnéticos (CHEN, J et al.,2005; QIN, J et al.,2012).

Nos espectros, Figura 46, observa-se bandas de absorção de baixa energia ao redor de 700 nm, atribuídas às transições de transferência de carga intracluster (IC), sendo que esta transição é centrada nos orbitais da unidade $[Ru_3O]^n$ e bandas na região de alta energia, 400 nm referentes às transições de transferência de carga cluster-ligante (TCCL) e também as transições eletrônicas dos ligantes bidentados. Na região de 300 nm também é possível observar bandas características dos ligantes (π- π*). Geralmente, transições eletrônicas na região de 400 nm são tipicamente referentes a transições que envolvem a unidade $[Ru_3O]^n$ e os ligantes axiais e apresentam valores de ε da ordem de 15.000 L mol^{-1} cm^{-1}, como exemplo nos complexos simétricos (POSSATO, B et al.,2017). Contudo os valores de ε referentes às transições nesta região para os complexos **(1-5)**, são relativamente altos, o que sugere que nesta região do espectro há sobreposição de bandas, com contribuição da TCCL e as bandas que estão puramente centradas nos ligantes bidentados, os quais apresentam transições de alta energia.

Os valores do coeficiente de absortividade molar (ε) referentes aos $\lambda_{máx}$ obtidos para os complexos (**1-5**) estão apresentados na Tabela 7. Os valores de ε obtidos estão de acordo com os valores encontrados para complexos análogos reportados na literatura.

Figura 46: Espectros eletrônicos dos complexos (1-5) em diclorometano



Fonte: Autora.

Tabela 7: Valores de log ε (L mol^{-1} cm^{-1}) para os $\lambda_{máx}$ dos complexos 1-5

	λ_{max}/nm log ε (L mol^{-1} cm^{-1})		
Clusters	**IC[a]**	**TCCL[b]** **TL[c]**	**π - π* transições dos ligantes**
1	698 (3,94)	388 414 467 (4,05) 541	320 (4,79)
2	695 (3,81)	345 (4,32)	271 (4,73)
3	692 (3,83)	384 (4,38)	277 (4,79)
4	693 (3,83)	352 (4,47)	272 (4,91)
5	693 (3,79)	392 (3,98)	258 (4,60)

[a](IC) = transição de transferência de carga intracluster/[b](TCCL) = transição de transferência de carga cluster-ligante/[c](TL) = transição interna do ligante bidentado

Estudos recentes reportados por nosso grupo de pesquisa, mostrou que as propriedades dos ligantes livres (pKa) se correlacionam com os dados espectroscópicos dos complexos. Estes estudos foram conduzidos para a classe dos complexos simétricos ($[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]PF_6$, L = ligantes azanaftalenos) e complexos com o ligante carbonil

($[Ru_3O(OAc)_6(L)_2(CO)]$, L = ligantes piridínicos) (MOREIRA, M.B et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017). As correlações observadas para estes complexos indicam claramente a mistura orbital que ocorre entre a unidade $[Ru_3O]^+$ e os ligantes axiais.

Com relação aos espectros eletrônicos dos complexos simétricos observou-se dependência dos valores de λ_{max} das transições IC com a natureza dos ligantes axiais (POSSATO, B et al.,2017). Este comportamento da transição IC em relação ao pKa dos ligantes pôde ser justificado com base no DOM, (Figura 4), proposto para esta classe de complexos. Os valores de energia da transição IC aumentam à medida que o caráter σ-doador dos ligantes aumenta (maiores valores de pKa), isto ocorre pois esta transição envolve os orbitais antiligantes (e''-a''_2), os quais são originados na combinação entre os orbitais d do rutênio e p_z do oxigênio. No caso dos ligantes azanaftalenos, investigados por Possato, B, foi observado que a σ-doação destes ligantes desestabiliza os orbitais d_z do rutênio, sendo que isto afeta diretamente a energia dos orbitais com componentes na orientação z (POSSATO, B et al.,2017). Desta forma, a perturbação dos orbitais ocupados devido ao efeito σ-doador dos ligantes, é compensada pela desestabilização do orbital antiligante (LUMO) e consequentemente a energia da transição IC aumenta com o aumento do pKa dos ligantes (POSSATO, B et al.,2017; TOMA, H.E; CUNHA, C.J; CIPRIANO, C.,1988).

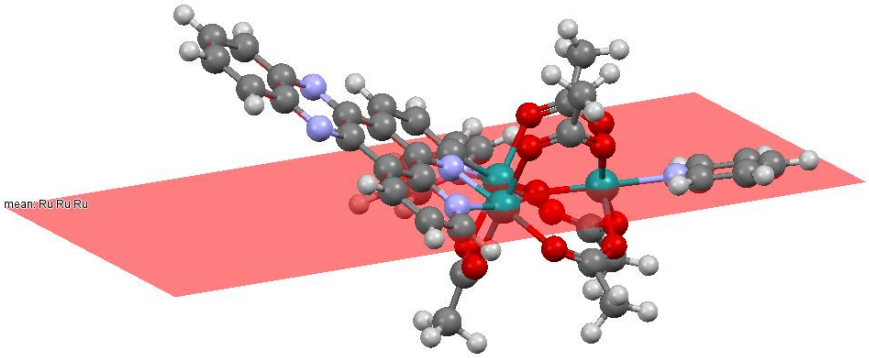
Na Tabela 7 observa-se que os valores de λ_{max} da transição IC para os complexos **(1-5)** não apresentam uma variação significativa com a mudança do ligante bidentado e este mesmo comportamento pode ser observado para os complexos análogos estudados por You, X. Z e colaboradores (QIN, J et al.,2012). Isto indica que a coordenação dos ligantes bidentados nos complexos não altera as propriedades eletrônicas do sistema. Com relação à mistura orbital, a ausência de mudanças espectrais sugere que o arcabouço de orbitais π da unidade $[Ru_3O]^+$ não é perturbado significativamente pelos orbitais π dos ligantes bidentados. Neste caso, as propriedades eletrônicas dos complexos não são influenciadas pelas propriedades dos ligantes (pKa).

Em termos estruturais, na ausência de resultados de DRX para os complexos **(1-5)**, de acordo com os estudos conduzidos por Chen, J e colaboradores para os complexos, ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]PF_6$, (onde L = bipididinas substituídas)), foi observado que o ângulo diedro entre o ligante bidentado e a unidade $[Ru_3O]^+$ é de 36,5º (CHEN, J et al.,2005). Isto comprova que o plano do ligante bidentado não está coplanar com o plano da unidade $[Ru_3O]^+$. Neste caso a ausência de simetria adequada

não favorece a mistura orbital, no que diz respeito a nuvem π dos ligantes bidentados e da unidade metálica.

Na Figura 47, com a otimização da estrutura do complexo **(2)** por TD-DFT observa-se que os três íons metálicos de rutênio apresentam geometria octaédrica distorcida e o plano do ligante bidentado não enontra-se coplanar com o plano da unidade metálica.

Figura 47: Representação da estrutura do cluster (2) ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]PF_6$ otimizada por TD-DFT



Fonte: Autora.

No caso dos complexos com ligantes bidentados da classe das triazina, os quais apresentam o modo de coordenação μ-η^1(N),η^2(N,N), (($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2\{\mu$-η^1(N),η^2(N,N)-bdmt$\}](PF_6)$), onde o átomo de nitrogênio do ligante bidentado se coordena ao íon metálico de rutênio, os autores observaram que o ângulo diedro entre os ligantes bidentados e a unidade metálica é de 4,5º, o que indica que o sistema é coplanar (DAI, F. R et al.,2001). Neste sentido, observa-se que as transições eletrônicas dos complexos sofrem uma variação significativa com a coordenação os diferentes ligantes bidentados. Por meio dos estudos de TD-DFT, os autores também mostraram que os orbitais HOMO da transição IC apresentam contribuição dos orbitais dos íons metálicos de rutênio (~80%) e dos orbitais dos acetatos (~19%),o que está em concordância com o discutido anteriormente com os trabalhos de modelagem apresentados recentemente em nosso grupo de pesquisa para os complexos simétricos e complexos com ligante carbonil (POSSATO, B et al.,2017; PEREZ, N.M.,2018).

Para os complexos **(1-5)** após a substituição da ponte acetato do precursor **(4)**, $[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(H_2O)]^+$ pelo ligante bidentado esperava-se observar alteração nas propriedades eletrônicas da unidade $[Ru_3O]^+$, no entanto os resultados obtidos

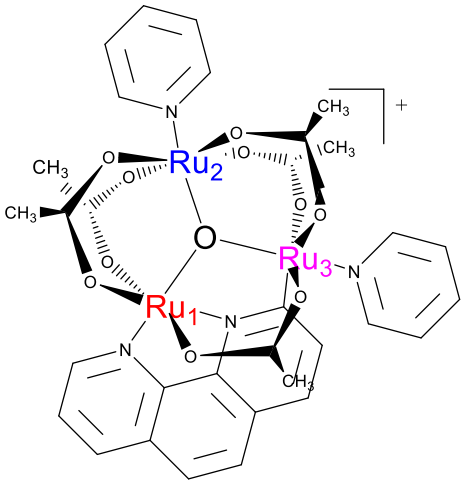
confirmam que a coordenação do ligante bidentado causa distorções no arranjo estrutural do complexo, levando a um sistema de baixa simetria e que não favorece a mistura orbital.

2.12 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

2.21.1 Espectros de IV dos complexos (1-5)

As estruturas dos novos complexos apresentam 5 pontes acetato, Figura 48, sendo que duas pontes estão coordenadas aos íons de **Ru_1^{III}** -py e **Ru_2^{III}** -py, as outras duas encontram-se entre o **Ru_2^{III}** -py e **Ru_3^{III}** - ligante bidentado e uma ponte acetato permanece coordenada entre os íons metálicos de rutênio (Ru_1^{III} e Ru_3^{III}), os quais também estão coordenados com o ligante bidentado. Como discutido anteriormente, os novos complexos apresentam carga formal +1, e cada íon metálico de rutênio apresenta estado de oxidação +3.

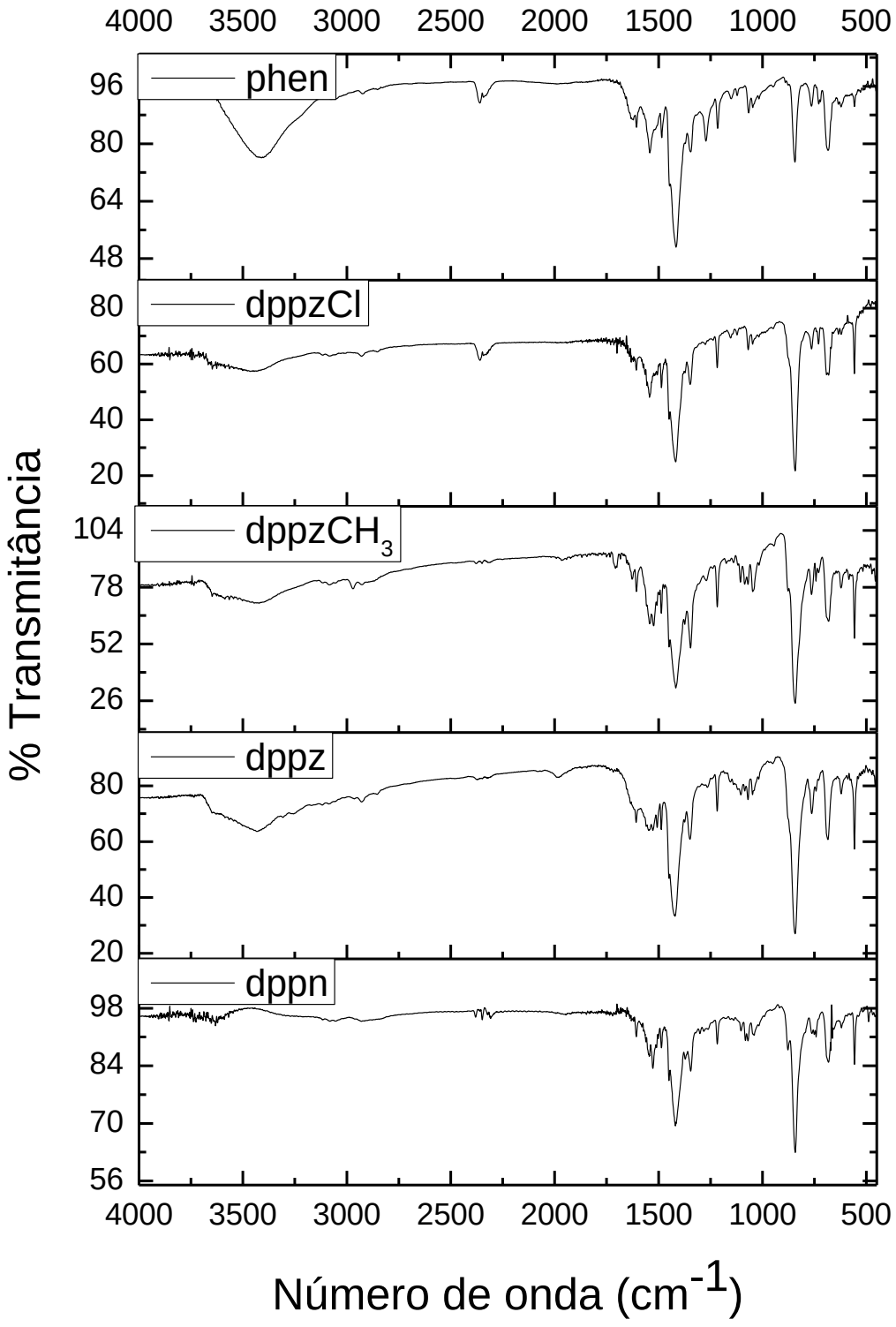
Figura 48: Estrutura do complexo (4) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$



Fonte: Autora.

As tentativas de atribuições das bandas dos complexos **(1-5)** encontram-se na Tabela 8, Figura 49. As atribuições das bandas foram feitas por meio da comparação com os espectros de complexos análogos reportados na literatura (TOMA, H.E et al.,1988; NAKAMOTO, K.,1997; QIN, J et al.,2012; CHEN, J et al.,2005).

Figura 49: Espectros na região do IV dos complexos (1-5) obtidos em pastilha de KBr



Fonte: Autora.

Tabela 8: Valores de frequências máximos observados na região de 4000cm^{-1}-450 cm^{-1}

Cluster 1 dppn (cm^{-1})	Cluster 2 dppz (cm^{-1})	Cluster 3 dppzCH3 (cm^{-1})	Cluster 4 dppzCl (cm^{-1})	Cluster 5 phen (cm^{-1})	Tentativas de atribuição
557	555	557	569	569	$\nu_{as}[Ru_3O]$
681	675	680	677	671	β (OCO)
742	762	769	765	764	ν(CH)
841	843	842	842	844	$\nu_{as}(PF_6)$
____	____	____	925	____	ν(CCl)
1217	1194	1217	1207	1220	γ(CH)
1486	1487	1488	1486	1485	ν(CC)
1345	1351	1352	1352	1344	ν(CN)
1418	1420	1416	1416	1415	$\nu_s(COO^-)Ac$
1543	1546	1544	1543	1541	$\nu_{as}(COO^-)Ac$
1606	1607	1606	1607	1605	$\nu_{as}(COO^-)Ac$
____	3118	3075	3086	3045	ν(CH)
127	187	190	190	200	$\Delta\nu(COO^-)$

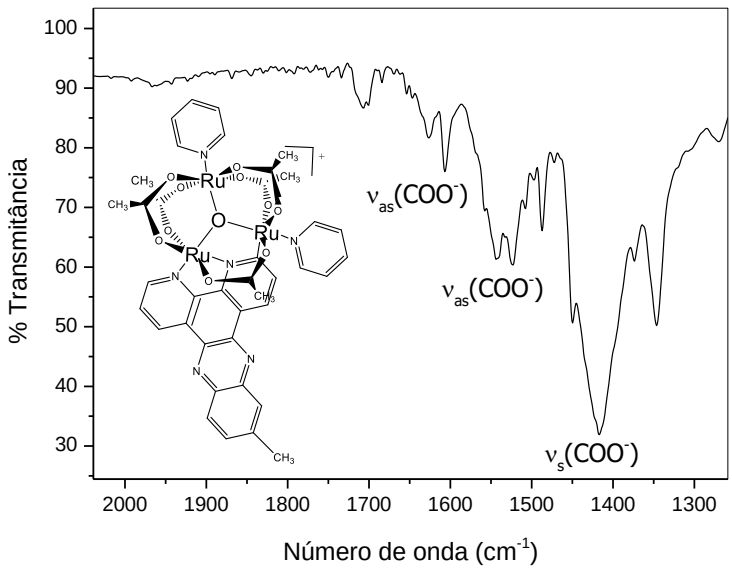
A partir dos valores de $\Delta\upsilon(COO^-)$ (~200 cm^{-1}), calculados para os complexos **(1 - 5)**, foi possível confirmar que os grupamentos acetatos apresentam-se coordenados em ponte com os íons metálicos de rutênio (NAKAMOTO, K.,1997).

Devido ao arranjo estrutural destes complexos, normalmente nos espectros de IV são encontrados diferentes modos de coordenação para os grupos acetatos. Os complexos simétricos $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^+$, apresentam apenas um estiramento simétrico ($\nu_s(COO)$) e assimétrico ($\nu_{as}(COO)$), mas no caso dos complexos com o ligante carbonil, $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(L)_2]^+$, foi possível observar duas bandas para os ($\nu_{as}(COO)$) e apenas uma para o ($\nu_s(COO)$). Neste caso, sabe-se que a localização eletrônica que ocorre nestes complexos, (Ru^{II}-CO, Ru^{III},Ru^{III}) afeta diretamente os modos vibracionais dos grupos acetato que estão coordenados aos íons metálicos de rutênio, os quais apresentam diferentes estados de oxidação (CACITA, N et al.,2015; MOREIRA, M. B et al.,2016).

Nos espectros de IV dos complexos **(1-5)**, foi possível observar três bandas de estiramentos, duas bandas na região de 1605 cm $^{-1}$ e 1545 cm $^{-1}$ que correspondem aos

modos vibracionais assimétricos (ν_{as}(COO)) e uma banda na região de 1415 cm^{-1} referente ao modo vibracional simétrico (ν_s(COO)), Figura 50, sendo que o mesmo comportamento foi observado para os complexos análogos reportados na literatura (CHEN, Z et al.,2005).

Figura 50: Espectro na região do IV do complexo (3), com destaque para os estiramentos dos grupos acetatos (ν_s(COO)) e (ν_{as}(COO)), obtido em pastilha de KBr



Fonte: Autora.

De maneira geral, com relação à energia dos estiramentos (ν_{as}(COO) e ν_s(COO)), os modos vibracionais simétricos são encontrados em região de menor energia quando comparado aos modos vibracionais assimétricos (NAKAMOTO, K.,1997). No caso dos complexos **(1-5)** os estiramentos simétricos dos acetatos foram observados na região de 1415 cm^{-1} e os estiramentos assimétricos na região de mais alta energia (1506 cm^{-1} - 1605 cm^{-1}).

Estudos recentes demonstraram que os valores de estiramentos dos acetatos são influenciados pela natureza π - receptora ou σ - doadora dos ligantes axiais e esta tendência foi relacionada com os valores dos pKa dos ligantes (POSSATO, B et al.,2017; MOREIRA, M.B et al.,2016).

Para os complexos assimétricos $(Ru_3O(OAc)_6(CO)(L)_2)]^0$ (L = ligantes piridínicos com diferentes pKa)) com o ligante CO, a tendência observada é que ligantes periféricos mais básicos doam densidade eletrônica para a unidade $[Ru_3O]^n$. Essa

doação de densidade eletrônica via σ acaba por aumentar a intensidade da retrodoação Ru-CO, resultando em uma diminuição geral na densidade eletrônica do centro metálico. Como consequência, ocorre o enfraquecimento das ligações Ru-Ac e um fortalecimento das ligações carbono-oxigênio no grupo COO^-. O fato se reflete no aumento dos valores de frequência do ν_{as}(COO) com o aumento do pKa dos ligantes piridínicos (MOREIRA, M.B et al.,2016). Esse efeito *push-pull* tem contribuição do ligante CO e dos ligantes piridínicos que estão coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$. Para a classe dos complexos simétricos $(Ru_3O(OAc)_6(L)_3)]^+$ (L = ligantes azanaftalenos), observou-se que os valores das frequências dos $\nu_{as}(COO^-)$ diminuem conforme a basicidade dos ligantes aumenta. Nesse caso, a ausência do efeito de retrodoação implica em um aumento da densidade eletrônica da unidade metálica conforme aumenta o pKa dos ligantes N-heterocíclicos. De modo que as ligações Ru-Ac se fortalecem e as ligações no próprio acetato são ligeiramente enfraquecidas.

É importante destacar que nestes dois exemplos foi observada variação apenas nos valores da frequência dos estiramentos assimétricos. Este efeito pode ser explicado pelo fato de que o modo vibracional do estiramento simétrico se origina em um termo espectroscópico A_1, o qual está relacionado com a simetria σ (NAKAMOTO, K.,1997, POSSATO, B et al.,2017). No caso dos estiramentos assimétricos, ν_{as}(COO), este se origina em um termo espectroscópico B_1, que envolve orbitais p sob simetria σ. São esses orbitais que participam ativamente da coordenação dos acetatos com a unidade $[Ru_3O]^n$, o que explica o fato do modo vibracional ν_{as}(COO) sofrer variações como consequência da perturbação da densidade eletrônica na unidade $[Ru_3O]^n$ causada pelos ligantes (POSSATO, B et al.,2017).

No caso dos novos complexos sintetizados, **(1 - 5)**, os valores das frequências de vibração dos grupos acetato, ν_s(COO) e ν_{as}(COO), não sofrem uma variação significativa, sendo que os desvios observados nos valores é menor do que 4 cm^{-1}. Esta observação sugere que a presença de diferentes substituintes nos ligantes bidentados e a extensão da conjugação π destes ligantes não influencia diretamente os modos de vibração dos grupos acetato.

Nos exemplos citados acima, embora o efeito de variação na frequência do ν_{as}(COO) seja consistente, ele é discreto. Da ordem de 20 cm^{-1} para complexos com ligantes piridínicos com valores de pKa que variam de 3,5 a 7 ao longo da série. No caso dos novos complexos sintetizados, **(1-5)**, os valores das frequências de ν_{as}(COO) não sofrem uma variação significativa, não sendo possível observar uma correlação com

os valores de pKa dos ligantes ortometalados. De fato, os valores de pKa nesta série de ligantes variam menos (de 2,5 (dppn) a 4,5 (fenantrolina), impactando menos a vibração ν_{as}(COO). Esta observação sugere que a presença de diferentes substituintes nos ligantes bidentados e a extensão da conjugação π destes ligantes não influencia diretamente os modos de vibração dos grupos acetato.

Estudos de difração de raios-X, realizados por Dai, F.R e colaboradores em 2008 para um complexo análogo ($[Ru_3O(CH_3COO)_5(py)_2(bpyC{\equiv}C{-}C{\equiv}Cbpy)]^+$), mostraram que as distâncias de ligação Ru-$O_{acetato}$ apresentam valores normais de 2.02-2.09 Å, exceto para o Ru-$O_{acetato}$ orientado na posição *trans* ao íon metálico de rutênio coordenado com o átomo de carbono do ligante bidentado (DAI, F.R et al;2008). Os autores observaram que a distância de ligação Ru-$O_{acetato}$ em *trans* é maior (2.155 Å), sendo que isto ocorre devido à influência *trans* do ligante bidentado, o qual interfere diretamente nas propriedades da ponte acetato que está em posição oposta (DAI, F.R et al.,2008). Este fato sugere que os estiramentos ν_{as}(COO) observados na região de 1606 cm^{-1} podem ser atribuídos aos grupos acetatos em *trans* ao ligante bidentado, pois o enfraquecimento da ligação Ru-$O_{acetato}$ pode ocasionar o fortalecimento das ligações no grupo COO^-.

Nos espectros de IV, Figura 50, as bandas na região de 840 cm^{-1} foram atribuídas ao contra-íon PF_6^-, este o ânion apresenta simetria O_h e também seis modos normais de vibração, contudo, apenas dois são ativos na região do IV (ν(PF) e ν(FPF)) (NAKAMOTO, K.,1997). Além disso, nos espectros foi observada uma banda de fraca intensidade na região de 550 a 570 cm^{-1} que são referentes ao $\nu_{as}[Ru_3O]$. Sobre os estiramentos da unidade $[Ru_3O]^n$ é importante destacar que esta apresenta quatro modos vibracionais que são ativos no IV ($\nu_s[Ru_3O]$, $\nu_{as}[Ru_3O]$, $\delta_s[Ru_3O]$ e $\delta_{as}[Ru_3O]$).Contudo, na faixa de frequências do nosso estudo (450-4500 cm^{-1}), apenas o modo de vibração $\nu_{as}[Ru_3O]$ pôde ser observado (NAKAMOTO, K.,1997).

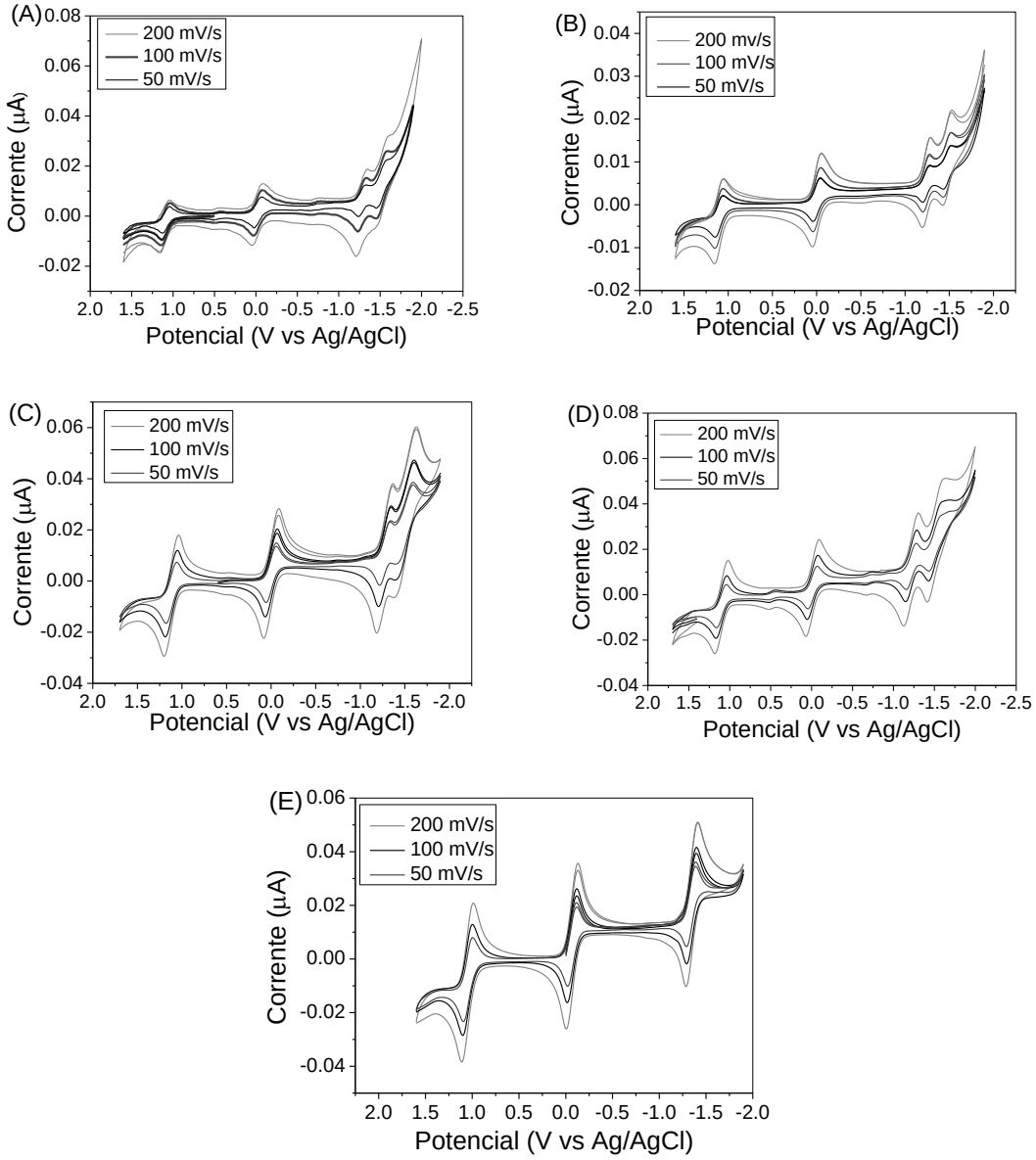
2.13 Voltametria Cíclica

As propriedades redox dos clusters foram investigadas por voltametria ciclíca, Figura 51, e os valores dos potenciais, $E_{1/2}$ (V), calculados para cada processo redox estão apresentados na Tabela 9.

Nos voltamogramas cíclicos dos complexos **(1-5)**, Figura 51, é possível observar três pares de ondas redox reversíveis na região de - 2,0 V a + 2,0 V, os quais foram

atribuídos aos processos redox envolvendo um único elétron, onde os estados de oxidação dos íons metálicos na unidade $[Ru_3O]^n$ sofrem as seguintes variações: ($[Ru_3^{IV,III,III}]^{2+/}[Ru_3^{III,III,III}]^{+}$,$[Ru_3^{III,III,III}]^{+/}[Ru_3^{III,III,II}]^{0}$,$[Ru_3^{III,III,II}]^{0/}[Ru_3^{III,II,II}]^{-}$ e consequentemente a carga formal do complexo apresenta a seguinte variação: $[Ru_3O]^{+2/+1}$, $[Ru_3O]^{+1/0}$, $[Ru_3O]^{0/-1}$.

Figura 51: Voltamogramas cíclicos dos complexos (1-5), (A-E), em CH_2Cl_2 seco, ($5{,}0x10^{-3}$ M, 0,1 M, $TBAPF_6$ Ag/AgCl)



Fonte: Autora.

Tabela 9: Valores de $E_{1/2}$ (V vs Ag/AgCl) obtidos para os complexos (1-5)

Clusters	$E_{1/2}^{1}$ $[Ru_3O]^{+2/+}$	$E_{1/2}^{2}$ $[Ru_3O]^{+/0}$	$E_{1/2}^{3}$ $[Ru_3O]^{0/-1}$	$E_{1/2}^{4}$ Ligante
(1) dppn	1,10	-0,038	-1,28	-1,53
(2) dppz	1,10	-0,008	-1,24	-1,48
(3) dppzCH_3	1,12	-0,004	-1,22	-1,51
(4) dppzCl	1,10	-0,018	-1,21	-1,51
(5) phen	1,05	-0,066	-1,34	---

Nos voltamogramas cíclicos dos complexos trinucleares de rutênio, uma característica importante é que a separação dos processos redox (da ordem de 1 V) fornece informações a respeito da localização/deslocalização eletrônica na unidade $[Ru_3O]^n$. Como exemplo, para os clusters com ligantes CO, a separação entre os processos redox -1/0 e 0/+1 é maior do que a observada para os complexos 0/+1 e +1/+2, o que reforça a alta estabilidade destes complexos na forma reduzida, com carga formal 0 (MOREIRA, M.B et al.,2016). Os complexos com o ligante carbonil apresentam valência localizada, devido o efeito da retrodoação entre o ligante CO e o íon de Ru^{2+}. Para os clusters com ligante NO, observa-se que uma maior separação entre os processos 0/+1 e +1/+2, o que reforça a estabilidade do complexo com carga formal +1. Nesse caso, o centro metálico apresenta um elétron desemparelhado. Aparentemente a grande estabilidade dessas espécies deriva da ocorrência de um acoplamento antiferromagnético entre os elétrons desemparelhados da unidade $[Ru_3O]^+$ e do ligante NO^0 (DA SILVA, C.F.N et al.,2018; TOMA et al.,2005; CACITA et al.,2015).

Nos voltamogramas dos clusters (**1-5**), Figura 51, observa-se uma separação entre os valores de $E_{1/2}$ mais uniforme entre os processos redox da unidade $[Ru_3O]^n$, ($[Ru_3O]^{+2/+1}$, $[Ru_3O]^{+1/0}$, $[Ru_3O]^{0/-1}$), sendo que este mesmo comportamento foi observado para os clusters simétricos, devido à deslocalização eletrônica no sistema (POSSATO, B et al.,2017). Esta intensa deslocalização eletrônica interfere diretamente nas propriedades destes complexos. Dentro da classe dos complexos de valência mista, de acordo com a intensidade da interação eletrônica, os complexos podem ser classificados de 3 maneiras diferentes (Classificação de Robin e Day). No caso destes clusters, a mistura orbital resulta em uma intensa deslocalização eletrônica e desta

forma estes complexos pertencem à classe III de Robin e Day (TOMA, H.E et al.,2002; ROBIN, M.B et al.,1968).

A investigação da variação dos processos redox para uma série de carboxilatos trinucleares de rutênio coordenados a diferentes ligantes piridínicos (L), ($[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^+$ e $[Ru_3O(OAc)_6(CO)(L)_2]$, mostrou claramente uma tendência da diminuição dos valores de $E_{1/2}$ (V) com o aumento do pKa dos ligantes axiais (CUNHA, C.J.,1989; MOREIRA, M.B et al.,2016; POSSATO, B et al.,2017). A comparação dos valores de potencial indica que os ligantes mais básicos doam densidade eletrônica para a unidade $[Ru_3O]^n$, e desta forma torna-se mais fácil oxidar o centro metálico e consequentente os potenciais são deslocados para valores mais negativos.

No geral, essa mesma tendência foi observada para os complexos **(1-5)**, cujos potenciais ($E_{1/2}$ (V)), se deslocam para valores mais negativos em função do aumento do pKa dos ligantes bidentados. Porém, no caso desta série, o efeito é muito pequeno, corroborando as observações feitas nas técnicas de espectroscopia eletrônica e de infravermelho de que o ligante ortomelatado influencia pouco as propriedades eletrônicas da unidade $[Ru_3O]^n$.

2.14 Espectroeletroquímica

As medidas de espectroeletroquímica são importantes, pois esclarecem sobre as atribuições dos processos redox que ocorrem na faixa do potencial aplicado. Por meio da variação espectral em função do potencial aplicado é possível analisar a natureza das transições eletrônicas, ou seja, pode-se avaliar se as transições ocorrem entre orbitais que apresentam caráter de metal ou intrinsecamente dos ligantes (KUWANA, Y.;et al.,1964). No caso das bandas de TCCL analisar este tipo de contribuição é muito importante, pois confirma os aspectos relacionados à mistura orbital que ocorre no arranjo estrutural destes compostos (POSSATO, B et al.,2017).

Com aplicação de potencial negativo (0,0 V a -1,0 V) foi possível observar nos espectros dos complexos **(1-5)** uma diminuição acentuada das bandas na região de 690 nm atribuídas às transições internas da unidade $[Ru_3O]^n$ para as espécies $[Ru^{III,III,III}]^+$, seguida do surgimento das bandas na região de 900 nm atribuída a espécie reduzida $[Ru^{III,III,II}]^0$ e o aumento de intensidade das bandas na região de 340 nm (TCCL).

O deslocamento da banda IC para uma região de menor energia pode estar relacionado com a desestabilização dos níveis energéticos da unidade $[Ru_3O]^n$ após

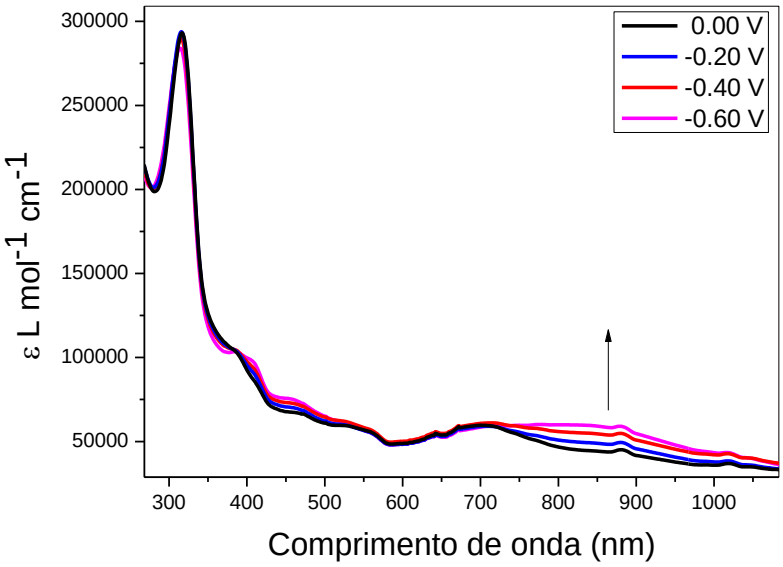
receber elétrons, o que consequentemente é observado pela formação de uma banda na região de 900 nm. Nas Figuras 52 - 56 apresentam-se os espectros dos complexos que foram obtidos após a aplicação dos potenciais negativos.

É importante destacar que este mesmo comportamento foi observado com os complexos simétricos do tipo $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]^n$ L = ligantes piridínicos (TOMA, H. E et al.,2006; NIKOLAOU, S.,2002). Nestes trabalhos os autores propuseram que o deslocamento da banda IC para uma região de menor energia, está diretamente relacionado com o preenchimento dos orbitais durante a redução, o que consequentemente desestabiliza os níveis energéticos da unidade $[Ru_3O]^n$, e a transição neste caso é observada em maior comprimento de onda $\lambda_{máx}$. Como consequencia desta desestabilização também ocorre o deslocamento das bandas de TCCL (NIKOLAOU, S.,2002). Recentemente, esta mesma tendência foi observada nos estudos dos complexos simétricos com ligantes azanaftalenos (POSSATO, B et al.,2017).

Com a aplicação de potenciais positivos 0 a 1.0 V foi possível observar uma alteração espectral diferente nas bandas dos complexos, Figura 57. No espectro eletrônico do complexo (5) pode-se observar o deslocamento da banda na região de 690 nm para 590 nm e também se observa o surgimento de uma banda próximo de 800 nm.

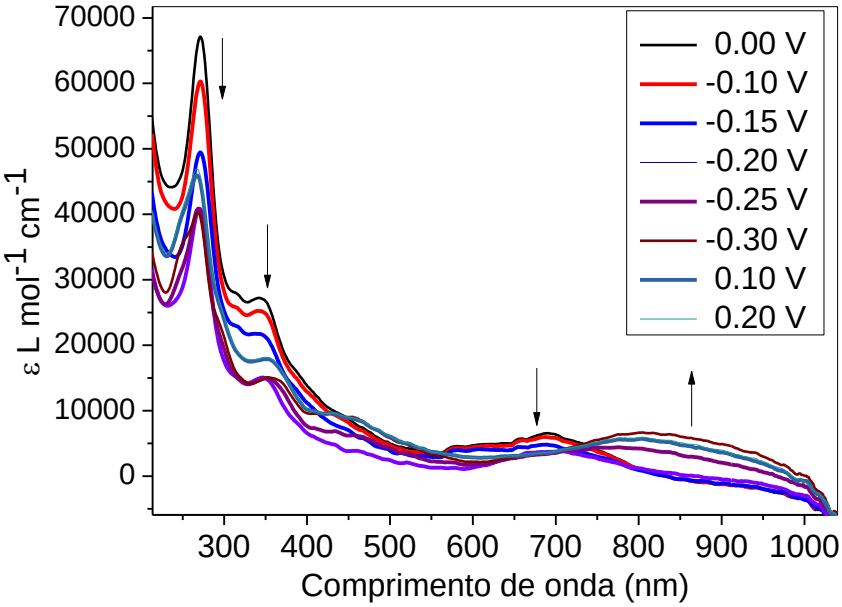
Com a aplicação de potenciais positivos a espécie $[Ru^{III,III,III}]^+$ sofre oxidação e uma nova espécie é formada $[Ru^{III,III,VI}]^{2+}$, sendo que o mesmo perfil espectral foi observado por Nunes, S. G e Possato, B et al para os complexos simétricos $[Ru_3O(OAc)_6(py)_3]PF_6$ após a aplicação de potencial positivo (POSSATO, B et al.,2017; NUNES, S. G.,2005). O deslocamento da banda IC para uma região de maior energia ocorre devido a estabilização dos níveis dπ do metal, ao perder elétrons, e consequentemente é observado a formação de uma banda de menor $\lambda_{máx}$. No processo de oxidação da espécie $[Ru^{III}Ru^{III}Ru^{III}]^+$, com configuração eletrônica $(a''_2)^2$ $(e')^4$ $(a'_1)^2$ $(e')^4$ $(e'')^4$ $(a'_2)^1$, ocorre a perda do elétron desemparelhado $(a'_2)^1$ e ocorre a formação da espécie $[Ru^{III}Ru^{III}Ru^{VI}]^{2+}$.

Figura 52: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (1), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)



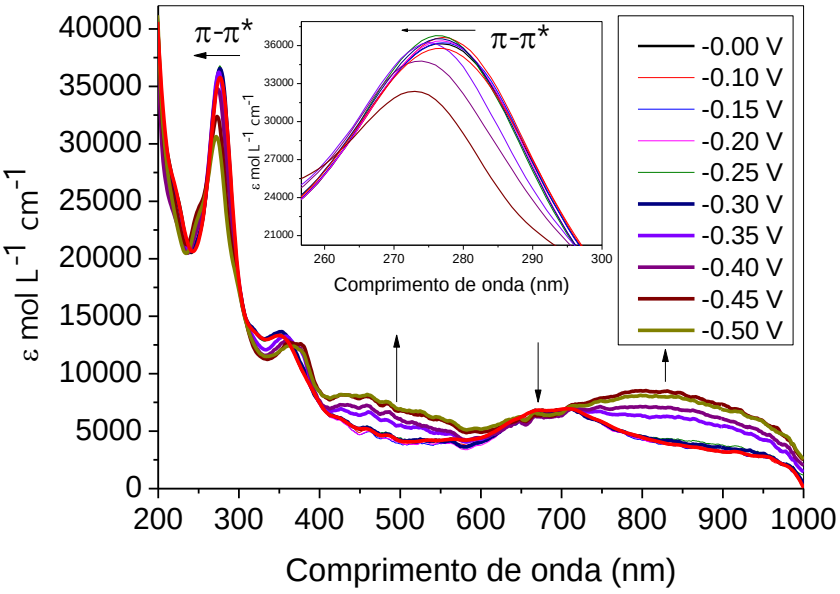
Fonte: Autora.

Figura 53: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (2), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)



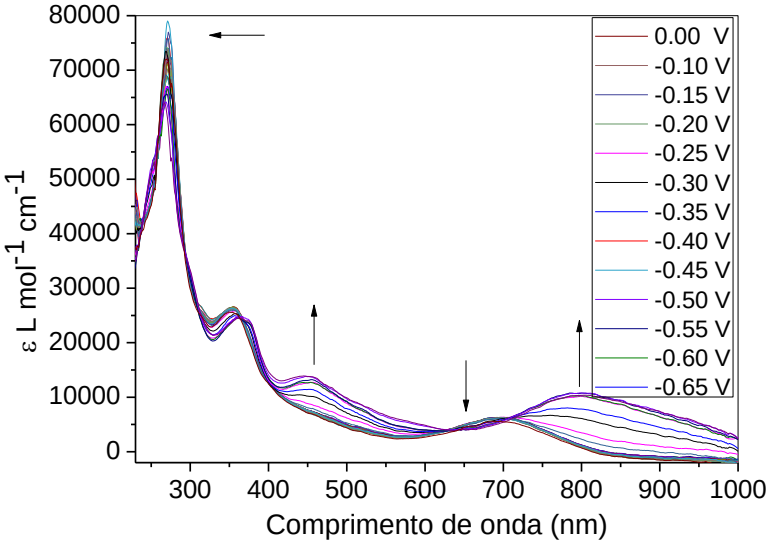
Fonte: Autora.

Figura 54: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (3), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)



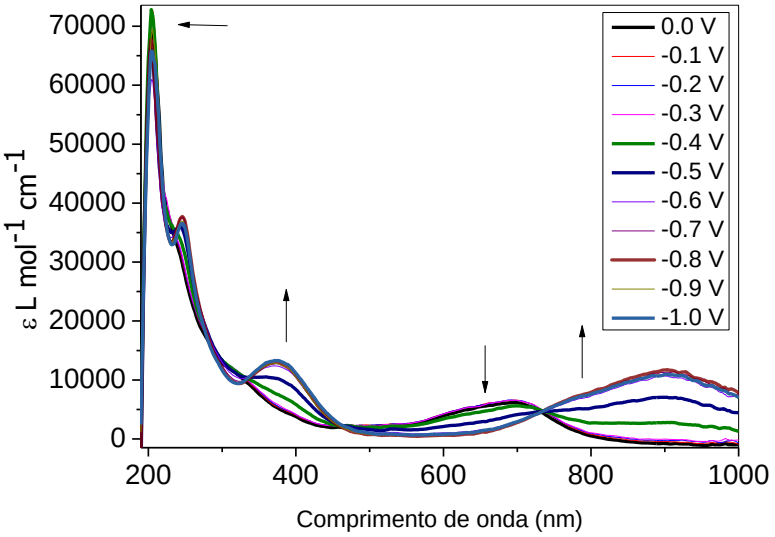
Fonte: Autora.

Figura 55: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (4), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)



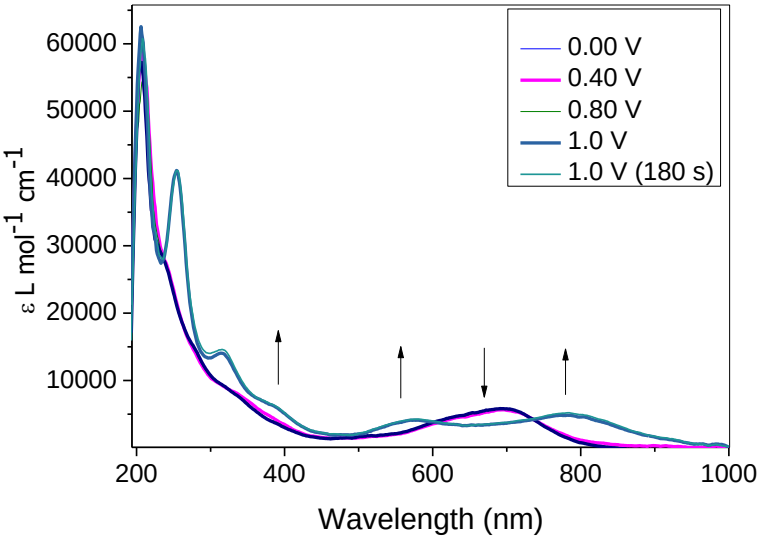
Fonte: Autora.

Figura 56: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (5), registrados após aplicação de potencial negativo, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)



Fonte: Autora.

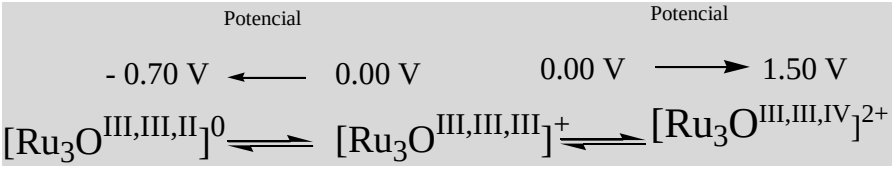
Figura 57: Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo (5), registrados após aplicação de potencial positivo, mostrando o processo oxidativo $[Ru_3O]^{+1/+2}$, ([5,0 10^{-4} M]; 0,1 M NBu_4PF_6, ACN)



Fonte: Autora.

Portanto, na faixa de potencial aplicado e com as alterações espectrais observadas, os seguintes eventos podem ser atribuídos, Figura 58:

Figura 58: Esquema proposto para os processos de oxidação e redução dos complexos (1-4) após a aplicação de diferentes potenciais



Fonte: Autora.

Com as análises dos resultados de espectroeletroquímica obtidos para os complexos **(1-4)**, no geral foi possível observar um comportamento muito semelhante ao que está descrito na literatura para os complexos simétricos com ligantes piridínicos $[Ru_3O(OAc)_6(py)_3]PF_6$ (TOMA, H.E et al.,1989). Observou-se também que, aparentemente, as transições internas dos ligantes respondem à redução ou à oxidação da unidade $[Ru_3O]^n$. Este efeito provavelmente está relacionado com a sobreposição espectral entre essas transições e as TCCL. Mudanças nos máximos de absorção das transições de transferência de carga acompanham os processos redox da unidade metálica. São essas mudanças que removem parcialmente a sobreposição entre IL e TCCL, causando as alterações espectrais observadas na região de maior energia do espectro.

3. Considerações Parciais

Os ligantes bidentados (dppn, dppz, $dppzCH_3$, dppzCl), bem como os precursores **(1-4)** foram sintetizados e caracterizados.

Foi possível obter os novos complexos ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]PF_6$, onde **(1)** L_1 = dppn, **(2)** L_2 = dppz, **(3)** L_3 = $dppzCH_3$, **(4)** L_4 = dppzCl, **(5)** L_5 = phen), por meio da metodologia de síntese aplicada, e os resultados de caracterização confirmaram que os complexos foram purificados com sucesso.

A pureza e obtenção dos complexos **(1-5)** foram confirmadas por meio dos resultados das análises elementares, espectros de Massas e também pelos estiramentos dos grupos acetatos e dos ligantes observados nos espectros de IV.

Os resultados de EPR confirmaram que os complexos obtidos são paramagnéticos, contudo o padrão isotrópico dos espectros confirma a intensa

deslocalização eletrônica que ocorre na unidade $[Ru_3O]^n$, o que diminui o efeito da anisotropia paramagnética causada pelo elétron desemparelhado.

Por meio dos espectros de RMN foi possível confirmar a baixa simetria dos complexos. Além disso, foi possível observar que os valores dos deslocamentos químicos das metilas dos grupos acetatos são influenciados pela natureza dos ligantes bidentados. Além dos complexos **(1-5)** apresentarem isômeros ópticos, nos espectros de RMN dos complexos **(3-4)** observou-se que os sinais dos prótons aparecem duplicados e isto pode estar relacionado com a formação de isômeros devido à presença dos grupos substituintes (CH_3 e Cl) nos ligantes bidentados.

Os prótons dos ligantes bidentados sofrem influência da anisotropia paramagnética e encontram-se deslocados para campo mais alto.

A investigação das propriedades espectroscópicas dos complexos por meio das técnicas de UV-Vis mostrou que as transições eletrônicas da unidade $[Ru_3O]^+$ não são influênciadas pela coordenação dos ligantes bidentados. Os λ_{max} das transições IC não apresentam uma variação significativa para os complexos **(1-5)**. Este efeito indica que não há interação de natureza π entre os orbitais da unidade metálica e os orbitais π dos ligantes bidentados.

Os processos redox dos complexos foram observados por voltametria cíclica e os valores de $E_{1/2}$[1] referentes aos processos $[Ru_3O]^{+2/+}$, $[Ru_3O]^{+/0}$, $[Ru_3O]^{0/-1}$ encontram-se deslocados para valores mais negativos em função do aumento do pKa dos ligantes bidentados. No entanto, o efeito observado é muito pequeno o que reforça a observação de que a coordenação do ligante ortometalado causa pouca influência nas propriedades eletroquímicas dos complexos. Este efeito reforça o que foi discutido anteriomente em termos da "ausência" de interações entre os orbitais π da unidade metálica e do ligante bidentado.

As mudanças observadas nos espectros eletrônicos após a aplicação de potenciais mostraram que as transições na região de alta energia respondem à redução e oxidação da unidade metálica. No entanto, nesta região do espectro há sobreposição entre transições IL e TCCL e desta forma não foi possível atribuir a natureza destas alterações espectrais.

No geral, os dados de caracterização permitiram confirmar que as estruturas propostas foram obtidas com pureza adequada e desta forma permitiram avançar os estudos para a compreensão das propriedades fotofísicas dos complexos, bem como a investigação da atividade biológica.

Em termos estruturais foi possível caracterizar os complexos e também compreender que a não ocorrência de perturbações eletrônicas nestes complexos é consequência da ausência de interação π no sistema.

Capítulo 3:

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DOS CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO

1. INTRODUÇÃO

O estudo da absorção óptica do estado excitado das moléculas pode ser investigado por meio da técnica de flash-fotólise, também denominada espectroscopia de absorção resolvida no tempo ou fotólise por pulso de laser (PORTER, G.; NORRISH, W.G.R., 1949).

A técnica de flash fotólise foi introduzida em 1949 pelos ingleses George Porter e Ronald G W Norrish ao estudarem reações rápidas (PORTER, G; NORRISH, W.G.R.,1949). Todavia, em 1967 o Prêmio Nobel de Química foi concedido, a Manfred Eigen, Ronald George,Wreyford Norrish e George Porter com o seguinte mérito: *"para seus estudos de reações químicas extremamente rápidas, efetuadas por perturbar o equilíbrio por meio de pulsos muito curtos de energia"*, (tradução livre), (PORTER, G; NORRISH, W.G.R.,1949).

Na literatura encontram-se trabalhos em diversas áreas, como exemplo, na área biológica pesquisadores investigaram a dinâmica de transferência de elétrons em bases nitrogenadas do DNA por meio dos estudos dos estados tripletos e dos intermediários de reação (WAN, C. et al.,1999).

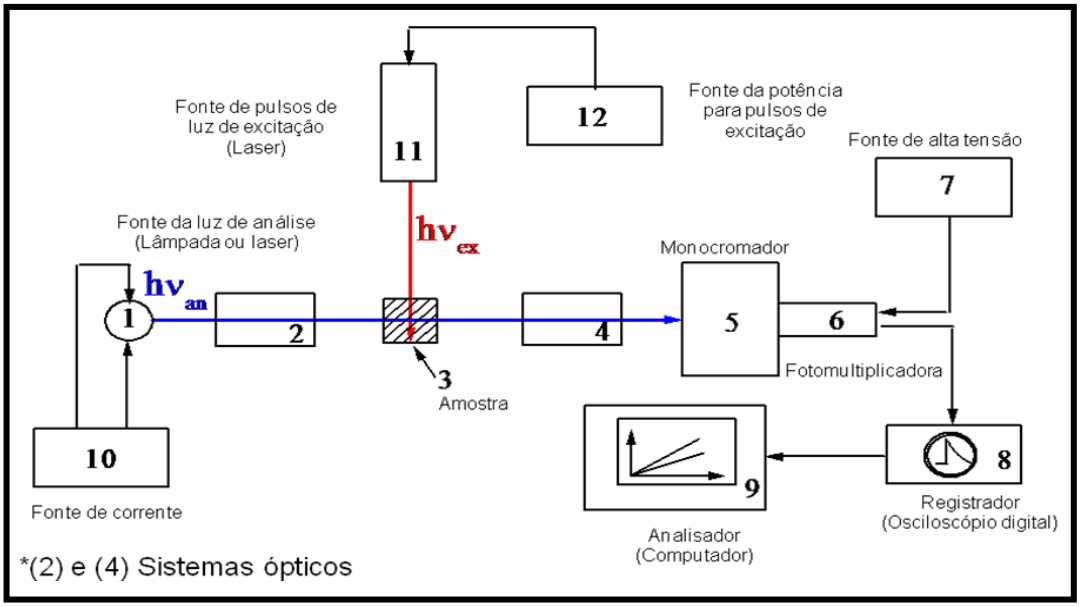
No entanto é importante destacar que com o desenvolvimento das fontes de excitação pulsadas (lâmpada de pulso e lasers), esta técnica teve um avanço significativo (PARRA, G.G.,2010).

No geral, o princípio desta técnica está relacionado com a excitação do sistema de estudo (amostra), através de um intenso e curto pulso de radiação óptica (luz) com freqüência na qual a amostra absorva (BERERA, R et al.,2009). Nesta etapa o sistema é perturbado e como resultado as moléculas são levadas ao estado excitado, sendo que ao retornar ao estado fundamental as moléculas podem emitir fluorescência, dissipar a energia na forma de calor (radiação térmica) ou até mesmo reagir (BERERA, R et al.,2009). É importante destacar que dependendo do tipo de experimento, somente 0,1% a 10% das moléculas são promovidas para o estado excitado, sendo este fator diretamente relacionado com a intensidade do pulso de luz. Paralelamente a este evento, uma luz de radiação contínua permanecerá incidindo sobre a amostra e irá monitorar as mudanças na absorção da amostra, enquanto as moléculas ainda se encontram no estado transiente (estado excitado) (BERERA, R et al.,2009). De maneira geral, esta técnica consiste em monitorar a dependência temporal da absorção óptica do sistema, ou seja,

monitora as variações de absorção em função do tempo. Com isso, algumas características da amostra no estado excitado podem ser determinadas, tais como: tempo de vida do transiente, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de compostos com curtos tempos de vida induzidos pela luz (BERERA, R et al.,2009).

Basicamente, o equipamento de flash fotólise para análise da absorção óptica apresenta em sua constituição dois canais: um de excitação (geralmente um laser de pulso) e o outro é o canal de análise (apresenta uma fonte de luz contínua ou pulsada). Na Figura 59 apresenta-se a estrutura geral deste equipamento.

Figura 59: Esquema geral do equipamento de flash-fotólise

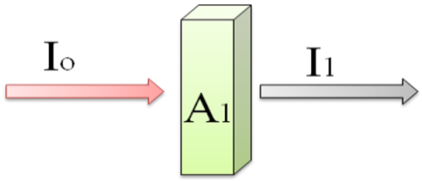


Fonte: Adaptado de GONÇALVES, P. J.,2006.

Em relação aos procedimentos para serem realizados neste equipamento, algumas características importantes devem ser analisadas, dentre elas: o tempo de duração do pulso (τ_p) e sua energia (no canal de excitação), bem como as regiões espectrais de excitação e da análise. Também é importante o conhecimento prévio da amostra em estudo, pois a formação de fotoisomêros, radicais livres e agregação podem alterar os resultados esperados (BERERA, R et al.,2009).

Sendo o espectro de absorção da espécie transiente diferente do seu estado inicial, pode-se determinar a cinética de decaimento e o tempo de vida das espécies transientes por meio das medidas de absorbância (GONÇALVES, J.P., 2010; PARRA, G.G.,2010). Desta forma, este estudo pode ser realizado da seguinte maneira:

- Quando a luz de intensidade I_0 incide sobre uma amostra, parte desta intensidade é absorvida (A_1) e uma intensidade I_1 é transmitida pela amostra:



Neste caso:

$$\mathbf{I_0 = I_1\, e^{-A1}} \qquad \text{Equação 2}$$

- Na presença do pulso de excitação será observada uma alteração na absorção (A_2) com a intensidade transmitida I_2:

$$\mathbf{I_0 = I_2\, e^{-A_2}} \qquad \text{Equação 3}$$

- As intensidades e absorções estão relacionadas conforme a Equação 4:

$$\mathbf{I_2/I_1 = e^{-(A_2-A_1)} = e^{-\Delta A}} \qquad \text{Equação 4}$$

Se considerarmos I_2 como I_1 - ΔI, temos a Equação 5:

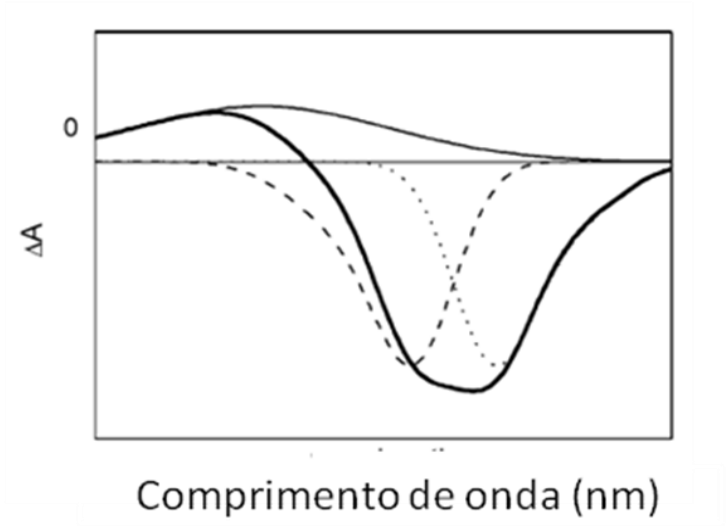
$$\mathbf{I_1 / I_1 - \Delta_I = e^{\Delta A}} \qquad \text{Equação 5}$$

Aplicando log nos dois lados da Equação 6, temos:

$$\mathbf{\Delta A = \log I_1 / I_1 - \Delta I} \qquad \text{Equação 6}$$

No geral, a variação de absorbância (ΔA) registrada nos espectros contém informações importantes a respeito dos processos que estão ocorrendo no estado excitado. Como exemplo, na Figura 60 apresenta-se um espectro de absorção de transientes.

Figura 60: Espectros de absorção de transientes: descoramento do estado fundamental (linha tracejada), emissão estimulada (linha pontilhada), absorção de estado excitado (linha contínua), soma dessas contribuições (linha cinza)



Fonte: Adaptado de BERERA, R., et al.,2009.

A primeira contribuição é observada devido ao descoramento do estado fundamental (linha tracejada). Após a irradiação da amostra com o laser, (pulso do laser), uma fração das moléculas é promovida para o estado excitado o que consequentemente diminui a fração de moléculas no estado fundamental (BERERA, R et al.,2009). Sendo assim, a absorção do estado fundamental na amostra excitada é menor e desta forma é gerado um sinal negativo no espectro, denominado *"bleach*" (descoramento). Nos espectros também podem ser observados sinais positivos, os quais contêm informações sobre o estado excitado da amostra (BERERA, R et al.,2009). Além disso, outros sinais relacionados com a emissão e as reações no estado excitado também podem ser observados.

Com o espectro de absorção dos transientes é possível estudar a cinética de decaimento do estado excitado através da variação da absorção e estudar os estados excitados eletrônicos, espécies radicalares, fotoisômeros e formação de fotoprodutos secundários (BERERA, R et al.,2009).

Algumas limitações da técnica estão relacionadas ao tempo de duração do pulso e a região espectral delimitada pelo equipamento. Em termos experimentais soluções das amostras em altas concentrações podem afetar os resultados e a presença de oxigênio no meio reacional pode suprimir o decaimento do estado tripleto (BERERA, R et al.,2009).

No contexto dos carboxilatos trinucleares de rutênio, as propriedades fotofísicas destes complexos têm sido exploradas em estruturas de dímeros ou trímeros. A principal investigação diz respeito às reações de transferência de elétrons em carboxilatos que apresentam íons de valência mista, como exemplo, o complexo $[Ru_3O(OAc)_6(L)(CO)(\mu\text{-}BL)Ru_3O(OAc)_6(L)(CO)]^-$ (L = ligantes piridínicos, BL = 4,4 - bipiridina ou pirazina) (PETERSSON, J et al.,2015; HENDERSON, J et al.,2014). Utilizando a técnica de flash-fotólise, nestes trabalhos foram investigadas as dinâmicas de reações de transferência de elétrons que ocorrem em sistemas com íons de valência mista, sendo estas reações extremamente rápidas.

Em relação às propriedades fotofísicas dos carboxilatos trinucleares de rutênio, estes complexos são não fluorescentes e além do mais apresentam tempo de vida extremamente curto no estado excitado, na ordem de picosegundos a femtosegundos. Para estes complexos, também não há relatos da produção de oxigênio singleto, ou seja, não ocorre a transferência de energia entre o estado excitado e o oxigênio molecular.

No entanto, nesta etapa do trabalho realizaram-se estudos preliminares com o intuito de conhecer esta nova classe de complexos **(1-5)**, as espécies formadas no estado excitado, bem como avaliar a influência dos ligantes bidentados nos espectros dos transientes.

2. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais e Métodos

2.11 Estudos de fotoestabilidade dos carboxiltaos trinucleares de rutênio

A fotoestabilidade foi verificada em soluções dos complexos em metanol e diclorometano. As soluções dos complexos foram preparadas de modo que a absorção da banda mais intensa estivesse entre 1,0 e 1,5. As amostras foram irradiadas com lâmpada de Xe (LPS-220 equipada com um ignitor LPS-221 - Photon Technology International). Os espectros foram registrados em intervalos de tempo de 5 minutos. Em todas as medidas as soluções dos complexos foram previamentes desaeradas em atmosfera de argônio.

2.12 Estudos fotofísicos

Para a realização deste estudo, as soluções dos complexos foram preparadas em DCM e os espectros UV-Vis registrados para obtenção de soluções com absorção da

banda mais intensa entre 1,0 e 1,5. As soluções dos complexos foram previamente desaeradas em atmosfera de argônio e a cubeta foi devidamente vedade para evitar contato das soluções dos complexos com $O_{2(g)}$. Após os estudos fotofísicos checaram-se os espectros UV-Vis de todas as amostras dos complexos.

2.13 Obtenção do complexo reduzido $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^0$

A redução do complexo oxidado **(2)** utilizando-se solução de hidrazina foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Chen e colaboradores (CHEN, J et al.,2005).

Em um balão reacional contendo 15 mL de DCM adicionou-se (50 mg, 0.00416 mmol) do complexo oxidado (**2**). O sistema foi mantido em agitação e adicionou-se gota a gota de uma solução aquosa de hidrazina (70%) até observar a mudança de coloração da solução de verde para marrom. Em seguida 15 mL de água foram adicionados no balão, o qual foi mantido em agitação por 30 min. Na próxima etapa a fase aquosa foi separada da fase orgânica (DCM) utilizando-se um funil de separação. A fase orgânica (DCM) foi rotoevaporada e o produto foi recristalizado com DCM e hexano e seco no vácuo.

Obteve-se 0,41 mg do complexo reduzido, (MM= 1054,93 g/mol, 0,0038 mmol, η= 94 %).

2.2 Equipamentos e métodos utilizados

2.21 Sistema de irradiação

Os experimentos de fotólises foram realizados utilizando-se lâmpada de Xe (LPS-220 equipada com um ignitor LPS-221 - Photon Technology International).

2.22 Espectroscopia resolvida no tempo - fotólise por pulso de laser

Os espectros de absorção dos transientes na escala de nanosegundos foram resgistrados no equipamento Three Quanta-Ray acoplado com um sistema de laser pulsado Nd:YAG (fwhm ~8 ns).

Os espectros de absorção dos transientes na escala de femtosegundos foram realizados no equipamento disponível no Departamento de Química da Universidade de Ohio (Center for Chemical and Biophysical Dynamics - The Ohio State University), **ANEXO XI.**

O oscilador Ti: Safira (Vitara-S, Coherent) gerou pulsos de 20 fs a 80 MHz para um amplificador regenerativo Ti:Safira de alta energia (Astrella, Coherent) para produzir pulsos de 7 mJ, 35 fs a 1 kHz. 3 mJ destes pulsos foram inseridos em um amplificador paramétrico óptico (OPerA Solo, Coherent) para gerar pulsos de 700 nm. As amostras foram excitadas com 4,0 μJ. Uma câmera CCD (Princeton Instrument, 1340 × 100 pixels) e o programa LabView (PIXIS, Princeton Instruments) foram construídos para coletar os dados espectrais. A resposta do instrumento foi determinada como 85 fs através do efeito de Kerr em ciclohexano. Uma célula de fluxo Harrick Scientific de caminho óptico de 1 mm foi equipada com janelas de CaF_2 de 1 mm e utilizou-se um volume de amostra de ~ 4 mL. O ângulo de polarização entre a bomba e os pulsos foi ajustado para evitar os efeitos da difusão rotacional. Todos os espectros registrados foram corrigidos no contínuo de luz branca. As curvas cinéticas foram analisadas por meio dos decaimentos mono ou biexponenciais dos espectros, os quais foram plotados utilizando-se o software Igor Pro (6.3).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Investigação óptica dos espectros de absorção dos transientes do precursor (4) e dos complexos (1-5)

Os espectros de absorção de transientes dos complexos foram obtidos com a colaboração da aluna de doutorado Congcong Xue, no grupo da Profa Claudia Turro, (The Ohio State University).

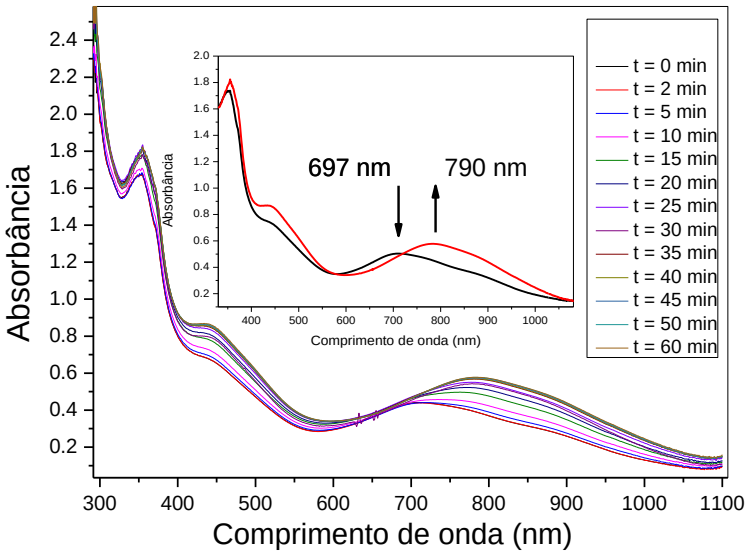
Na literatura não há relatos sobre os estudos de espectroscopia resolvida no tempo para os complexos com ligantes bidentados, desta forma apresenta-se pela primeira vez a investigação das propriedades fotofísicas destes complexos.

Como discutido no Capítulo 2, a substituição da ponte acetato por ligantes bidentados não influencia as propriedades eletrônicas e eletroquímicas destes complexos. No entanto, o objetivo principal dos estudos fotofísicos foi caracterizar os estados excitados dos complexos, uma vez que a literatura só traz resultados para sistemas oligoméricos (PETERSSON, J et al.,2015; ITOU, M et al.,2005).

O primeiro desafio para realizar estes experimentos, foi à escolha do solvente. Os complexos apresentam uma ampla solubilidade em solventes orgânicos, como exemplo: ACN, DCM e MeOH.

Os estudos de estabilidade e fotoestabilidade dos complexos foram realizados em MeOH. Neste caso, durante os experimentos de fotólise (irradiação com lâmpada de Xe) observou-se alteração espectral dos complexos, Figura 61. Durante os intervalos de irradiação, observou-se claramente a diminuição da banda em 690 nm atribuída à transição IC e a formação de uma nova banda na região de 800 nm. Este deslocamento batocrômico da IC caracteriza a redução do complexo, ou seja, nestas condições ocorre a formação de um complexo reduzido, com carga formal 0, onde os íons de rutênio apresentam estados de oxidação Ru(III), Ru(III), Ru(II), (TOMA, H.E et al.,2011).

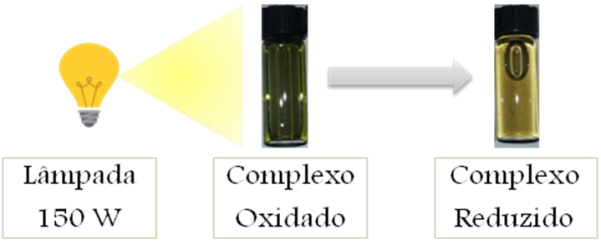
Figura 61: Espectro de absorção do complexo (2) [$Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)](PF_6)$ durante os experimentos de fotólise (150 W - Lâmpada de Xe), em solução de metanol (Tempo total de irradiação = 60 minutos)



Fonte: Autora.

Como representado na Figura 62 após a fotólise observou-se mudança de coloração da solução do complexo de verde para amarela.

Figura 62: Soluções do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)](PF_6)$ antes e depois da fotólise, utilizando-se lâmpada de Xe



Fonte: Autora.

No entanto, soluções controle dos complexos foram mantidas na ausência de irradiação, e após registrar os espectros eletrônicos foi possível observar a mesma mudança espectral. Com isso foi possível confirmar que a redução dos complexos ocorre devido à presença do metanol, pois outros solventes tais como DCM e ACN foram utilizados neste estudo e não foi observada alteração espectral dos complexos. Portanto, os estudos fotofísicos foram realizados em DCM.

Estes resultados prévios relacionados com a estabilidade dos complexos em metanol confirmam as propriedades catalíticas dos carboxilatos trinucleares de rutênio em processos que envolvem a oxidação de álcoois (DAVIS, S et al.,1988; HITRIK, M et al.,2016). Em 2010, Toma, H.E e colaboradores reportaram as propriedades do complexo $[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)]^+$, como uma espécie eletrocatalítica efetiva para a oxidação de metanol sob determinadas condições (TOMA, H.E et al.,2010; NUNES, S.G,2005).

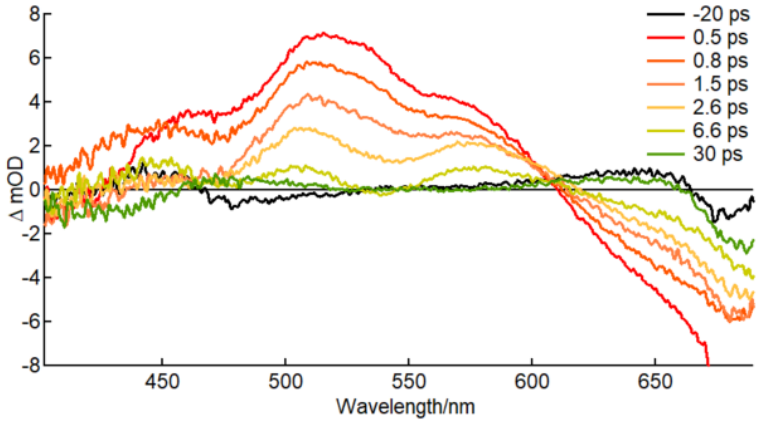
Os espectros de absorção dos transientes para os complexos **(1-5)** foram investigados primeiramente no equipamento que permite o registro dos espectros na escala de nanosegundos. No entanto nenhum sinal foi observado, o que confirma o tempo de vida curto destes complexos no estado excitado. De posse dessa informação, as medidas foram conduzidas no equipamento que permite o registro dos espectros na escala de femtosegundos.

Para verificar o efeito da substituição da ponte acetato pelo ligante bidentado, os espectros de absorção de transientes também foram registrados para os complexos (**1-5**) e para o precursor (**4**), o qual apresenta seis pontes acetato ($[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)](PF_6)$.

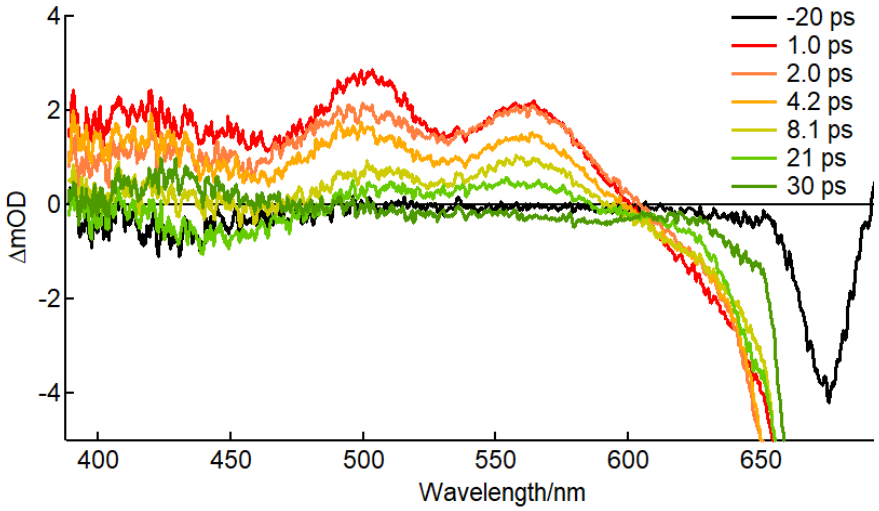
Na Figura 63 apresentam-se os espectros de absorção dos transientes, registrados para os complexos oxidados e precursor **(4)** com carga formal +1.

Figura 63: Espectros de absorção dos transientes (femtosegundos) para os complexos (1-5) - (A - E) e para o precursor (4) - (F), em DCM, (λ_{exc} = 700 nm, 4 µJ)

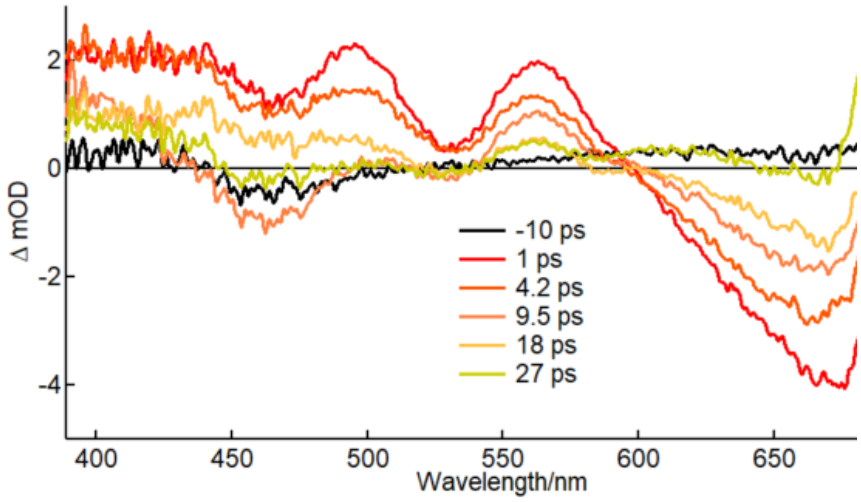
(A) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$



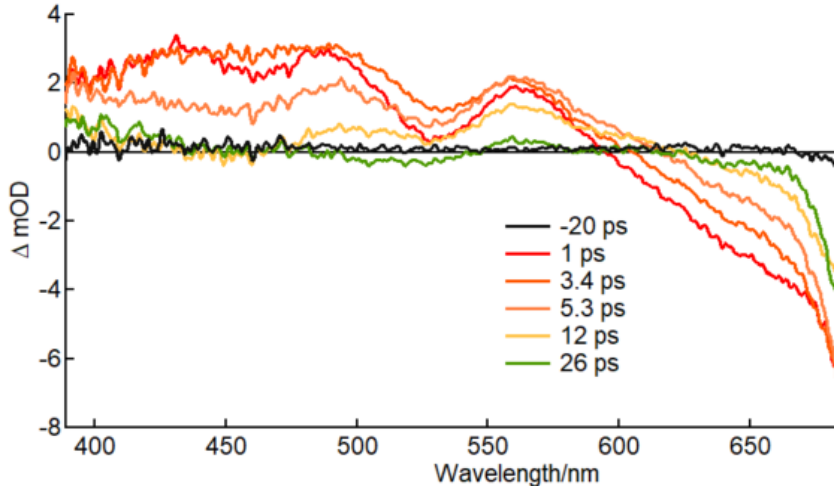
(B) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$



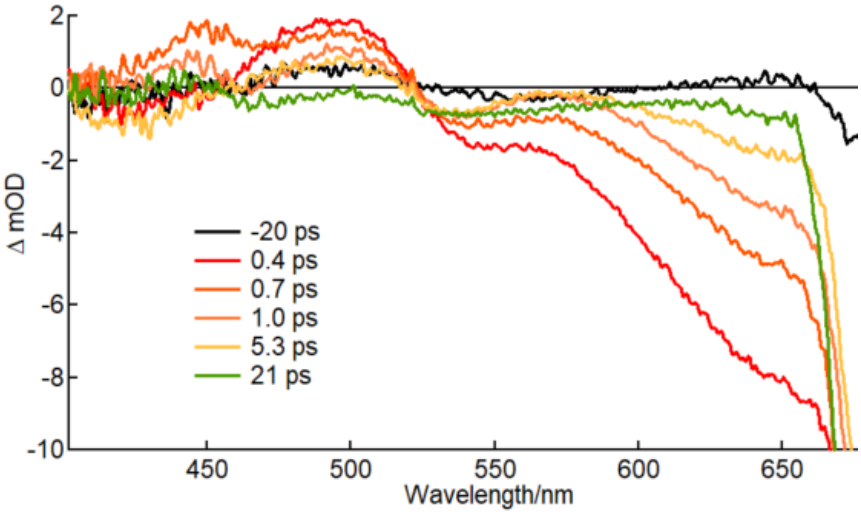
(C) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$



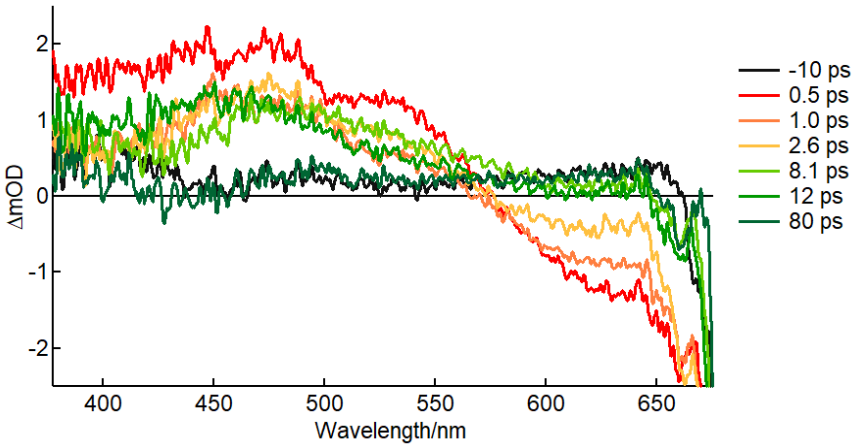
(D) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$



(E) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$



(F) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(CH_3OH)]^+$



Fonte: Autora.

Como discutido anteriormente, os espectros eletrônicos destes complexos oxidados apresentam uma banda de absorção na região de 700 nm atribuída à transição de transferência de carga intracluster (IC), bandas na região do UV (300 nm a 380 nm) referentes à transição de transferência de carga cluster ligante (TCCL) e também bandas de mais alta energia referentes às transições internas dos ligantes (π - π^*), as quais apresentam valores de ε maiores do que os valores observados para as TCCL.

No caso dos espectros de absorção dos transientes, após a excitação em 700 nm, foi possível observar basicamente o mesmo perfil espectral para os complexos **(1-5)** e para o precursor, o que sugere que a espécie formada no estado excitado não é influenciada pela presença dos ligantes bidentados.

Nos espectros, Figura 64, pode-se observar a geração de transientes com bandas de absorção na região de 400 nm a 600 nm. Além do mais, é possível observar um perfil de decaimento (descoramento) na região de 600 nm para todos os complexos.

Os complexos foram excitados em 700 nm, o qual corresponde ao máximo das transições IC, sendo que esta transição relaciona-se diretamente com a carga formal dos complexos. No caso de complexos reduzidos, com carga formal zero o máximo da transição IC aparece deslocado para a região de 900 nm.

Alguns estudos a respeito das propriedades fotofísicas dos carboxilatos trinucleares de rutênio foram conduzidos pelos grupos dos pesquisadores Mitsunari, I e Kubiak, P. C (ITOU, M et al.,2005). As principais contribuições destes trabalhos estão relacionadas com os estudos das reações de transferência de elétrons fotoinduzidas nos

sistemas clusters e porfirinas. Nas últimas décadas também foram exploradas as propriedades fotofísicas dos dímeros dos carboxilatos trinucleares de rutênio coordenados a porfirina (PETERSSON, J et al.,2015).

Considerando os aspectos fotofísicos dos carboxilatos com estados de oxidação +1, ((Ru(III), Ru(III), Ru(III)), em 2005 Mitsunari, I e colaboradores exploraram os processos de transferência de elétrons fotoinduzidas que ocorrem após a excitação da porfirina ZnTPP na presença do carboxilato simétrico ($[Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]^+$). Nos espectros de transiente obtidos após a excitação da ZnTPP, (λ_{exc} = 532 nm), aparecem bandas de absorção em 470 nm e 840 nm, as quais foram atribuídas a espécie ^{3}ZnTPP*. Com o decaimento desta espécie, ^{3}ZnTPP*, novas bandas de absorção aparecem em 900 nm e 650 nm, as quais foram atribuídas a formação do complexo reduzido ($[Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]^0$) e formação da espécie $ZnTPP^{*+}$, respectivamente (ITOU, M et al.,2005).

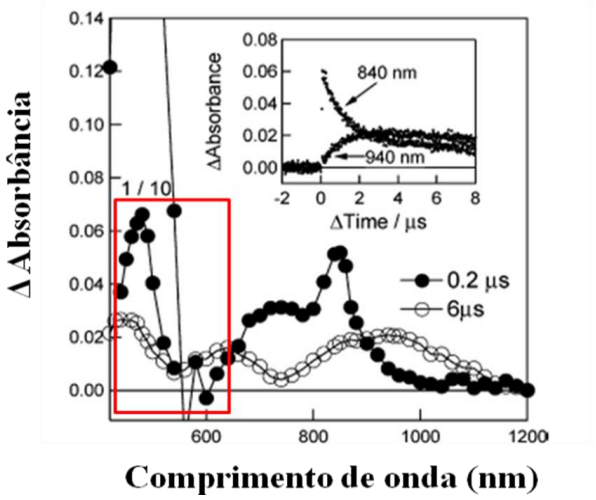
Neste sentido, os resultados indicaram claramente que a transferência de elétrons fotoinduzida ocorre através do seguinte mecanismo:

$$^3ZnTPP^* + [Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]^+ \rightarrow ZnTPP^{*+} + [Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]^0$$

É importante destacar que os autores também tentaram comprovar os espectros de absorção do transiente do complexo oxidado $[Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]^+$, contudo não foi possível registrar o espectro deste complexo no laser em escalas de nanosegundos (ITOU, M et al.,2005). Este resultado confirma que os complexos deste tipo apresentam um tempo de decaimento rápido no estado excitado.

Outro aspecto importante é o fato de que os espectros de absorção dos transientes obtidos pelos autores foram registrados na faixa de 400 nm a 1200 nm, onde foi possível observar a formação de uma nova banda em 900 nm atribuída ao complexo reduzido, Figura 64.

Figura 64: Espectros de absorção dos transientes obtidos por fotólise a laser de 532 nm de ZnTPP (0,05 mM) na presença de $[Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(cpy)_3]PF_6$ (0,1 mM) em AN saturado com AR: (■) 0,2µs e (O) 6µs. Gráfico Interno: Perfis de tempo de absorção em 840 e 940 nm.



Fonte: Adaptado de ITOU, M et al.,2005).

Contudo, no equipamento utilizado para a realização dos experimentos para os complexos **(1-5)** não foi possível registrar os espectros de transiente na faixa de comprimentos de ondas maiores que 700 nm. Além do mais não foi possível excitar o complexo nas transições de alta energia que envolve os ligantes bidentados (λ = 400 nm). Com estas limitações dos experimentos, torna-se inviável uma comparação direta dos resultados obtidos neste trabalho, com os resultados apresentados na literatura (PETERSSON, J et al.,2015; ITOU, M et al.,2005).

Ao comparar o espectro de transiente da Figura 64 com os espectros obtidos para os complexos **(1-5)**, Figura 63, nota-se uma similaridade dos espectros na região de 400 nm a 700 nm, com a formação de uma nova banda em regiões de alta energia do espectro e o decaimento da IC a partir de 600 nm. Contudo, em nossos experimentos não temos evidências ou não da formação de novas bandas em comprimentos de ondas maiores.

Com relação aos resultados obtidos para os complexos **(1-5)** e o precursor **(4)** os espectros de transiente, Figura 63, indicam que as propriedades do estado excitado dos complexos não são influenciadas pela presença dos ligantes bidentados, pois o perfil espectral obtido para o precursor **(4)** é muito similar. Este efeito pode estar relacionado com o comprimento de onda de excitação, uma vez que os complexos e o precursor apresentam 1 elétron desemparelhado (estado fundamental dubleto) e, ao excitar em 700

nm os níveis eletrônicos desta transição envolvem preferencialmente os orbitais da unidade $[Ru_3O]^+$ e os grupos acetato.

Com relação às propriedades dos ligantes bidentados, a investigação das propriedades fotofisicas dos complexos de rutênio com os ligantes dppn e dppz tem sido amplamente exploradas. Para os complexos ($[Ru(bpy)_2(dppn)]^{2+}$ (bpy = 2,2-bipiridina, dppn = benzo[i]-dipirido[3,2-a:*2′,3′*-c]fenazina)), estudos espectroscópicos detalhados sugerem a formação de um estado excitado triplete $^3\pi$-π^* centrado nos ligantes bidentados (intra-dppn ou intra-dppz). A formação deste estado triplete é acompanhada pelo surgimento de uma nova banda na região de 400 nm a 600 nm (SUN, Y et al.,2010; FOXON, S.P et al.,2009).

No caso dos espectros apresentados na Figura 63, também se observa a formação de uma nova banda nesta região de 400 nm a 600 nm, a qual também pode estar relacionada com a formação de estado excitado triplete que envolve os ligantes piridínicos coordenados nos complexos **(1-5)** e precursor **(4)**. Com relação a piridina, estudos fotofísicos sugerem que a formação de bandas na região de 400 nm está relacionada com a formação do piridil, uma espécie radicalar da piridina (ENOMOTO, K et al.,2006).

Considerando as cinéticas de decaimento, a excitação dos complexos em 700 nm populam o estado excitado, o qual apresenta um decaimento biexponencial, com o tempo de vida mais curto em torno de 1,0 ps e a componente mais longa com variação de 10 ps a 16 ps, o que sugere a formação de duas espécies diferentes no estado excitado. Os tempos de vida de decaimento do estado excitado foram obtidos a partir do "*bleaching*" da banda IC, ou seja, na região de descoramento observada nos espectros (λ = 600 nm), Figura 63. Os valores de tempo de decaimento estão apresentados na Tabela 10 e as curvas de decaimento encontram-se no **ANEXO XII**.

Com os valores apresentados na Tabela 10, nota-se que os valores dos tempos de vida não apresentam uma variação significativa entre os complexos, no entanto estes valores são ainda menores para o complexo **(4)**. É importante destacar que o tempo de vida curto observado para estes complexos é similar com o observado para os dímeros de valência mista $[Ru_3O]$-pirazina reportados na literatura (PETERSSON, J et al.,2015).

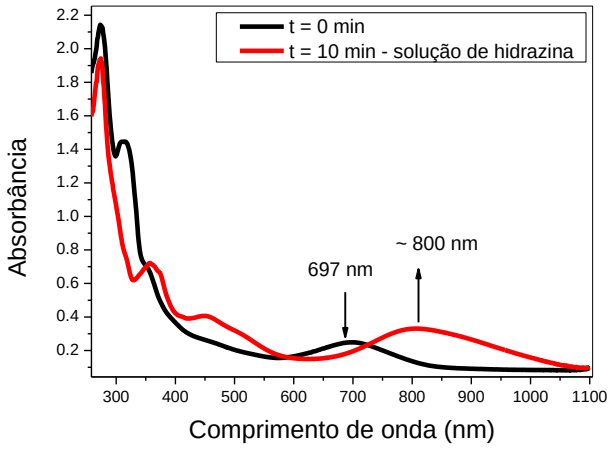
Tabela 10: Tempos de vida do estado excitado dos complexos obtidos a partir da curva de decaimento biexponencial

Complexos	Tempo de vida (t_1)	Tempo de vida (t_2)
(**1**) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$	t_1= 0.39 ± 0.06 ps	t_2= 12.4 ± 3.7 ps
(**2**) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$	t_1= 0.42 ± 0.05 ps	t_2= 16.5 ± 7.7 ps
(**3**) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$	t_1= 0.43 ± 0.03 ps	t_2= 14.2 ± 2.0 ps
(**4**) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$	t_1= 0.28 ± 0.03 ps	t_2= 9.9 ± 1.0 ps
(**5**) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$	t_1= 0.35 ± 0.03 ps	t_2= 12.9 ± 3.8 ps

Considerando que os espectros de absorção dos transientes dos complexos oxidados, bem como os valores de tempo de vida foram similares também se investigou o espectro de transiente de um complexo na forma reduzida.

O espectro de absorção do transiente foi registrado para o complexo **(2)** após a redução deste com solução de hidrazina. Como pode ser observado no espectro eletrônico, Figura 65, o complexo reduzido apresenta a transição IC com máximo na região de 800 nm. O deslocamento batocrômico da IC de 700 nm para 800 nm é observado, pois ao ganhar 1 elétron ocorre a desestabilização dos níveis dπ do metal e então ocorre a formação desta banda de menor energia em 800 nm. O complexo reduzido apresenta carga formal 0 e estados de oxidação dos íons rutênio como: Ru(III), Ru(III), Ru(II), (TOMA, H.E et al.,2001).

Figura 65: Espectro eletrônico do complexo (2) ($[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^n$), oxidado e após a redução com solução de hidrazina, em DCM



Fonte: Autora.

Os espectros de absorção dos transientes do complexo **(2)** oxidado e reduzido estão apresentados na Figura 66.

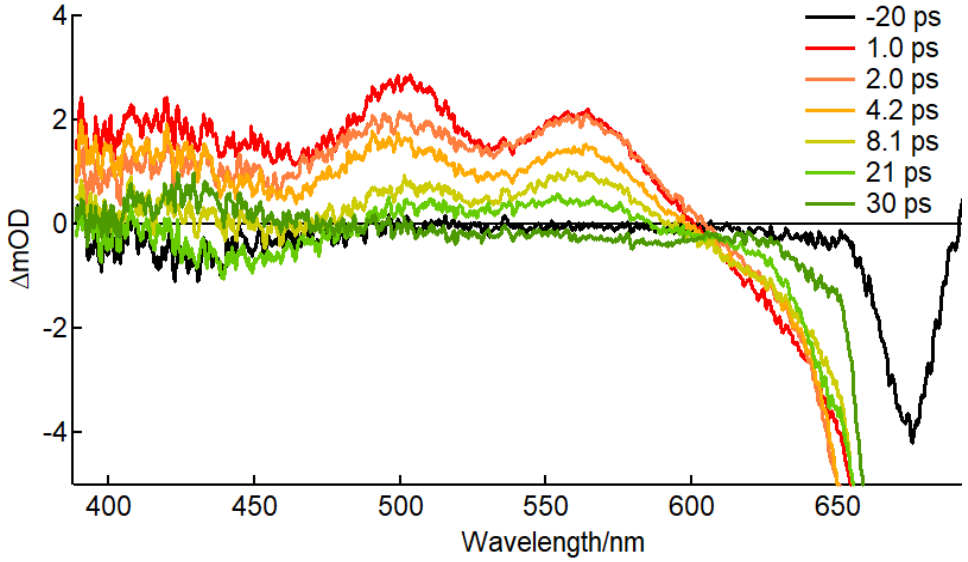
No perfil espectral do transiente registrado para o complexo reduzido nota-se algumas diferenças com relação ao perfil obtido para o complexo oxidado. Como observado na Figura 66 B o espectro de transiente do complexo reduzido apresenta uma nova banda muito intensa na região de 400 nm a 600 nm, e um descoramento pouco significativo da IC em 700 nm. Além do mais foram obtidos decaimentos monoexponencial, referentes ao monitoramente das bandas em 680 nm e 550 nm, com tempos de vida de t_1= 9.0 ± 2.8 ps e t_1 = 5.3 ± 0.3 ps respectivamente. No caso do complexo oxidado, Figura 66 A, registrou-se perfil de decaimento biexponencial ao monitorar os tempos de vida nos comprimentos de onda máximos de 630 nm e 550 nm, (λ_{630nm} = t_1= 0.42 ± 0.05 ps e t_2= 16.5 ± 7.7 ps; λ_{550nm} = t_1= 2.20 ± 0.35 ps e t_2= 11.0 ± 2.1 ps.

Os complexos reduzidos apresentam carga formal 0, (Ru(III)Ru(III)Ru(II)) e estado fundamental singleto, com tempo de decaimento muito curto e similares aos dímeros investigados por Kubiak, C e colaboradores (PETERSSON, J et al.,2015).

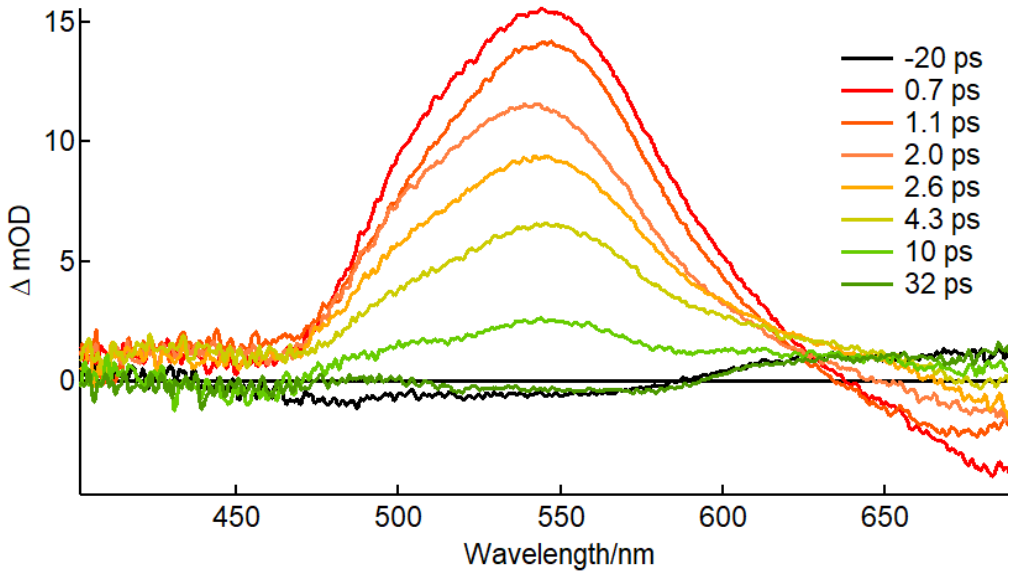
Os dímeros de valência mista estudados por Kubiak, C e colaboradores também apresentam carga formal 0 e o espectro do transiente do dímero ($[Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3CO_2)_6(CO)(L)]_2(\mu\text{-}pz)$,L = dmap) também apresentou a formação de uma nova banda na região de 400 nm a 600 nm e perfil de decaimento na região de 600 nm. Os processos de decaimento foram atribuídos as espécies: ^{1}TCML→^{3}TCML→GS.

Figura 66: Espectros de absorção dos transientes (femtosegundos) para o complexo (2) oxidado ((A) λ_{exc} = 700 nm, 4 µJ) e reduzido ((B) λ_{exc} = 800 nm, 4 µJ) em DCM

(A) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$



(B) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^0$



Fonte: Autora.

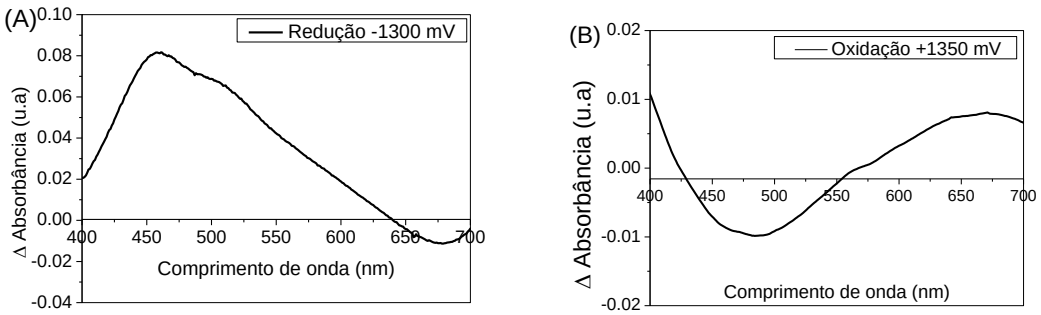
3.2 Investigação da natureza da espécie formada no estado excitado por meio da espectroeletroquímica

Como discutido anteriormente, por meio da espectroeletroquímica foi possível acompanhar as mudanças espectrais em função da variação do potencial e desta forma identificar o perfil espectral dos complexos oxidados e reduzidos.

Desta forma, estudos preliminares para compreensão da natureza dos estados excitados dos complexos oxidados foram realizados utilizando as medidas de espectroeletroquímica. Em cada caso, os potenciais foram aplicados para oxidar e reduzir os clusters com base nos perfis dos voltamogramas obtidos previamente.

A partir do perfil espectral dos complexos após aplicação de potenciais positivos e negativos, calculou-se a variação de absorbância em função dos espectros inicial e final. Como exemplo, na Figura 67A e 67B apresentam-se os gráficos obtidos para o complexo (1) após a redução e oxidação eletroquímica.

Figura 67: Espectros de variação da absorção obtidos após a redução e oxidação eletroquímica do complexo (1), em DCM (0,1 M NBu_4PF_6)



Fonte: Autora.

Após aplicar o potencial para reduzir o complexo **(1)**, o gráfico obtido, Figura 67A, mostra uma similaridade com o espectro de absorção obtido para o transiente do complexo **(1)**, ou seja, a absorção na faixa de 400-650 nm é consistente com a superposição dos espectros das espécies obtidas após a redução eletroquímica. Por outro lado, o gráfico que apresenta o perfil do complexo oxidado não é semelhante com o espectro de absorção do transiente obtidos para este complexo, Figura 67B.

Desta forma, os resultados preliminares obtidos por meio da técnica de eletroquímica, sugerem a formação de espécies reduzidas dos complexos no estado

excitado. A formação de espécies reduzidas no estado excitado foi identificada anteriormente nos estudos fotofísicos das propriedades dos clusters oxidados na presença de porfirinas (ITOU, M et al.,2005).

4. Considerações Parciais

Utilizando-se a técnica de flash-fotólise foi possível registrar os espectros de absorção dos transientes dos complexos **(1-5)** oxidados e precursor **(4)**. Foi possível observar o mesmo perfil espectral para os complexos e precursor, após a excitação em 700 nm. Em todos os casos foi observada a formação de novas bandas na região de 400 nm a 600 nm e o descoramento na região de 700 nm. As similaridades nos perfis espectrais sugerem que os ligantes bidentados coordenados aos complexos **(1-5)** não influenciam as propriedades dos estados excitados dos complexos.

As curvas de decaimento confirmaram que o processo é biexponencial com tempos de vida extremamente curtos, que variam de τ_1 = 1,0 ps a τ_2 = 16 ps. Contudo os valores de tempo de vida não variam significativamente entre os diferentes complexos.

O espectro de absorção do transiente do complexo reduzido apresentou curvas de decaimento monoexponencial, com tempo de vida similar aos reportados para os dímeros de valência mista estudados por Kubiak, C e colaboradores.

Uma investigação preliminar com base nos resultados de espectroeletroquímica mostrou uma similaridade entre o perfil espectral das espécies transientes com as espécies reduzidas eletroquímicamente. Estas evidências indicam que as espécies formadas no estado excitado, são espécies reduzidas e não são influenciadas pela coordenação dos ligantes bidentados, pois o mesmo perfil espectral foi observado para o complexo precursor **(4)**.

Neste sentido, estudos futuros podem ser realizados para uma investigação detalhada das espécies formadas no estado excitado, todavia com base nos estudos apresentados na literatura pode-se sugerir que as novas bandas formadas nos espectros de transiente dos complexos, na região de 400 nm a 600 nm, estão relacionadas com a formação dos estados tripletes dos ligantes piridínicos.

Capítulo 4:

ESTUDOS DE CUNHO BIOLÓGICO E INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS ALVO (DNA E HSA)

1. INTRODUÇÃO

A modelagem molecular (*design*) de novos complexos metálicos para fins terapêuticos envolve o delineamento de algumas etapas que possibilitam a absorção da droga pelo organismo, hidrólise do composto, ligação em sítio proteico, transporte pela membrana celular e interação com alvo molecular (MJOS, K.D et al.,2014). No que diz respeito aos ensaios *in vitro*, os estudos de citotoxicidade e interação dos compostos com alvos biológicos, como exemplo o DNA e HSA, vem sendo amplamente explorados (JODRELL, D.I et al.,2004; NDAGI, U et al.,2017).

Considerando o desenvolvimento de compostos para o tratamento do câncer, os complexos metálicos têm apresentado resultados promissores quando comparados a muitos compostos orgânicos (NDAGI, U et al.,2017). Neste sentido destacam-se algumas propriedades dos metalofármacos, como exemplo a facilidade de promover modificações estruturais por meio da alteração do centro metálico e/ou dos ligantes, variação do estado de oxidação, bem como o arranjo estrutural que possibilita a obtenção de uma variedade de compostos (ALLARDYCE, C.S et al.,2001; ALESSIO, E et al.,2017). Além do mais, as propriedades eletrônicas e eletroquímicas destes compostos possibilitam a modulação de parâmetros importantes como a polaridade e a reatividade. Desta forma pode-se obter fármacos que apresentam maior seletividade ao alvo biológico, menor toxicidade e maior eficácia terapêutica (BARRA, C.V; NETTO, AV.,2015).

Neste sentido, no presente trabalho os estudos de citotoxicidade dos complexos (**1-5**) foram realizados com a linhagem celular de melanoma murino (B16F10), sendo este modelo celular muito empregado em investigações prévias de novos compostos. Este modelo está relacionado com o câncer de pele que no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se cerca de 600 mil novos casos para o biênio de 2018-2019 (NDAGI, U et al.,2017, INCA.,2019).

Além disso, estudos de interação com alvos biológicos fornecem informações importantes a respeito da reatividade e mecanismo de ação dos compostos no organismo, sendo que para estas investigações destacam-se os alvos biológicos: DNA e a HSA (LIU, H.K et al.,2011).

Nesta etapa do trabalho apresentam-se os resultados preliminares relacionados à investigação das propriedades biológicas da nova classe de compostos sintetizados.

2. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedências dos solventes e reagentes

Abaixo se apresenta a lista de reagentes utilizados nos ensaios de citotoxicidade e de interação com biomoléculas, DNA e HSA.

Reagentes	Procedências
Agarose, para biologia molecular	Fisher Bioreagents
Albumina de soro humano (HSA), 98%	Sigma-Aldrich
Brometo de etídio, EtBr (biologia molecular)	Sigma-Aldrich
DNA timo de bezerro	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth
Kit para purificação do plasmídio puC19	Concert Miniprep System Life Technology
Tripsina	Sigma-Aldrich
Tampão Tris, 98%	Sigma-Aldrich
MTT formazan	Sigma-Aldrich
Meio de cultura DMEM 41965	GIBICO LifeTechnologies
Meio de cultura RPMI 1640	GIBICO LifeTechnologies
Plasmídio puC19	Bayou Biolabs
Solução Tripsina-EDTA	Sigma-Aldrich
Soro fetal bovino (SFB-Gibco)	ThermoFisher

2.2 Métodos e equipamentos utilizados

2.21 Avaliação da citotoxicidade das células tumorais (B16F10) e não tumorais (L929) na presença dos complexos (1-5)

Os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos pela Dr Loyanne Carla Barbosa Ramos no laboratório do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Os ensaios para avaliar a viabilidade celular das células de melanoma murino, B16F10 e fibroblastos (L929), as quais apresentam crescimento aderente, foram realizados pelo método colorimétrico do MTT (MOSMANN, T.,1983). As células foram tratadas com os complexos (**1-5**) e ligantes livres em diferentes concentrações. Preparou-se soluções estoques dos complexos e ligantes em DMSO ($1x10^{-3}$ M) e diluiu-se para as concentrações de 2 μM a 100 μM, sendo o limite máximo de 2% de DMSO

utilizado no meio celular .O cultivo celular foi realizado em garrafas de cultivo e, após 80% de confluência foram tripsinizadas e contadas na câmara de Neubauer. Em seguida as células foram adicionadas em placas de ELISA com 96 poços na concentração de $1x10^5$ células/mL ($2x10^4$ células/poço). As células foram incubadas por 24 horas e em seguida tratadas com diferentes concentrações dos compostos. Nesta etapa, após o tempo de incubação de 24 horas adicionou-se solução de MTT (0,5 mg/mL) e após 3 horas retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL de DMSO em cada poço para solubilizar o sal de formazan precipitado. A análise das células víaveis foi realizada de maneira indireta através da leitura de absorbância das soluções contidas nos poços utilizando-se o leitor de Elisa, $\lambda_{máx}$ = 530 nm, (Thermo Plate TP-READER). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da razão entre as absorbâncias obtidas e a do controle e o tratamento estatistico dos dados foram realizados no software GraphPad Prism 5®.

2.22 Ensaios de clivagem do DNA

Os ensaios de clivagem foram realizados com DNA plasmídico (pUC19), concentração de 100 μmol L^{-1}, em solução tampão (Tris/NaCl 5,0 mM/50,0 mM) na presença de diferentes concentrações dos complexos (10 μM, 20 μM, 50 μM). No caso do complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, utilizado como controle, preparou-se uma solução na concentração de 20 μM. As amostras foram incubadas por 2 horas, a 37 °C, em tampão Tris/NaCl 5,0 mM/50,0 mM, com 2 % DMSO, sendo o volume final da solução de 20,0 μL. Para o experimento com irradiação utilizou-se lâmpada de Xe 150 W. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,750 % (p/v), corado com 0,150 % (v/v) de GelRed, em solução tampão TAE (40,0 Mm Tris-acetato, 1,00 mM EDTA, pH~7,2) a 70 volts, no tempo total de 90 minutos. As imagens dos géis obtidos foram realizadas no equipamento Molecular Imager® GelDocTM XR, sistema com Image LabTM *software* (BioRad, Berkley, California) e GelDoc *software.*

2.23 Interação com DNA - Titulação espectrofotométrica na região UV-Visível

A titulação espectrofotométrica dos complexos foi realizada com DNA de timo de bezerro.

Primeiramente o DNA *calf thymus* (DNA base pairs ε_{260nm} = 13,100 L mol^{-1} cm^{-1}) foi purificado e nesta etapa uma pequena fração do DNA foi solubilizada em aproximadamente 3 mL de solução tampão recém preparada (5,00 mM Tris, 50,0 mM NaCl/HCl pH=7,5). A solução preparada (3 mL) foi adicionada em um saco de diálise , o qual foi colocado em um recipiente contendo 2 L da mesma solução tampão. O sistema foi mantido em agitação por 48 horas. Para analisar a pureza do DNA registrou-se o espectro de absorção de uma alíquota da solução de DNA e calculou-se a razão da absorbância em 260 nm e 280 nm. O valor obtido foi de 1,78, o qual segundo a literatura confirma a pureza do DNA.

A titulação espectrofotométrica dos complexos, [20 μM], com o DNA foi realizada em diferentes temperaturas (25ºC, 31ºC e 37ºC), com adições sucessivas de DNA (0 μM a 41 μM).

As constantes de ligação (K) foram calculadas utilizando-se o modelo matemático linear (Benesi-Hildebrand) com o auxilio dos programas Origin Pro8®.

2.24 Interação com DNA - Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas utilizando-se 200 mM de DNA de timo de bezerro em um viscosímetro Cannon-Manning Micro imerso em banho-maria, com uma unidade de controle de temperatura circulante Neslab RTE-100 (Temperatura da água, T = 28ºC). A viscosidade foi medida na presença na solução de *ct*-DNA em diferentes concentrações complexas 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 (10^{-5}) M. As soluções estoque dos complexos foram preparadas em DMSO e 2% destas soluções foram adicionados a 600 μL de uma solução tampão (5,00 mM Tris, 50,0 mM NaCl/HCl pH=7,5), sendo 600 μL o volume total no viscosímetro. O tempo de fluxo foi registrado usando um cronômetro digital. Para cada complexo, os experimentos foram realizados em triplicatas. As viscosidades relativas do DNA na presença e ausência de complexos foram calculadas usando métodos padrão e os dados foram analisados no programa OriginPro®8.0.

2.25 Interação dos complexos (1-5) com albumina do soro humano (HSA)

O tipo de interação dos complexos com a HSA foi estudado por espectroscopia eletrônica de fluorescência. Inicialmente, preparou-se uma solução de HSA ($1x10^{-6}$ M) em solução tampão Trizma® pH = 7,4 e as soluções estoques dos complexos ($1x10^{-3}$ M)

em acetonitrila. As interações dos complexos **(1-5)** com a HSA foram realizadas separadamente. Para cada experimento, foram adicionadas alíquotas do complexo (10^{-6} M a 10^{-5} M) em 3 mL da solução da albumina presente em uma cubeta de quartzo (EFTINK, M.R et al.,1991). A cada adição do complexo a cubeta foi mantida na temperatura de estudo por 2 minutos (período de incubação), sendo que o tempo total do experimento foi de 80 minutos. Monitorou-se a fluorescência da HSA por registros dos espectros de emissão de fluorescência, no comprimento de onda de excitação de 280 nm, os quais excitam principalmente os sítios de triptofano e tirosina, sendo que os espectros foram monitorados em três temperaturas diferentes (25ºC, 31ºC e 37ºC). Utilizou-se largura das fendas de excitação e emissão de 5 nm. Nos cálculos dos parâmetros envolvidos nas interações, utilizou-se o modelo matemático de Stern-Volmer, o qual será discutido no item 3.15.

Para todos os complexos antes de aplicar o modelo de Stern-Volmer as intensidades de fluorescência foram corrigidas para eliminar o efeito de filtro interno da HSA e complexos usando a Equação 7:

$$\mathbf{F_{corr} = F_{obs} x 10^{(Aemissão + Aexcitação)/2}} \qquad \text{Equação 7}$$

Onde: onde F_{corr} e F_{obs} são os valores de intensidade de fluorescência corrigidos e observados, respectivamente. A_{ex} e A_{em} são os valores da absorbância dos complexos nos comprimentos de onda de excitação e de emissão, respectivamente.

2.26 Medidas do Tempo de vida da HSA na presença dos complexos (1-5)

As medidas de tempo de vida da albumina no estado excitado foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito com o auxílio do técnico Adriano Batista da Costa.

Foi utilizado o equipamento Laser Tsunami mode-locked Ti:Sapphire, o qual apresenta os seguintes arranjos: laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics), bombeado por um laser de diodo (Millenia Xs - Spectra Physics), espectrômetro FL900 (Edinburgh) e fotomultiplicadora de placas de micro-canais (Hamamatsu).

Para as medidas utilizou-se uma cubeta de quartzo, (1 cm),contendo solução de HSA ($1{,}0x10^{-6}$ M) preparada em solução tampão Tris pH = 7,2 e os registros dos tempos de vida da HSA foram realizados após adições sucessivas das soluções dos

complexos **(1-5)**. Os experimentos foram realizados em diferentes temperaturas (25ºC, 31ºC e 37ºC) com comprimento de onda de excitação de 295 nm.

2.27 Interação dos complexos (1-5) com albumina do soro humano (HSA): Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados no equipamento JASCO-J-815 disponível do Department of Chemistry and Biochemistry at The Ohio State University. Os espectros da HSA pura e na presença de diferentes concentrações dos complexos foram registrados na faixa de 200-260 nm, T = 25ºC, em cubetas de 1 mm de caminho óptico. A solução da HSA foi preparada em solução tampão Tris 50 mM, pH = 7,2. As soluções dos complexos foram preparadas em diferentes concentrações (1,0 μM; 1,6 μM; 2,8 μM), as quais foram adicionadas nas soluções da HSA (1,0 μM) preparadas em solução Tris 50 mM, pH = 7,2. Devido à baixa solubilidade dos complexos utilizou-se 2% de DMSO no preparo de cada solução. Durante as medidas acumulou-se 4 varreduras, à 50 nm/min com uma fenda de 1 nm de largura e 1 segundo de resposta. Os espectros foram corrigidos para eliminar efeitos do tampão e convertidos para MRE (elipsidade média do resíduo) em $deg.cm^2.dmol^{-1}$.

2.3 Equipamentos

2.31 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os espectros eletrônicos dos complexos (**1-5**) na presemça de *ct*-DNA durante os ensaios com a HSA foram monitorados utilizando-se o equipamento Hitachi U-3501.

2.32 Espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência da HSA foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC, utilizando-se cubetas de quartzo com os quatro lados polidos e caminho óptico de 1,00 cm.

2.33 Medidas de tempo de vida

As medidas do tempo de vida da HSA na presença dos complexos **(1-5)** foram monitoradas no sistema para excitação o qual consiste na utilização de um conjunto de lasers: um laser de diodo (com dois feixes emitindo em 809 nm e potência de 24 W),

um laser de estado sólido com emissão de 1064 nm (Nd:YVO4 - MilleniaXs - SpectraPhysics), um laser de titânio-safira (Tsunami - SpectraPhysics). O cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. O comprimento de onda é selecionado por um filtro birefringente para o feixe de saída, o qual passa por um sistema selecionador de frequências. A frequência dos pulsos ede laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, e permite a operação na faixa de frequências entre 0,01 e 8 MHz.

2.34 Dicroísmo circular (CD)

Os espectros de CD de HSA na presença de complexos foram medidos no espectropolarímetro de CD Chirascan à temperatura ambiente usando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. Os espectros de HSA ($1{,}5\times10^{-6}$ M) na presença e ausência dos complexos foram registrados na faixa de 195-260 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudos biológicos *in vitro*

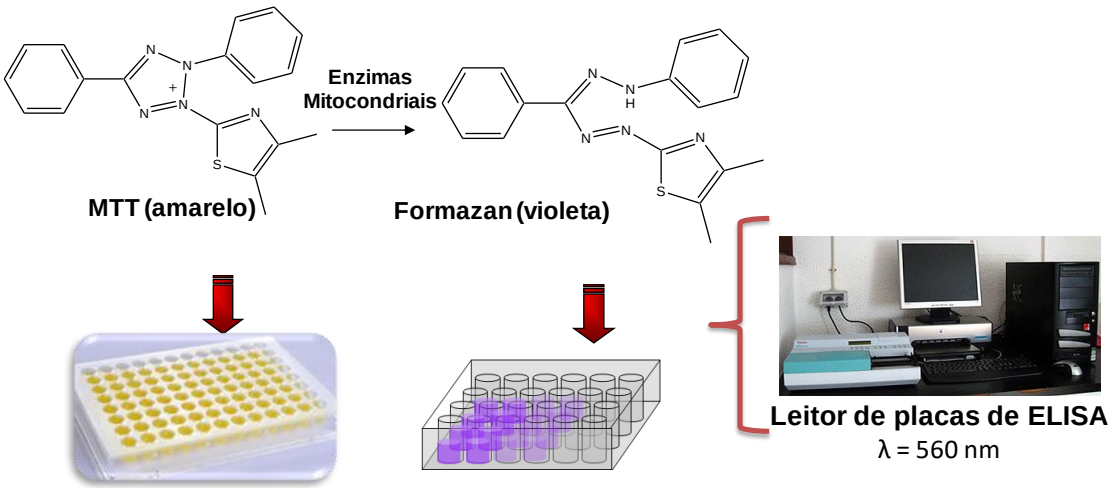
3.1.1 Avaliação do efeito citotóxico dos complexos (1-5) e ligantes livres em modelos celular pelo ensaio de MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em colaboração com a Dr Loyanne Carla Barbosa Ramos no laboratório do Prof. Dr Roberto Santana da Silva (Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP- SP).

O efeito citotóxico dos complexos (**1-5**) e dos ligantes livres foi investigado por meio da análise da viabilidade celular expressa através do ensaio colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)], (BERRIDGE, M.V et al.,1993; MOSMANN, T.,1983). Nesta metodologia, a detecção das células viáveis ocorre por meio da avaliação da atividade enzimática celular. As células viavéis apresentam enzimas mitocôndriais ativas que induzem a reação de conversão do sal de tetrazólio MTT (coloração amarela) à formazan, um produto de coloração violeta, o qual pode ser detectado através de medidas de absorbância, (MOSMANN, T.,1983), Figura 68.

No caso das células mortas, estas apresentam a função mitocondrial comprometida e não promovem a conversão do MTT à formazan, (MOSMANN, T.,1983).

Figura 68: Representação da reação de conversão do MTT (coloração amarela a formazan (colaração violeta λ_{max} = 500 nm)



Fonte: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/.

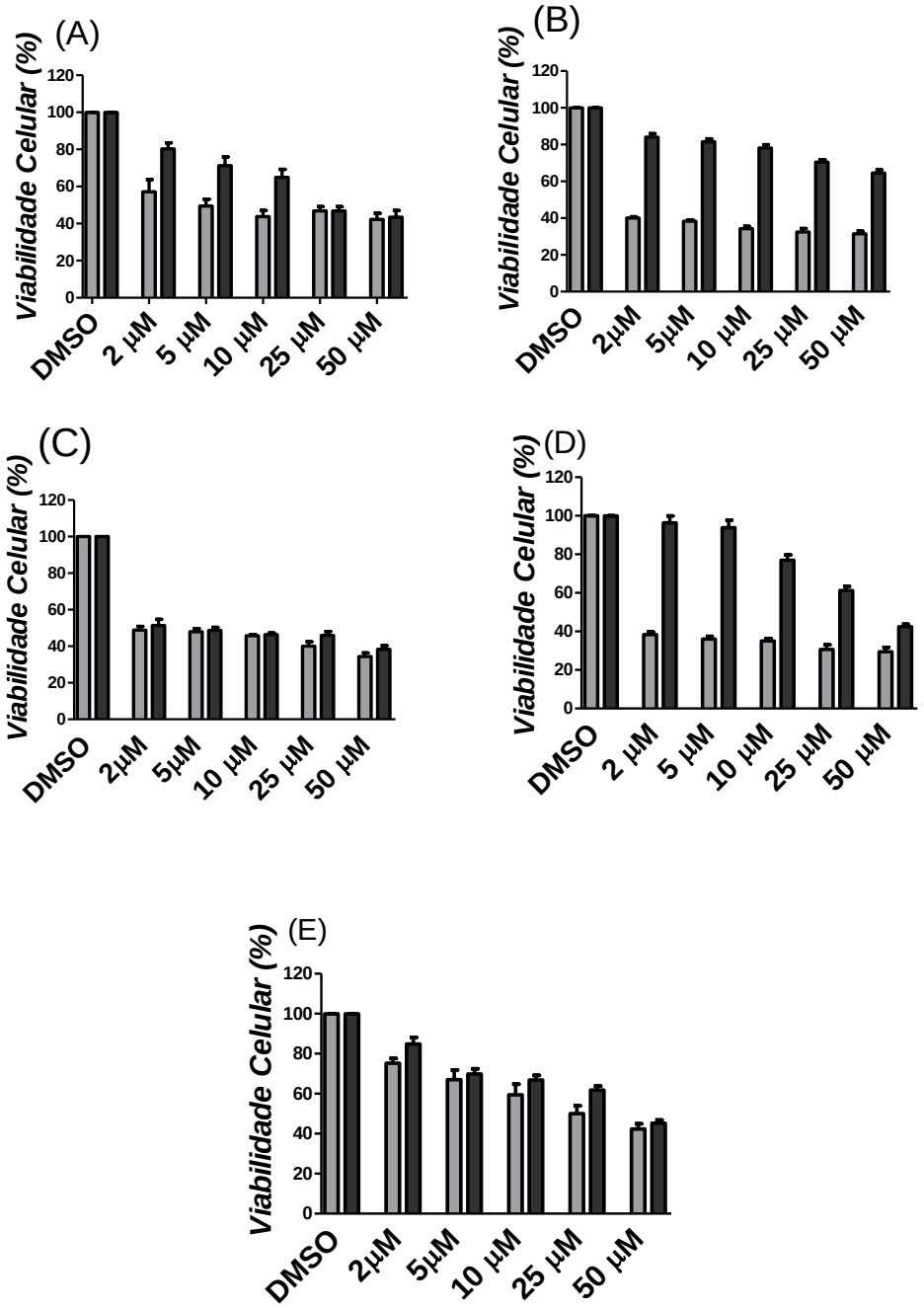
Desta forma, utilizando-se o método do MTT o potencial citotóxico dos complexos (**1-5**) e ligantes livres foi avaliado em linhagens de célula tumoral (B16F10) e não tumoral (L929). A linhagem B16F10 corresponde a células de melanoma murino, as quais são derivadas dos melanócitos, células pigmentadas encontradas predominantemente na pele, (WOSKO, T.J et al.,1984). No caso da linhagem não-neoplásica (L929) são originadas de células de fibroblastos de camundongos, as quais são constituintes do tecido conjuntivo (WOSKO, T. J et al.,1984).

Como descrito no item (2.21) as células foram cultivadas e incubadas com os complexos e ligantes livres em diferentes concentrações, durante 24 horas e posteriormente foi avaliada a viabilidade celular pelo uso do MTT. Uma vez que o meio de cultivo celular apresenta a mistura de diferentes sais e substâncias, para todos os experimentos foram realizados controles para avaliar a estabilidade dos complexos no meio celular **(ANEXO XIII).** Além disso, os experimentos de viabilidade celular foram realizados em triplicatas.

Para avaliar o efeito da coordenação dos ligantes bidentados nos carboxilatos trinucleares de rutênio, a citotoxicidade celular (nas linhagens B16F10 e L929) também foi investigada para os ligantes livres. Os resultados obtidos para os diferentes

complexos (**1-5**) e ligantes livres avaliados nas células B16F10 em diferentes concentrações estão apresentados na Figura 69.

Figura 69: Efeito citotóxico, em células B16F10, para os complexos (▒) (1-5; A-E) e os ligantes bidentados livres (■) (dppn (A), dppz (B), dppzCH$_3$ (C), dppzCl (D), phen (E)), em diferentes concentrações, após 24 horas de incubação. Os dados apresentados estão relacionados com as médias ± S.E.M. de 3 experimentos realizados de forma independente. Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos controles, considerando p <0,05 de acordo com os testes ANOVA e Newman-Keuls



Fonte: Autora.

Na Tabela 11 apresentam-se os valores das porcentagens da redução de viabilidade celular expressa pelos complexos e ligantes livres em função da concentração.

Tabela 11: Porcentagens da redução da viabilidade celular expressa pelos complexos e ligantes em função da concentração

Concentração	[2 μM]	[5 μM]	[10 μM]	[25 μM]	[50μM]
Complexo (1)	43%	51%	57%	54%	58%
Lig livre (dppn)	20%	29%	36%	54%	57%
Complexo (2)	60%	62%	66%	68%	69%
Lig* livre (dppz)	16%	19%	22%	30%	36%
Complexo (3)	52%	53%	55%	60%	66%
Lig* livre (dppzCH_3)	49%	52%	54%	55%	62%
Complexo (4)	62%	64%	65%	70%	71%
Lig* livre (dppzCl)	4%	7%	24%	39%	58%
Complexo (5)	25%	33%	41%	50%	58%
Lig* livre (phen)	16%	31%	34%	39%	55%

Lig* = ligante livre

De acordo com os resultados obtidos foi possível confirmar que na menor concentração (2 μM) os clusters (**1-5**) foram mais citotóxicos para as células tumorais do que os ligantes livres, o que indica neste caso a relevância do processo de coordenação dos ligantes orgânicos no núcleo metálico (GANOT, N et al.,2013; BERTRAND, B et al.,2017; TETTEH, S et al.,2014). Exceto para o caso do complexo com o ligante dppzCH_3 para o qual ,em todas as concentrações estudadas, o efeito do ligante livre foi comparável ao do complexo. Conforme discutido abaixo, isso se dá em função da presença do grupo metila.

De maneira geral, o efeito citotóxico dos clusters contra as células de melanoma não apresenta uma resposta direta da citotoxidade com relação ao aumento da concentração, pois os resultados indicam que em concentrações menores (2 μM), os

clusters reduzem significativamente a viabilidade celular e ao aumentar a concentração dos complexos este efeito não ocorre progressivamente.

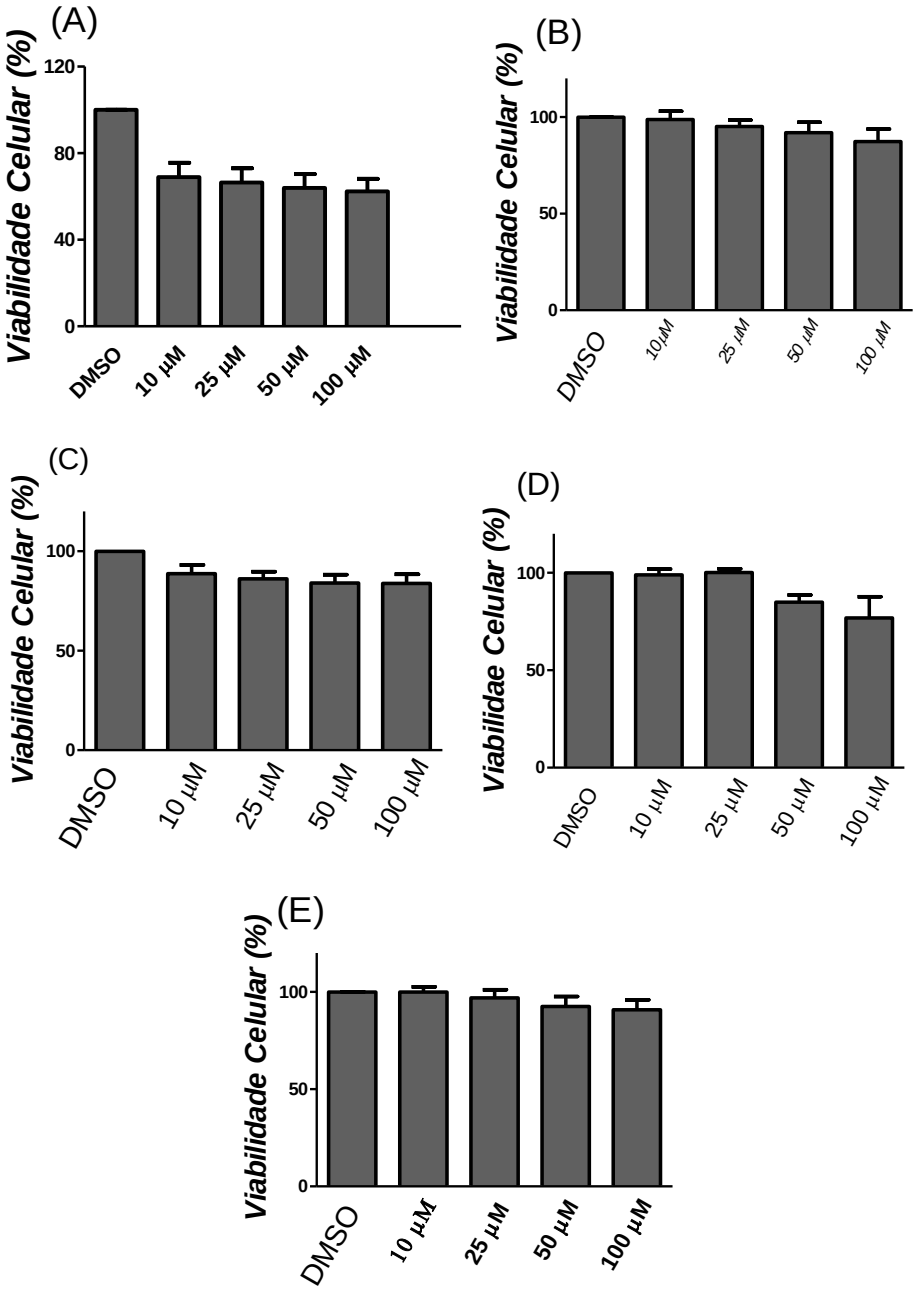
No caso dos complexos (**3**) e (**4**), na menor concentração (2 μM), ocorreu a redução da viabilidade celular em 52% e 62% respectivamente. Em termos estruturais estes complexos apresentam nos ligantes bidentados os grupos substituintes CH_3 e Cl. Em relação à interação com alvos biológicos a presença de grupos substituintes, como exemplo o grupo metila, influencia diretamente na atividade biológica expressa pelos compostos (BARREIRO, E.J et al.,2011; SALES, A.E et al.,2016; BIJARI, N et al.,2013). Recentemente a influência dos grupos substituintes presentes nos ligantes auxiliares foi reportada para os carboxilatos trinucleares de rutênio do tipo ($[Ru_3O(OAc)_6(NO)L_2]PF_6$ (L = 4-acetilpiridina, **1**, 4-terc-butil-piridina **2,** 3-metilpiridina, **3,** 4-metilpiridina,**4**), (SILVA, C.F.N et al.,2018). Neste estudo, para o complexo **(2)**, o qual apresenta o ligante 4-terc-butil-piridina a presença dos grupos metilas influencia diretamente a citotoxicidade deste complexo. A presença destes pequenos grupos nos ligantes pode ter efeito direto na lipofilicidade e hidrofobicidade dos complexos e estas propriedades podem impactar diretamente os processos biológicos, como a internalização celular, localização subcelular e interação com biomoléculas (proteínas e / ou DNA) ou bioestruturas, incluindo membranas celulares (SILVA, C.F.N et al.,2018). Neste caso é importante destacar o papel da metilação como uma estratégia reportada na literatura para a modulação da atividade biológica de alguns compostos (BARREIRO, E.J et al.,2011; SALES, A.E et al.,2016; BIJARI, N et al.,2013).

Com relação aos clusters **(1-5)**, o complexo com o ligante dppn reduziu a viabilidade celular em 43%, enquanto o complexo com o ligante phen reduziu apenas 25%, na concentração de 2 μM. Comparando o arranjo estrutural destes dois complexos, a maior citotoxicidade do complexo com o ligante dppn pode estar relacionada com a maior lipofilicidade deste cluster, o que pode ter uma influência direta na distribuição e absorção deste complexo no ambiente celular (PASTUSZKO, A et al.,2016).

O potencial citotóxico dos complexos (**1-5**) também foi avaliado na presença de células não tumorais (L929), Figura 70. Considerando-se as diferentes concentrações, os clusters **(2-5)** não apresentaram efeito citotóxico significativo contra as células não tumorais (L929). Como exemplo, o cluster **(4)**, com o ligante dppzCl, na concentração de 50 μM, não reduziu a viabilidade celular das células não tumorais, por outro lado,

nesta mesma concentração reduziu 71% a viabilidade celular das células tumorais (B16F10).

Figura 70: Efeito citotóxico, em células não tumorais L929, para os complexos ( ) (1-5; A-E) em diferentes concentrações, após 24 horas de incubação. Os dados apresentados estão relacionados com as médias ± S.E.M. de 3 experimentos realizados de forma independente. Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos controles, considerando p <0,05 de acordo com os testes ANOVA e Newman-Keuls



Fonte: Autora.

No caso do complexo (**1**) com o ligante dppn, na menor concentração de 2 μM, reduziu a viabilidade das células não tumorais em 32 %, o que representa um efeito citotóxico significativo comparado a citotoxicidade expressa pelos complexos (**2-5**).

Em relação à atividade citotóxica dos carboxilatos trinucleares de rutênio frente às linhagens celulares tumorais e não tumorais (B16F10 e L929), o nosso grupo de pesquisa foi o pioneiro em investigar estas propriedades dos complexos (CARNEIRO, Z.A et al.,2014). Em 2014, o efeito citotóxico foi investigado pela primeira vez para um carboxilato coordenado com o ligante NO, ($[Ru_3O(OAc)_6(NO)L_2]PF_6$ (L = 4-picolina), o qual reduziu a viabilidade celular das células tumorais (B16F10) após a irradiação, sendo o efeito de citotoxicidade expresso por este complexo diretamente relacionado com a liberação de $NO_{(g)}$ no meio celular (CARNEIRO, Z.A et al.,2014; SILVA, C.F.N et al.,2018). No entanto, na ausência de irradiação este complexo apresenta um efeito citotóxico somente em altas concentrações, com redução da viabilidade celular em 50% na concentração de 62.5 μM (CARNEIRO, Z.A et al.,2014).

O efeito citotóxico em células tumorais (B16F10) também foi avaliado para a série de carboxilatos trinucleares de rutênio com o ligante carbonil ($[Ru_3O(OAc)_6(L)_2(CO)]$, onde L = 4-aminopiridina (1), isonicotinamida (2), 4-(dimetil)aminopiridina (3) e 2,6-dimetilpirazina (4)), no entanto apenas em concentrações maiores do que 50 μM, os complexos reduzem a viabilidade celular em torno de 30% a 40% (MOREIRA, M.B.,2016).

Recentemente, os estudos de citotoxicidade foram realizados para a série de carboxilatos que apresentam ligantes azanaftalenos ($[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_3]PF_6$ (L = **(1)** quinazolina (qui), **(2)** 5-nitroisoquinolina (5-nitro), **(3)** 5-bromoisoquinolina (5-briq), **(4)** isoquinolina (iq), **(5)** 5-aminoisoquinolina (5-amiq), e **(6)** 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (thiq)), os quais em concentrações menores (2 μM) reduziram significativamente a viabilidade celular da linhagem tumoral (B16F10) na faixa de 60% a 55% para os complexos 2 e 5 respectivamente, (POSSATO, B.,2017).

No que diz respeito às estruturas dos compostos sintetizados neste trabalho, os ligantes bidentados coordenados nestes complexos foram escolhidos, pois se encontram na literatura resultados promissores, nos quais estes ligantes apresentaram atividades antitumorais interessantes (BRODIE, C.R et al.,2004). Além do mais, esses ligantes também são eficientes para serem utilizados nos estudos de intercalação de complexos com o DNA. Neste sentido, os complexos que se intercalam com o DNA são denominados metalointercaladores (BRODIE, C.R et al.,2004). Dentre os complexos

com atividades promissoras, destacam-se alguns que apresentam como ligantes os derivados da 1,10 fenantrolina. Estudos in vivo realizados com esses complexos demonstraram que estes foram capazes de reduzir o tumor, além de não apresentar toxicidade significativa para os animais (WHEATE, N.J et al.,2007; MORETTO, J et al.,2011).

Considerando um panorama geral dos estudos de viabilidade celular realizados em nosso grupo de pesquisa para os carboxilatos trinucleares de rutênio, nota-se que a presença dos ligantes bidentados nesta nova série aumentou expressivamente a citotoxicidade dos complexos nas células tumorais (B16F10), pois em concentrações menores (2 μM) houve uma redução maior da viabilidade celular em relação aos complexos investigados anteriormente (POSSATO, B.,2017; MOREIRA, M.B.,2016; CARNEIRO, Z.A et al.,2014; SILVA, C.F.N et al., 2018).

Neste cenário, muitas vezes o indício de alta/baixa citotoxicidade não deve ser considerado o fator mais importante no desenvolvimento de novos compostos com atividade anticâncer (ALESSIO, E.,2017). No entanto, muitos trabalhos reportados na literatura direcionam as pesquisas e discussões para a investigação de compostos de metais de transição que apresentam uma maior atividade citotóxica a células tumorais. No geral, outros fatores também devem ser considerados e o sucesso de um candidato a metalofármaco muitas vezes não está diretamente relacionado com a alta citotoxidade. Como exemplo, o caso da carboplatina, aprovada para uso medicinal em 1989, apresenta uma citotoxicidade bem menor do que a cisplatina e outros derivados, contudo a utilização deste complexo tem tido sucesso no uso clínico para tratamento de tipos específicos de câncer (RIXE, O et al.,1996; KNOX, R.J et al.,1986).

No caso do NAMI-A, primeiro complexo de rutênio que chegou a fase II dos estudos clínicos, estudos prévios de citotoxicidade mostraram que o complexo não é citotóxico contra as linhagens celulares de tumores sólidos, como é o caso da cisplatina (PILLOZZI, S et al.,2014; WEBB, M.I et al.,2013). Em estudos posteriores NAMI-A apresentou resultados excelentes relacionados à inibição da proliferação de diferentes tipos de tumores, como exemplo: leucemia, tanto mieloides como linfóides (WEBB, M.I et al.,2013). Contudo, no caso do NAMI-A após testes clínicos em humanos os estudos foram descontinuados, pois nos testes conduzidos *in vivo*, o complexo apresentou alto grau de toxicidade (ALESSIO, E.,2017).

3.2 Interação dos complexos (1-5) com DNA

Considerando as características estruturais e eletrônicas dos complexos **(1-5)**, bem como o efeito citotóxico apresentado por estes complexos, buscou-se também investigar a capacidade destes complexos em interagir com biomoléculas alvo, como exemplo o DNA e a HSA.

Os modos de interação com o DNA foram avaliados por três metodologias diferentes, quanto à clivagem do DNA plasmídico, por meio da titulação espectrofotométrica do *ct*-DNA com os complexos, bem como experimentos de viscosidade do DNA.

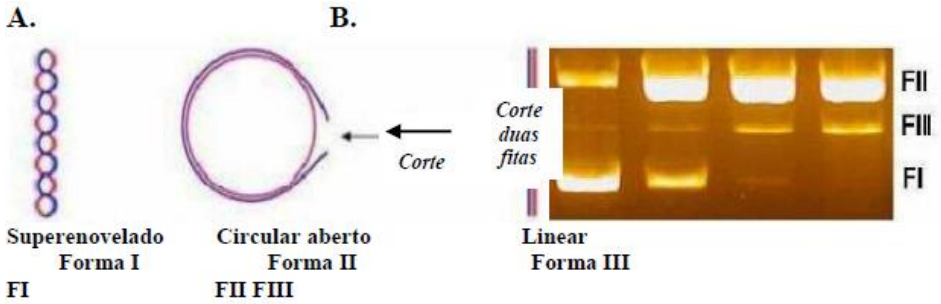
Desta forma, as discussões dos resultados obtidos estão apresentadas nos próximos itens deste capítulo.

3.2.1 Avaliação da mudança na mobilidade eletroforética do DNA plasmidial

Os ensaios de mudança da mobilidade do DNA foram realizados por meio da técnica de eletroforese utilizando-se DNA plasmidial (pUC19). Foram monitoradas as modificações da estrutura do DNA plasmidial na presença dos complexos em diferentes concentrações, tempos de incubação e irradiação.

Em sua forma íntegra as fitas do DNA plasmidial estão altamente tensionadas, e mantém-se na forma enovelada (FI). Contudo quando ocorre a clivagem do DNA, essas fitas podem sofrer distorções e o DNA adquire formas diferentes. Se a clivagem ocorrer apenas em uma das fitas, isto induzirá no alívio da tensão na estrutura enovelada e o plasmídeo assume a forma circular aberta (FII). Se ocorrer uma quebra dupla ou duas quebras simples o plasmídeo assume uma forma linear (FIII), Figura 71 (NAVARRO et al.,2003; KR, S.G et al.,2014).

Figura 71: Representação das diferentes formas de separação do DNA plasmidial eletroforese em gel de agarose

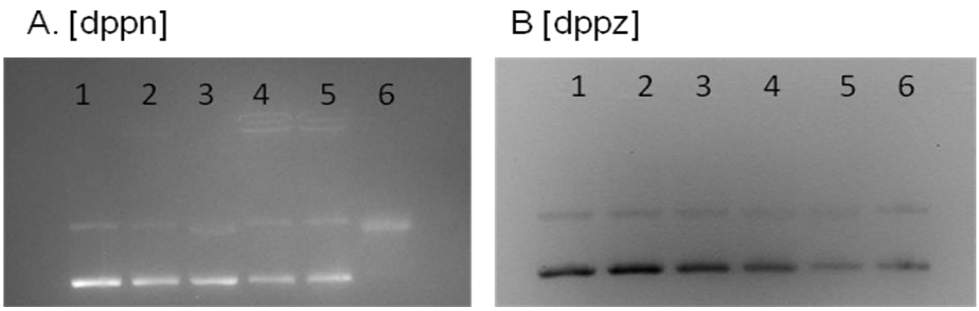


Fonte: Adaptado de NAVARRO, M et al.,2003.

Estes diferentes modos de clivagem podem ser diferenciados por eletroforese em gel de agarose, pois as diferentes formas do DNA plasmidial apresentam mobilidades eletroforéticas distintas (ERIKSSON, M et al.,2005). Desta forma, torna-se possível avaliar a capacidade de um composto clivar o DNA por meio da avaliação das "formas" visualizadas no gel (ANGELES-BOZA, A.M et al.,2004).

Para investigar a tendência dos complexos em clivar o DNA, incubou-se diferentes concentrações dos complexos na presença do DNA pUC19, e utilizou-se como controle o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, devido a sua eficiência em clivar o DNA (VICENDO, P et al.,1997). Na Figura 72 apresentam-se os géis de eletroforese para os complexos **(1)** e **(2)**.

Figura 72: Clivagem do DNA plasmídico (pUC19) seguida de eletroforese em gel de agarose (90 minutos, 70 volts) após incubação por 2 horas. Para os dois complexos (1 e 2), as linhas de 1 a 6 seguem a seguinte ordem: (Linha 1 = apenas *ct*-DNA; Linha 2 = DNA + complexo[10µM]; Linha 3 = DNA + complexo[20µM]; Linha 4 = DNA + complexo[50µM]; Linha 5 = DNA + complexo[50µM] + λ_{irr} = 450 nm (1 hora); Linha 6 = DNA + $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ [50µM] + λ_{irr} = 450 nm (10 min)



Fonte: Autora.

Como é possível observar na Figura 72, não ocorreu nenhum modificação na estrutura do DNA pUC19 nos diferentes tratamentos com os complexos **(1)** e **(2)**. Nota-se que os efeitos de concentração e até mesmo a irradiação dos complexos não induziram significativamente a clivagem do DNA. Contudo nas linhas 6 das Figuras 72A e 72B observa-se a clivagem do DNA causada pelo complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.

Reporta-se na literatura que complexos de rutênio com os ligantes da classe das fenazinas são capazes de induzir a clivagem do DNA pUC19 e este efeito está relacionado às espécies reativas de oxigênio que são produzidas após a irradiação dos complexos (FU, P.K.L et al.,2002). No caso dos complexos (**1-5**) sintetizados neste trabalho, estes não produzem espécies reativas de oxigênio após a irradiação, pois como discutido anteriormente em relação às propriedades fotofísicas, o tempo de vida do estado excitado destes complexos é extremamente curto e também não há formação de um estado tripleto que possibilita a transferência de energia para o oxigênio. Desta forma, por meio deste ensaio foi possível confirmar que os complexos não clivam o DNA e por isso conduziu-se novos experimentos com o intuito de investigar a interação destes complexos com o DNA por meio de outros mecanismos.

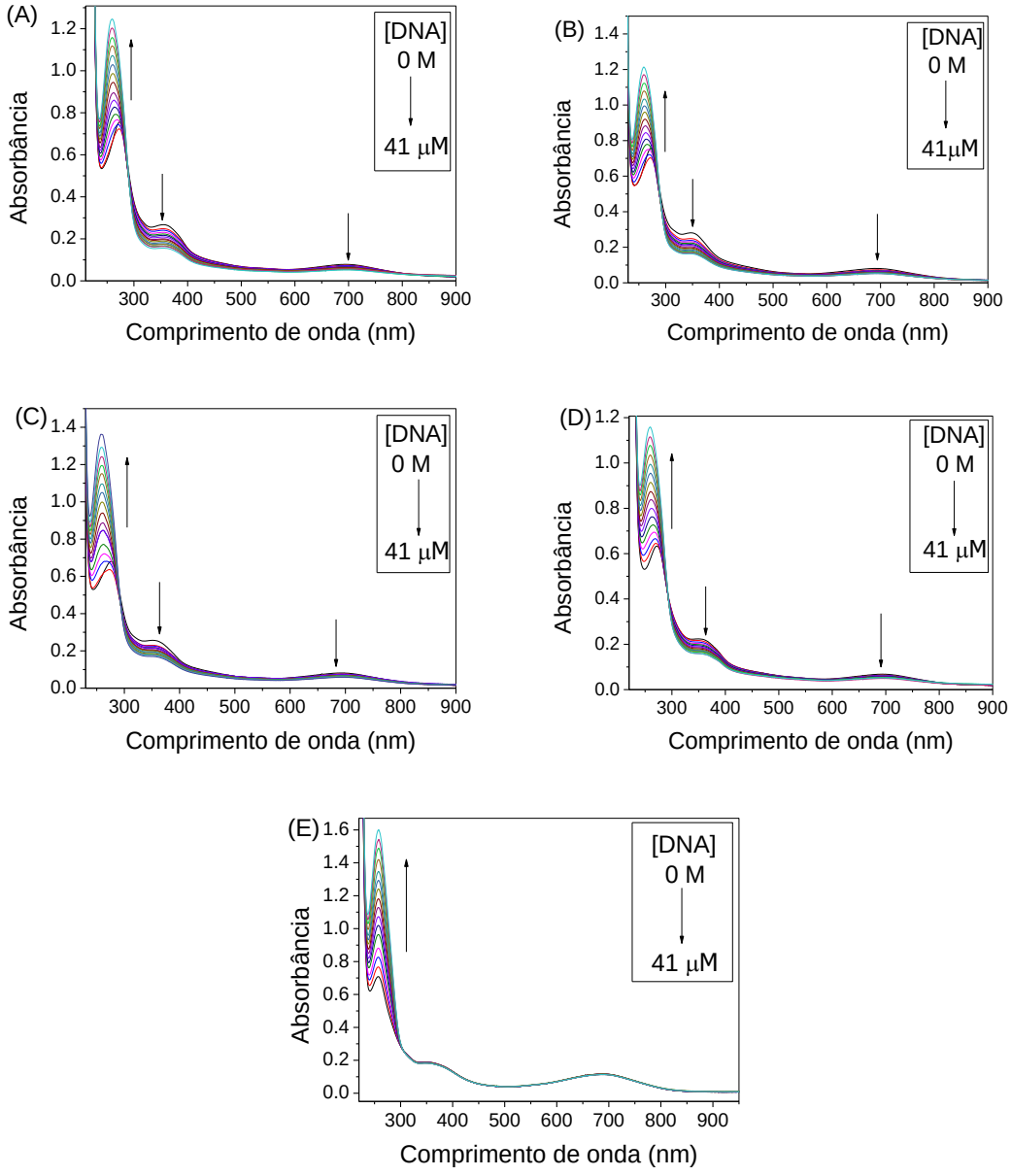
3.2.3 Titulação espectrofotométrica dos complexos (1-5) com o ct-DNA

A espectroscopia eletrônica de absorção é muito utilizada para investigar os modos de interação entre complexos metálicos e o DNA (TOPALA, T et al.,2014). Os complexos metálicos apresentam bandas de absorção na região do UV-Vis e o DNA apresenta uma intensa banda em 260 nm atribuída à presença dos grupos cromofóros presentes nas bases nitrogenadas do DNA, sendo que qualquer tipo de interação pode causar mudanças nas bandas de absorção dos complexos ou do DNA (Barra, C. V et al.,2015). A intensidade da interação entre os complexos metálicos e o DNA pode ser calculada por meio de modelos matemáticos, para a obtenção da constante de ligação (K_b), sendo que este valor numérico está diretamente relacionado com a magnitude da interação DNA/complexo (YOSHIOKA, N et al.,1999; VÎJAN, L. E et al.,2010).

Como discutido anteriormente, os complexos (**1-5**) apresentam 3 bandas de absorção na região de 200 nm à 700 nm, atribuídas às transições internas do ligante (π-π*), transição TCCL e transição IC, a qual apresenta menor energia. Após as sucessivas adições de *ct*-DNA é possível observar que, além da variação verificada diretamente na banda do DNA, as bandas de TCCL e IC dos complexos **(1-4)** também sofrem pequenas

variações de intensidade, Figura 73. Os espectros em outras temperaturas encontram-se no **ANEXO XIV.**

Figura 73: Espectros de absorção na região do UV-Vis registrados da titulação espectrofotométrica, a 25ºC, dos complexos (1-5, A-E, 20 µM) com *ct*-DNA (base pairs) [0 µM a 40 µM], em solução tampão Tris pH=7,5



Fonte: Autora.

Essas pequenas alterações nas bandas (TCCL e IC) sugerem que os complexos interagem com o DNA, ou seja, estes efeitos podem estar relacionados com as perturbações dos orbitais dos complexos em decorrência da interação com o DNA e consequentemente as transições eletrônicas sofrem alterações em termos da energia e

intensidade (POSSATO, B.,2017). No entanto, as mudanças espectrais são mais significativas na região do espectro onde se localizam as transições π-π* dos ligantes e a banda do DNA.

Para os cálculos da constante de ligação (K) entre os complexos e o DNA,utilizou-se neste trabalho o método de Benesi-Hildebrand.

O modelo matemático de Benesi-Hildebrand é muito utilizado desde 1949 e relaciona a variação da absorbância com a constante de ligação do complexo ao DNA, Equação 8, (BENESI, H.A; HILDEBRAND, J.H.,1949).

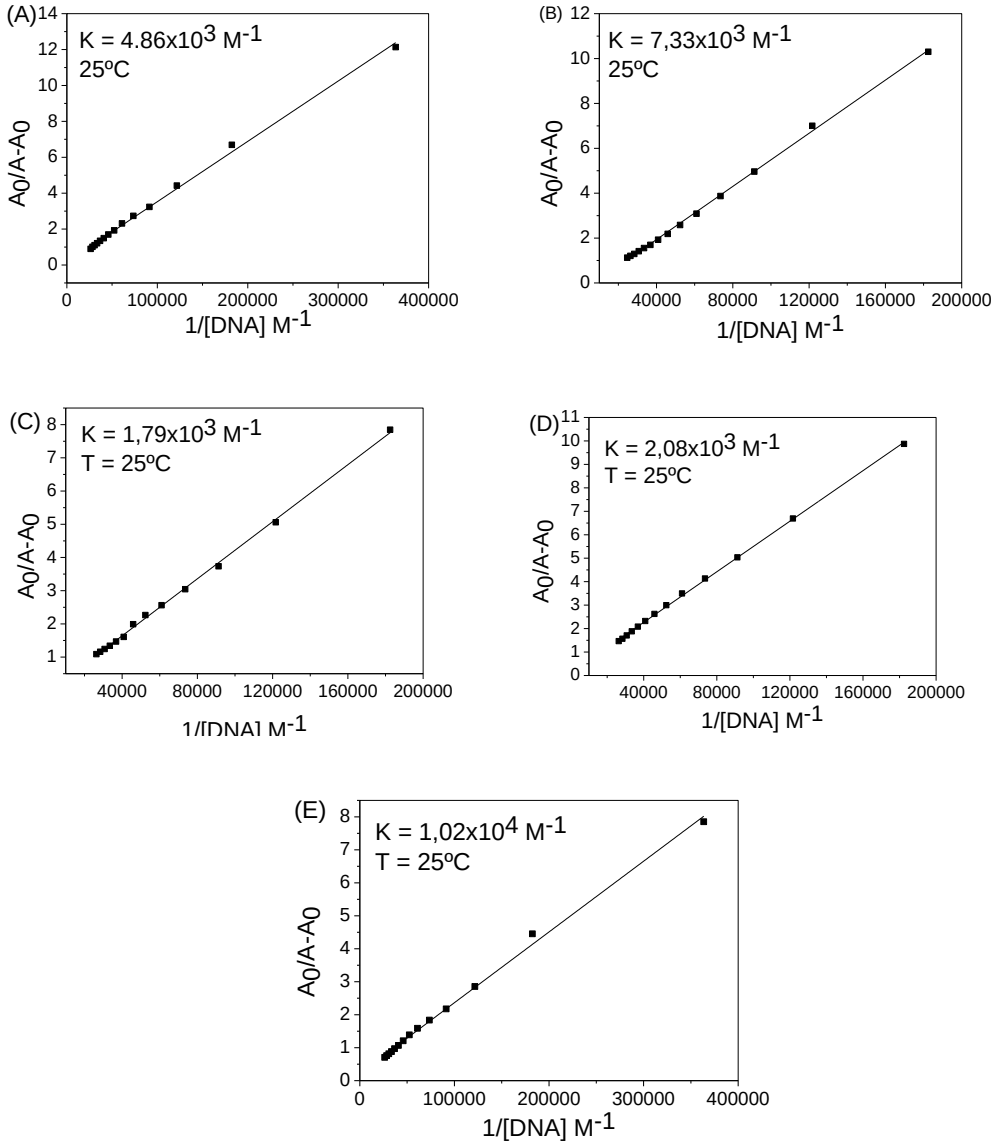
$$\frac{A}{A - Ao} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} x \frac{1}{K[DNA]}$$

Equação 8

A_0 = absorbância no comprimento de onda estudado na ausência do DNA;
A = absorbância no comprimento de onda estudado após as sucessivas adições de DNA;
ε_G = coeficiente de absortividade molar no comprimento de onda estudado;
ε_{H-G}= coeficiente de absortividade molar no comprimento de onda estudado para o aduto complexo-DNA;
K = constante de ligação referente à formação do aduto complexo/DNA

Considerando que a Equação 8 é uma equação de reta, a constante de ligação (K) é dada pela razão entre os coeficientes linear e angular do gráfico, $A/A-A_0$ *versus* 1/K[DNA]. Na Figura 74 apresentam-se os gráficos referentes aos resultados obtidos com a temperatura de 25ºC. No **ANEXO XV** apresentam-se os gráficos obtidos para as temperaturas de 31ºC e 37ºC.

Figura 74: Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos complexos (1-5, A-E, 20 µM) durante a titulação com o *ct*-DNA [0 µM a 40 µM], 25ºC



Fonte: Autora.

Os experimentos foram realizados em três temperaturas (25ºC, 31ºC e 37ºC) para todos os complexos, e utilizando-se a Equação de Van't Hoff (Equação 9), foram calculados os parâmetros termodinâmicos da interação dos complexos com o DNA, Figura 75, (ATKINS, P.W et al.,2014).

$$\ln Kb = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$$

Equação 9

Onde:

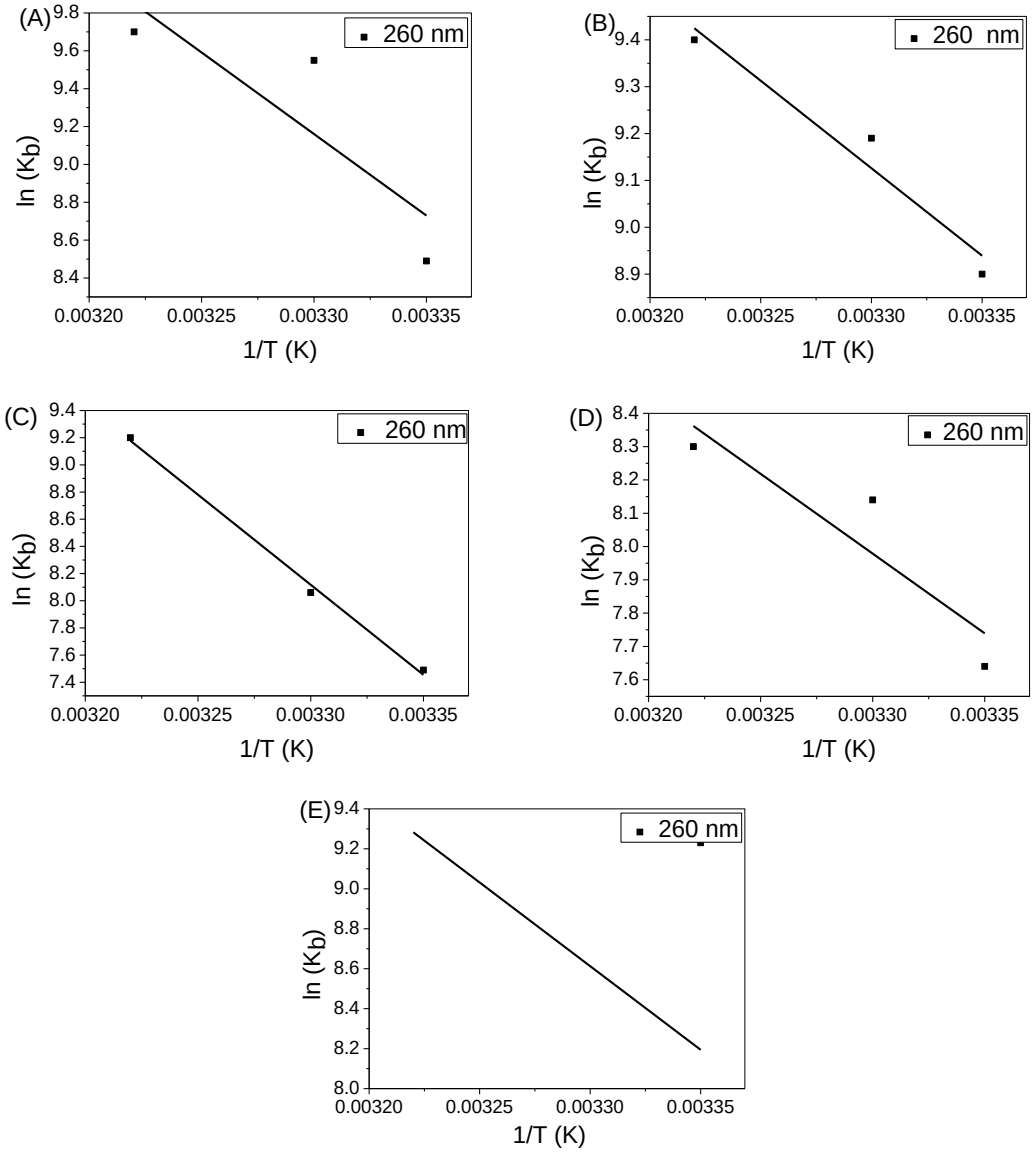
K_b = constante de ligação na Temperatura T

ΔH = variação de entalpia

R = constante dos gases ideais 8,31447 J mol^{-1} K^{-1}

ΔS = variação da entropia do sistema

Figura 75: Gráficos de van´t Hoff para as interações dos complexos (1-5, A-E) com o *ct*-DNA em diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 31ºC, 37ºC)



Fonte: Autora.

A variação da entalpia foi obtida através do coeficiente angular da reta de $\ln K_b$ versus 1/T, e a variação de entropia obtida através do coeficiente linear do gráfico.

A variação da energia livre de Gibbs foi obtida através da Equação 10:

$$\Delta G = -R\,T \ln K$$

Equação 10

Na Tabela 12 apresentam-se os valores das constantes de ligação e os parâmetros termodinâmicos obtidos para a interação dos complexos com o DNA.

Por meio da variação espectral, como apresentado na Figura 73, é possível investigar os tipos de interação entre os complexos e o DNA. De acordo com Sirajuddin, J e colaboradores, no caso da utilização da técnica de UV-Vis algumas alterações espectrais podem ser relacionadas com os tipos de interação entre o complexo e o DNA, como por exemplo:

1) Hipocroísmo e deslocamento batocrômico, caracterizam o processo de intercalação;

2) Hipercroísmo e deslocamento hipsocrômico, indicam que ocorre interações covalentes;

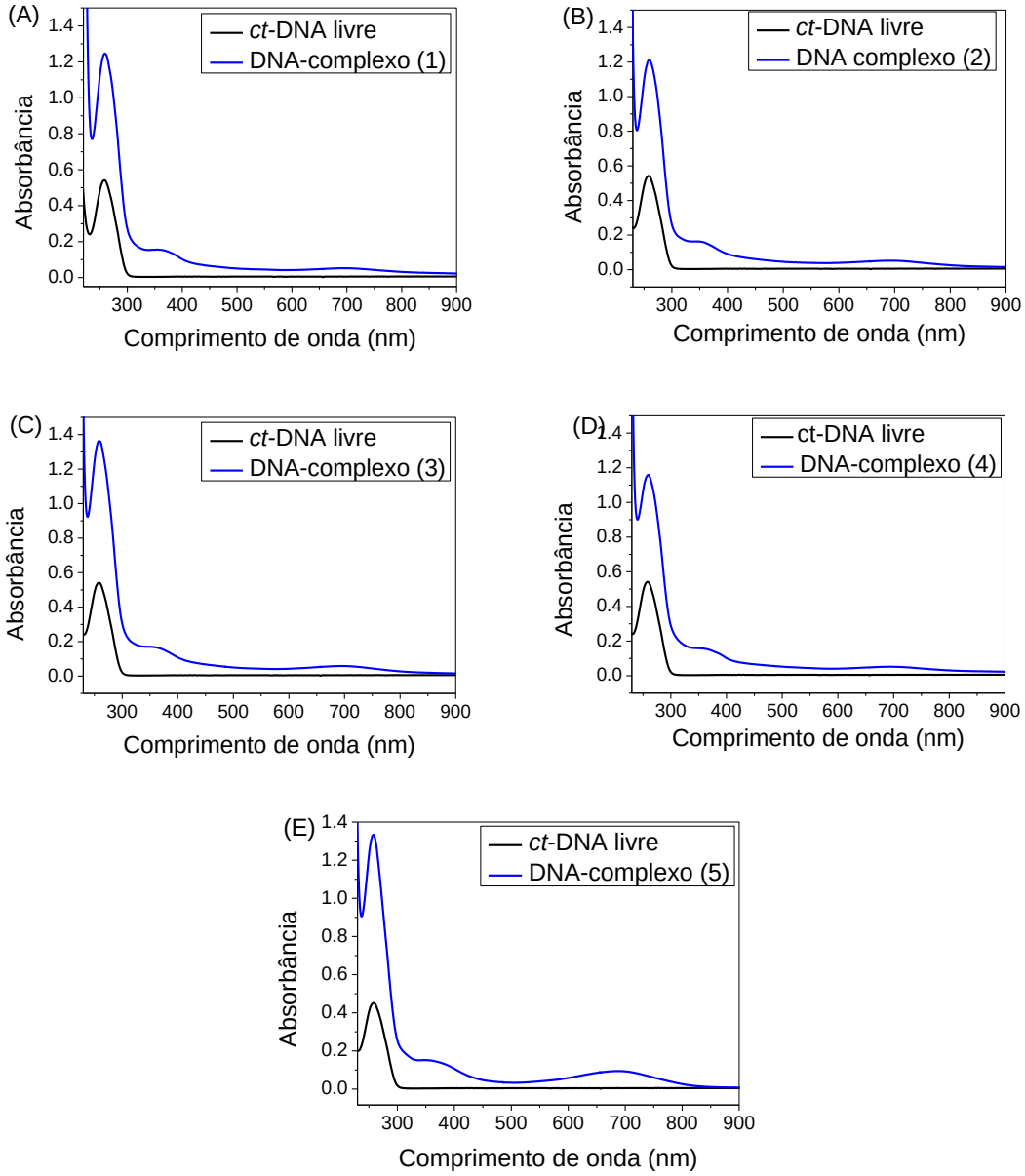
3) Hipocroísmo ou hipercroísmo sem deslocamentos nos máximos de absorção das bandas, podem estar relacionadas a interações de natureza eletrostáticas nos sulcos do DNA (SIRAJUDDIN, M et al.,2013).

Com relação aos espectros apresentados na Figura 73, nota-se um hipercroísmo significativo da banda do *ct*-DNA em 260 nm para todos os complexos. Contudo, como consequência das adições sucessivas de *ct*-DNA durante a titulação, ocorre o aumento da concentração e da absorção do *ct*-DNA na região de 260 nm (SIRAJUDDIN, M et al.,2013). Para investigar a origem desta alteração espectral, foram registrados espectros controles com soluções de *ct*-DNA na mesma concentração na presença e ausência de cada complexo, Figura 76. Este experimento controle indicou claramente que o efeito da alteração da absorbância na banda em 260 nm está relacionado a interações que ocorrem entre os complexos e o DNA e não ao efeito da concentração do DNA.

Tabela 12: Valores das constantes de ligação (K) e dos parâmetros termodinâmicos para os complexos (1-5) em três temperaturas (25, 31 e 37 ºC), λ_{exc} = 280 nm

dppn cluster (1)					
T (K)	25ºC	31ºC	37ºC	ΔH(kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1} K^{-1})
K (M^{-1})	4,86x10^3	1,44x10^4	1,50x10^4	+ 0,72	+ 312,26
ln K	8,49	9,57	9,61		
ΔG (kJ mol^{-1})	- 21,0	- 24,1	- 24,8		
dppz cluster (2)					
T (K)	25ºC	31ºC	37ºC	ΔH(kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1} K^{-1})
K (M^{-1})	7,33x10^3	9,79x10^3	1,19x10^4	+ 31,0	+ 178.28
ln K	8,90	9,19	9,40		
ΔG (kJ mol^{-1})	- 22,1	- 23,1	- 24,2		
dppzCH$_3$ cluster (3)					
T (K)	25ºC	31ºC	37ºC	ΔH(kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1} K^{-1})
K (M^{-1})	1,79x10^3	3,16x10^3	9,87x10^3	+ 110	+ 431,18
ln K	7,49	8,06	9,20		
ΔG (kJ mol^{-1})	- 18,6	- 20,3	- 23,7		
dppzCl cluster (4)					
T (K)	25ºC	31ºC	37ºC	ΔH(kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1} K^{-1})
K (M^{-1})	2,08x10^3	3,43x10^3	4,02x10^3	+ 39,8	+ 198,77
ln K	7,64	8,14	8,30		
ΔG (kJ mol^{-1})	- 18,9	- 20,5	- 21,4		
phen Cluster (5)					
T (K)	25ºC	31ºC	37ºC	ΔH(kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1} K^{-1})
K (M^{-1})	1,02x10^4	3,33x10^4	6,31x10^4	+ 111,7	+ 452,7
ln K	9,23	10,41	11,05		
ΔG (kJ mol^{-1})	- 22,9	- 26,3	- 28,5		

Figura 76: Espectros de absorção da região do UV-Vis referentes à comparação entre a intensidade da última curva da titulação espectrofotométrica e a concentração equivalente de ct-DNA livre, [Complexo/DNA] = 42 µM e [DNA] = 42 µM, em solução tampão Tris pH=7,5, 25ºC



Fonte: Autora.

Como pode ser observado na Figura 76, a intensidade da banda na região de 260 nm para todos os complexos na presença de *ct*-DNA sofre um aumento significativo em relação ao máximo de absorbância apresentado para as soluções contendo apenas *ct*-DNA. Esta observação indica que algum tipo de interação está ocorrendo entre os complexos e o DNA e o hipercroísmo observado nesta região está relacionado com a formação do aduto complexo-DNA.

O hipercroísmo observado nos espectros dos complexos (**1-5**), sem deslocamentos nos máximos de absorção das bandas, indica que a natureza da interação complexo-DNA tem contribuição de interações eletrostáticas nos sulcos do DNA (SIRAJUDDIN, M et al.,2013; KOMOR, A.C et al.,2013).

No caso dos complexos **(1-5)** sintetizados neste trabalho, além das interações eletrostáticas, as características estruturais e eletrônicas dos ligantes bidentados coordenados nos clusters favorecem a formação de um tipo de interação não covalente, também conhecida como: intercalação (LIU, H.K et al.,2011). Como característica principal estes ligantes aromáticos, planares e ricos em elétrons π, pode se inserir entre os dois pares consecutivos de bases do DNA (Barra, C.V et al.,2015). Em termos específicos, complexos que apresentam ligantes desta natureza e interagem com o DNA, são denominados metalointercaladores (LIU, H.K et al.,2011). Este tipo de interação (intercalador-DNA) pode ser estabilizada por ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, hidrofóbicas, além das interações que podem ocorrer devido ao empilhamento π entre os grupos aromáticos dos pares de bases do DNA e as estruturas aromáticas dos ligantes intercaladores (SIRAJUDDIN, M et al., 2013; KOMOR, A.C et al.,2013). Como exemplo, o complexo $[Ru(bpy)_2dppz]^{2+}$ apresenta alta afinidade com o DNA, sendo que o valor da constante de ligação com o DNA ($K = 10^6$) é muito próximo do valor observado para o intercalador de referência (brometo de etídio, $K = 10^7$), (FU, P.K.L et al.,2002; ANGELES-BOZA, A.M et al.,2004). As estruturas cristalinas dos complexos Ru-dppz/DNA indicam claramente que a intercalação destes complexos ocorre entre os pares de bases do DNA.

De fato, com a coordenação dos ligantes intercaladores nas estruturas dos clusters **(1-5)**, esperava-se obter valores mais altos das constantes de ligação com o DNA, no entanto os valores são menores em relação aos complexos de rutênio mononucleares que apresentam estes ligantes. Apesar das propriedades dos ligantes bidentados no processo de intercalação, para os complexos **(1-5)** as alterações espectrais indicam que o processo predominante está relacionado com interações eletrostáticas. Isto indica que toda a organização estrutural dos complexos **(1-5)** não favorece uma intercalação efetiva dos ligantes bidentados com o DNA. Apesar da carga formal +1 dos complexos **(1-5)**, a nuclearidade, ou seja, o arranjo estrurural da unidade $[Ru_3O]^+$ pode não favorecer o processo de intercalação comparado com os complexos mononucleares de rutênio, os quais apresentam apenas um íon rutênio no arranjo estrutural.

Barton, J.K e colaboradores mostraram que para os complexos mononucleares de rutênio com ligantes dppz, o processo de intercalação no DNA envolve a sobreposição do sistema π entre as bases de DNA e o ligante, o qual tem o efeito de desenrolar e alongar a dupla hélice do DNA. Neste processo de intercalação também estão envolvidas interações de Van der Waals, hidrofóbica e eletrostática.

Considerando o processo de intercalação dos complexos (**1-5**) com o DNA esperava-se a seguinte tendência em relação aos valores das constantes de ligação (dppn>dppz>phen), no entanto a constante de ligação maior foi obtida para o complexo **(5)** com o ligante phen, o que reforça a tendência deste complexo no modo de interação eletrostática.

Com relação aos parâmetros termodinâmicos, observa-se que a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) nas diferentes temperaturas é menor do que zero, indicando que a interação dos complexos com o DNA é um processo espontâneo (ROSS, P. D et al.,1981).

Como apresentado na Tabela 12, os valores das constantes termodinâmicas (ΔH>0 e ΔS>0) indicam que na formação do aduto complexo-DNA predominam interações de natureza hidrofóbica (ROSS, P.D.,1981).

Em termos das constantes de ligação (K) nota-se que para todos os complexos estes valores aumentam em função do aumento da temperatura, o que indica que em temperaturas maiores, como exemplo na temperatura de referência para ensaios *in vivo*, 37ºC, as interações entre os complexos e do DNA são favorecidas.

Considerando os experimentos de titulação espectrofotométrica com o DNA, na literatura encontra-se uma variedade de modelos matemáticos para obtenção da constante de ligação através dos dados espectrais (CARTER, M.T et al.,1989; VÎJAN, L.E et al.,2010). Contudo, uma investigação a respeito destas metodologias apresentadas em inúmeros artigos mostrou claramente que não há uma consistência nos tratamentos dos dados que se referem aos cálculos das constantes de ligação (KUNTZ JR, I.D et al., 1968; THORDARSON, P et al.,2011). Com relação aos procedimentos experimentais, a faixa de concentrações bem como o número de medidas (adições sucessivas do DNA), não segue uma tendência e em alguns casos as particularidades dos sistemas, como exemplo os aspectos estruturais dos complexos a serem estudados, não são considerados. É importante destacar que esta tem sido uma discussão recorrente em nosso grupo de pesquisa, com o intuito de compreender as metodologias e os

tratamentos de dados antes de aplicá-los aos nossos sistemas em particular (REIS, F.C.C et al.,2018; POSSATO.B et al.,2017).

Com relação aos aspectos qualitativos dos modelos matemáticos, os métodos lineares mais utilizados para os tratamentos de dados que envolvem a interação DNA/complexo são os métodos de Benesi-Hildebrand, Scott e Scatchard (CARTER, M.T et al.,1989; VÎJAN, L.E et al.,2010). Em termos experimentais para aplicação destes métodos a concentração inicial do ligante (complexo) deve ser bem maior que a concentração inicial do substrato (DNA), e a estequiometria complexo/DNA deve ser 1:1.

Com relação aos aspectos matemáticos, para a solução destas equações lineares torna-se necessário reduzir ao máximo as variáveis dos sistemas e muitas vezes devem-se adotar algumas aproximações para a obtenção dos resultados (THORDARSON, P et al.,2011).

É importante destacar o trabalho apresentado por Thordarson P em 2010, o qual discute algumas questões importantes principalmente relacionadas aos modelos matemáticos aplicados em sistemas supramoleculares. O ponto principal abordado diz respeito à análise de dados, usando métodos de regressão linear desatualizados, como o Benesi – Hildebrand / Lineweaver – Burk, Scott / Hanse – Woolf ou transformações de Scatchard, pois estes métodos foram úteis antes dos computadores modernos, mas podem introduzir uma série de erros e problemas os quais podem ser evitados com a regressão não linear, com resolução de equações mais complexas, com mais variáveis, utilizando-se programas computacionais (THORDARSON, P.,2011). Neste caso, como exemplo, pode-se equacionar a concentração total do DNA com a concentração do complexo livre em solução.

3.2.4 Viscosidade

Na ausência de dados estruturais cristalográficos, desde os anos 60 o experimento de viscosidade relativa é bem conhecido como o teste menos ambíguo e mais crítico para o modelo de ligação do DNA com complexos metálicos em solução (SATYANARAYANA, S et al.,1993; SUN, Y et al.,2008).

No geral a viscosidade é definida como uma propriedade física do líquido, relacionado com a resistência do líquido em fluir, sendo que isto ocorre como consequência das interações intermoleculares em função da temperatura. Como um

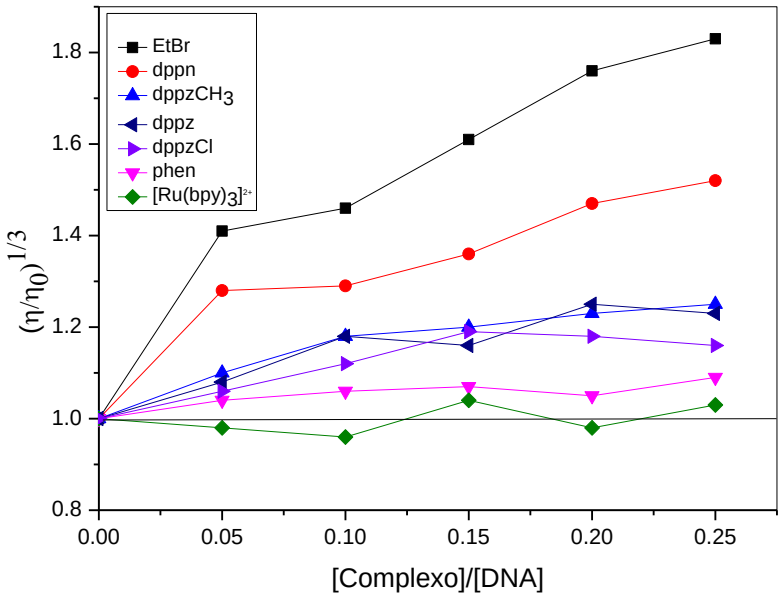
modelo de ensaio biológico, por meio desta técnica podem-se investigar os três principais modos de interação frente ao DNA (ELERT, G.,1998).

Como descrito por Lerman, quando ocorre o processo de intercalação complexo/DNA observa-se um aumento crítico da viscosidade do DNA, isto ocorre, pois o mecanismo de intercalação resulta no alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice do DNA e consequentemente o aumento da viscosidade da solução (LERMAN, L.S.,1961). Em caso da formação de ligação covalente com o DNA, ocorre uma diminuição da viscosidade do DNA, pois ocorre distorção da dupla hélice e redução do comprimento do DNA, como exemplo, é o que ocorre para a cisplatina (LERMAN, L.S.,1961). Quando os compostos interagem nos sulcos do DNA, o comprimento da molécula não se modifica e neste caso não ocorre alterações na viscosidade da solução de DNA (LERMAN, L.S.,1961).

Neste trabalho, os experimentos foram conduzidos na presença de *ct*-DNA em diferentes concentrações dos complexos **(1-5)**. Como controle para avaliar a eficiência da intercalação utilizou-se o brometo de etídio (EtBr) e o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, sendo que o EtBr apresenta uma constante de interação com o DNA relativamente alta ($K \sim 10^7$ M^{-1}) e o complexo de rutênio se liga ao DNA apenas através do modo eletrostático e não altera a viscosidade do DNA (LUTTERMAN, D.A et al.,2008).

Na Figura 77, apresenta-se o gráfico de viscosidade obtido para os complexos **(1-5)**. As Tabelas com os detalhes dos dados experimentais encontram-se no **ANEXO XVII.**

Figura 77: Gráfico de $[\eta/\eta o]^{1/3}$ *versus* [Ru]/[DNA] para os complexos (1-5), EtBr e $[Ru(bpy)_3]^{2+}$



Fonte: Autora.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 77, observa-se que a maior viscosidade foi induzida pelo EtBr e dentro da classe dos complexos **(1-5)**, nota-se uma maior viscosidade para o complexo com o ligante dppn. No caso do complexo com o ligante phen a variação da viscosidade é muito próxima ao observado para o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, em que a natureza da interação predominante é eletrostática (GAO, F et al.,2008).

Os resultados de viscosidade obtidos refletem a tendência de cada cluster se intercalar nos pares de bases do DNA. O aumento da viscosidade do DNA observado para os complexos sugere um modo intercalativo clássico (GAO, F et al.,2008). Como esperado, o complexo **(1)** com o ligante bidentado dppn apresenta maior extensão da conjugação π e interfere significativamente na viscosidade do DNA quando comparado ao complexo **(5)** com o ligante phen (SUN, Y et al.,2010).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm explorado os modos de ligação dos complexos de rutênio com os ligantes dppz e dppn. Em 2008, Liang-Nian Ji e colaboradores mostraram que o aumento do grau de viscosidade, entre uma série de complexos de rutênio segue a seguinte ordem de EtBr> $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$> $[Ru(bpy)_2(appo)]^{2+}$> $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (GAO, F et al.,2008).

Considerando os resultados de interação dos complexos **(1-5)** com o DNA por meio das diferentes técnicas pode-se concluir que os complexos não clivam o DNA, no entanto interagem com o DNA.

Para todos os complexos os perfis espectrais obtidos nas titulações espectrofotométricas indicam que ocorrem interações eletrostáticas entre os clusters e o DNA. Os parâmetros termodinâmicos indicam a presença de interações eletrostática. Com os experimentos de viscosidade foi possível confirmar que de fato o tamanho do intercalador (ligante bidentado) influencia diretamente nos modos de interação dos clusters com o DNA. Os resultados sugerem que as interações eletrostáticas predominam nos complexos com os ligantes "menores', (como exemplo: phen) e a intercalação torna-se mais significativa à medida que a extensão π dos ligantes aumenta, (dppn>dppzCH_3, dppzCl>dppz).

Outro aspecto estrutural interessante é que os valores das constantes de ligação dos complexos **(1-5)** são menores em relação aos complexos intercaladores mononucleares, os quais apresentam carga formal +2. Isto sugere que os clusters, (carga formal +1), apenas interagem efetivamente com o DNA quando o ligante intercalador fica suficientemente grande (dppn) para manter a parte metálica "afastada".

Além do mais os resultados sugerem que o DNA não é o alvo principal relacionado com a citotoxidade dos complexos, sendo que o complexo que apresenta maior tendência de intercalação (complexo (1)) não apresenta maior citotoxicidade.

3.3 Investigação da interação dos complexos (1-5) com albumina do soro humano (HSA)

No caso da interação dos complexos com a HSA, utilizou-se a espectroscopia de fluorescência, além de medidas do tempo de vida e monitoramento da estrutura secundária da HSA por meio da técnica de dicroísmo circular.

Como discutido anteriormente a HSA é uma das proteínas mais abundantes do plasma humano, atua principalmente como transportadora e também no descarte de várias substâncias exógenas (EFTINK, M.R.,1991; HU, Y et al.,2004). Desta forma, a interação de um fármaco com a HSA pode levar a maior solubilidade do fármaco no plasma, diminuir a toxicidade e também pode ocorrer a "proteção" do fármaco até o alvo de interesse (EFTINK, M.R.,1991; HU, Y et al.,2004). Além disso, muitos estudos têm reportado a capacidade da HSA se acumular nos tumores, sendo a HSA absorvida

por células tumorais em níveis maiores em relação às células normais, desta forma a HSA pode atuar como transportadora de fármacos anticancerígenos como exemplo: clorambucil, paclitaxel e doxorrubicina (EFTINK, M.R.,1991; HU, Y et al.,2004). Consequentemente, a investigação *in vitro* da interação dos complexos com a HSA fornece informações valiosas para estudos que visam compreender a farmacocinética e distribuição de novos fármacos no organismo.

Considerando a classe dos metalofármacos, estudos de cunho biológico investigam as propriedades de complexos de rutênio (II) e (III) como potenciais agentes anticâncer. Apesar da relevante atividade biológica de alguns complexos, o grande desafio nesta área é compreender os mecanismos de ação destes compostos (VERGARA, A et al.,2013; MERLINO, A.,2016; NIKOLAOU, S et al.,2018). Considerando a interação de complexos de rutênio com proteínas, estudos de raios X conduzidos com o complexo NAMI-A indicam que em solução o complexo perde seus ligantes e apenas os íons de Ru interagem com a albumina, preferencialmente nos resíduos de histidina (VERGARA, A et al.,2013). Além do mais, estudos recentes sugerem que a atividade biológica observada para o NAMI-A e KP1019 pode estar relacionada com a formação do aduto HSA-Ru, o qual tem um papel relevante nas propriedades biológicas destes complexos (VERGARA, A et al.,2013; NIKOLAOU, S et al.,2018).

Neste sentido, é importante destacar a importância dos estudos de interação de novos compostos com a HSA, o qual pode fornecer informações importantes a respeito das propriedades biológicas dos complexos (NIKOLAOU, S et al.,2018).

A interação dos complexos (**1-5**) com HSA foi monitorada por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência, pois quando ocorre algum tipo de interação com a HSA observa-se a supressão da fluorescência da proteína, e a análise dos dados permitem determinar alguns parâmetros importantes a respeito desta interação.

Com adições sucessivas de alíquotas dos complexos a fluorescência da HSA foi monitorada. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados no comprimento de onda de excitação de 280 nm, o qual excita principalmente os sítios de triptofano e tirosina (PETERS, T.J.,1996).

Os espectros foram registrados nas temperaturas de 25ºC, 31ºC e 37ºC. Na Figura 79 apresentam-se os espectros de emissão de fluorescência da HSA para os complexos **(1-5)** na temperatura de 25ºC.

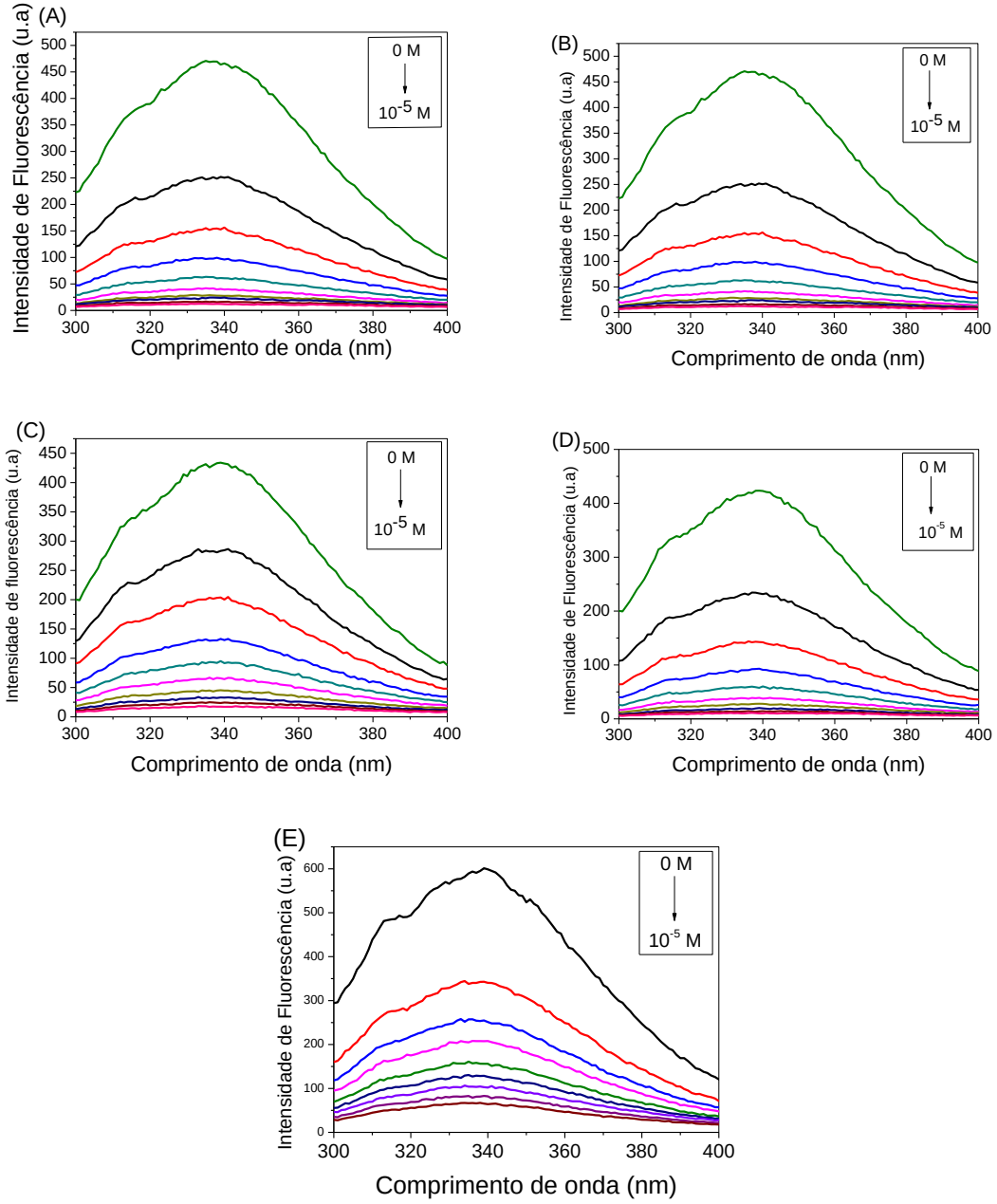
Nos espectros, Figura 78, observa-se a diminuição da intensidade de fluorescência da HSA com o aumento da concentração do complexo, o que sugere que os complexos estão interagindo com a HSA. Esta mudança espectral é causada principalmente pelas alterações na conformação do ambiente proteico dos resíduos de aminoácidos, sendo que esta interação é maior na porção do resíduo triptofano (Trp-214) (POSSATO, B.,2017; CACITA, N et al.,2016; REIS, F.C.C.,2018).

De maneira geral, dois mecanismos podem descrever a supressão da fluorescência: estático e dinâmico (LAKOWICZ, J.R.,2006; VALEUR, B.,2001).

No caso do mecanismo estático a interação entre o supressor (complexo) e o fluoróforo (albumina) ocorre no estado fundamental, sendo que esta interação diminui as espécies livres da proteína que pode ser excitada e consequentemente ocorre a diminuição da emissão pela HSA (VALEUR, B.,2001).

No mecanismo dinâmico a interação ocorre no estado excitado, sendo que o supressor (complexo) se difunde até o fluoróforo (HSA) durante o tempo de vida de seu estado excitado e o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton (VALEUR, B.,2001).

Figura 78: Espectros de emissão de fluorescência da HSA (10^{-6} M) em tampão Trizma (pH=7,4) na presença do complexos (1-5; A-E) em diferentes concentrações (0 M a 10^{-5} M) no período de incubação de 2 minutos à 25°C para λ_{exc}=280 nm (Tempo total de 80 minutos)



Fonte: Autora.

A natureza do mecanismo da interação entre os complexos (**1-5**) e a HSA foi primeiramente investigada por meio da relação matemática de Stern-Volmer, Equação 11 (LAKOWICZ, J.R.,2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\,\tau_0[S] = 1 + K_{sv}[Q]$$

Equação 11

Onde:

F_0 = intensidade de fluorescência na ausência do complexo;

F = intensidade de fluorescência na presença do complexo;

K_{SV}=constante de supressão de Stern-Volmer;

kq = constante bimolecular de supressão;

[S] = concentração do complexo;

τ_0 = tempo de vida médio das biomoléculas na ausência do supressor (10^{-8}s); (LAKOWICZ, J.R.,2006; VALEUR, B.,2001).

Contudo, como apresentado no **ANEXO XVII** as curvas de Stern-Volmer de F_0/F vs [complexo], obtidas por meio da Equação 12 apresentam um desvio em relação a linearidade, sendo observada uma inclinação positiva nas retas ao avaliar as 3 diferentes temperaturas de estudos (25ºC, 31ºC e 37ºC).

Para determinação dos valores de K_{sv}, Equação 11, por meio dos parâmetros F_0/F vs [Q] espera-se que a tendência dos gráficos seja um reta. No entanto, em muitos casos esta tendência não é observada, sendo que este efeito está diretamente relacionado com os mecanismos de supressão de fluorescência que ocorre com a HSA na presença dos complexos. Em alguns sistemas, a supressão de fluorescência pode ocorrer através dos dois mecanismos (dinâmico e estático) sendo que as colisões entre os complexos e a HSA também podem levar a formação de novos complexos. Quando ocorrem estes dois tipos de mecanismos os gráficos de Stern-Volmer apresentam uma curvatura e não uma reta, como o esperado (LAKOWICZ, J.R.,2006).

Nestes casos, para a obtenção das constantes de supressão bimolecular deve-se utilizar a equação modificada de Stern-Volmer, o qual considera os dois mecanismos de fluorescência, Equação 12, (LAKOWICZ, J.R.,2006).

$$K_{ap} = \left[\frac{F_0}{F} - 1\right]\frac{1}{[S]} = (K_D + K_S) + K_{D.}K_S[S]$$

Equação 12

Onde:

F_0 = intensidade de fluorescência na ausência do complexo;

F = intensidade de fluorescência na presença do complexo;

K_{ap} = constante de supressão aparente;

K_D = constante de supressão de fluorescência dinâmica;

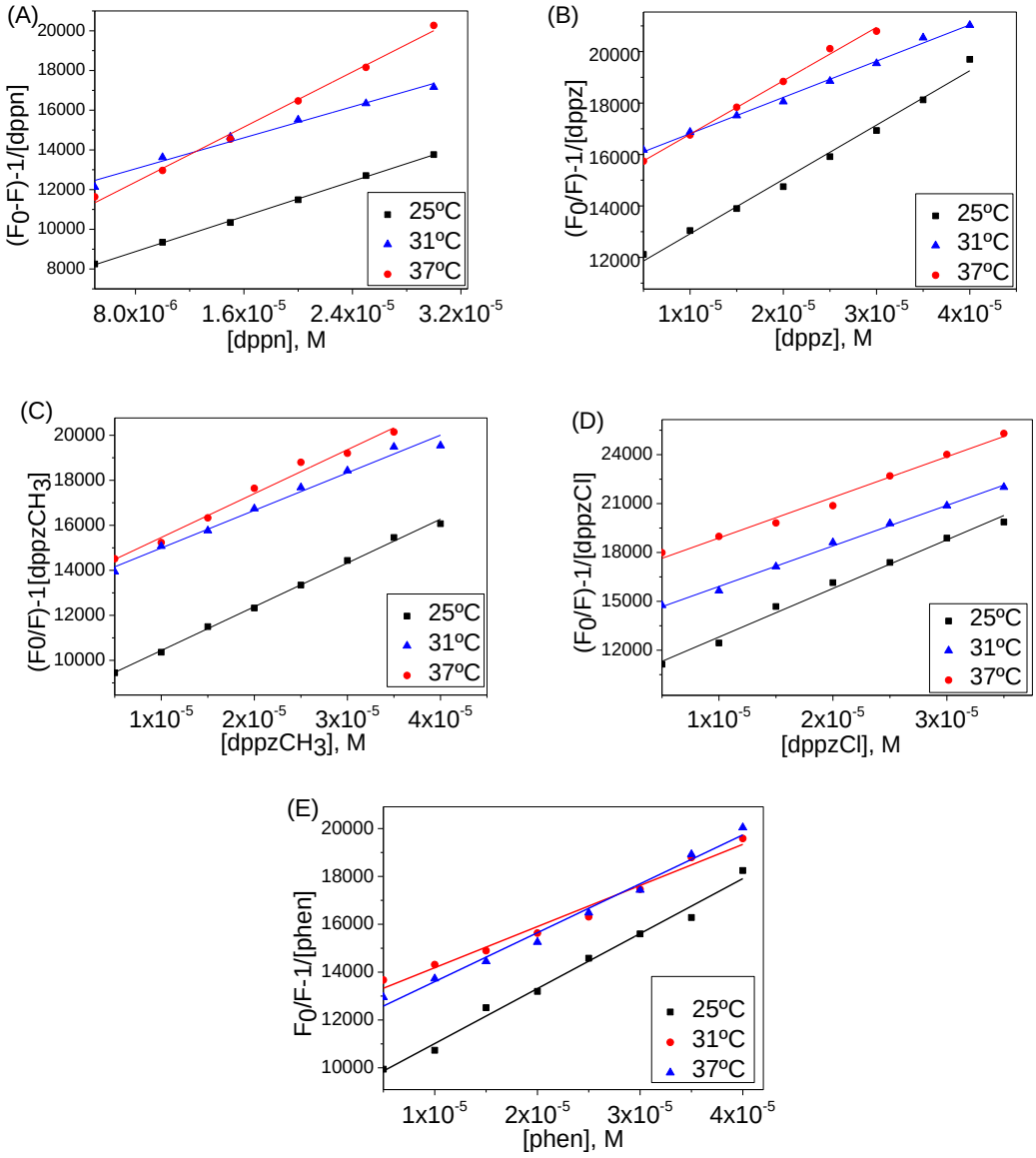
K_S = constante de supressão de fluorescência estática.

[S] = concentração do complexo.

Neste caso, o gráfico de K_{ap} *vs* [complexo] produz uma reta, a qual intercepta o eixo y no ponto onde tem-se $K_D + K_S$ e a inclinação da reta está relacionada ao produto das constantes $K_D.K_S$.

Na Figura 79, apresentam-se os gráficos de (F_0/F)-1/[complexo] vs [complexo] referentes às curvas linearizadas.

Figura79: Curvas de Stern-Volmer ((F_0/F) 1-[complexo]) da supressão da fluorescência da HSA (λ_{exc}= 280 nm) para diferentes concentrações dos complexos (1-5, A-E) em diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 31ºC e 37ºC)



Fonte: Autora.

Tabela 133: Constantes de Stern- Volmer (k_{ap}) para diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação (25, 31 e 37 ºC) em 280 nm

Complexos	K_{ap} 10^8 (M^{-1}) 25ºC	K_{ap} 10^8 (M^{-1}) 31ºC	K_{ap} 10^8 (M^{-1}) 37ºC
Complexo (1) dppn	**1,93**	**2,22**	**3,47**
Complexo (2) dppz	**9,16**	**12,4**	**13,4**
Complexo (3) dppzCH_3	**10,8**	**12,6**	**13,2**
Complexo (4) dppzCl	**14,3**	**16,8**	**17,2**
Complexo (5) phen	**4,72**	**5,62**	**6,32**

Com os valores apresentados na Tabela 13 observa-se um aumento da K_{ap} com o aumento da temperatura para os complexos. De acordo com a literatura tem-se que quanto maior este valor mais eficiente é o processo de supressão de fluorescência (CACITA, N et al.,2016; REIS, F.C.C.,2014). No caso da maior temperatura (37 ºC) os valores de k_{ap} são maiores, pois os resíduos dos aminoácidos (triptofano e tirosina) podem estar mais expostos para interagir com os complexos (CACITA, N et al.,2016; REIS, F.C.C.,2014). Além disso, o aumento de K_{ap} com o aumento da temperatura indica a contribuição maior do mecanismo de supressão de fluorescência dinâmico, pois o aumento da temperatura favorece um número maior de choques entre o supressor e a proteína (HOU, H.N et al.,2008).

Para a determinação da constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) para cada complexo, utilizou-se a Equação 13, sendo que τ_0 (tempo de vida médio das biomoléculas na ausência do supressor é de (10^{-8}s)). A Equação 21 é utilizada em casos nos quais predominam o mecanismo de supressão dinâmico.

$$\mathbf{K_{ap} = k_q \times \tau_0} \qquad \text{Equação 13}$$

Ao comparar os valores de k_q (Tabela 14) com o valor da constante difusional (k_{dif} = $2x10^{10}$ M^{-1} s^{-1}) também é possível verificar qual o mecanismo de interação entre o supressor e a HSA. Para os complexos em estudo observa-se que os valores de k_q são maiores que a constante difusional e desta forma, sugere que o mecanismo de interação é estático (LAKOWICZ, J.R.,2006).

Tabela 14: Constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) para diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação (25 ºC, 31ºC e 37ºC) em 280 nm

Complexos	k_q ($10^{16}M^{-1}s^{-1}$) 25ºC	k_q ($10M^{16}s^{-1}$) 31ºC	k_q ($10M^{16}s^{-1}$) 37ºC
Complexo (1) dppn	**1,93**	**2,22**	**3,47**
Complexo (2) dppz	**9,16**	**12,4**	**13,4**
Complexo (3) dppzCH$_3$	**10,8**	**12,6**	**13,2**
Complexo (4) dppzCl	**14,3**	**16,8**	**17,2**
Complexo (5) phen	**4,72**	**5,62**	**6,32**

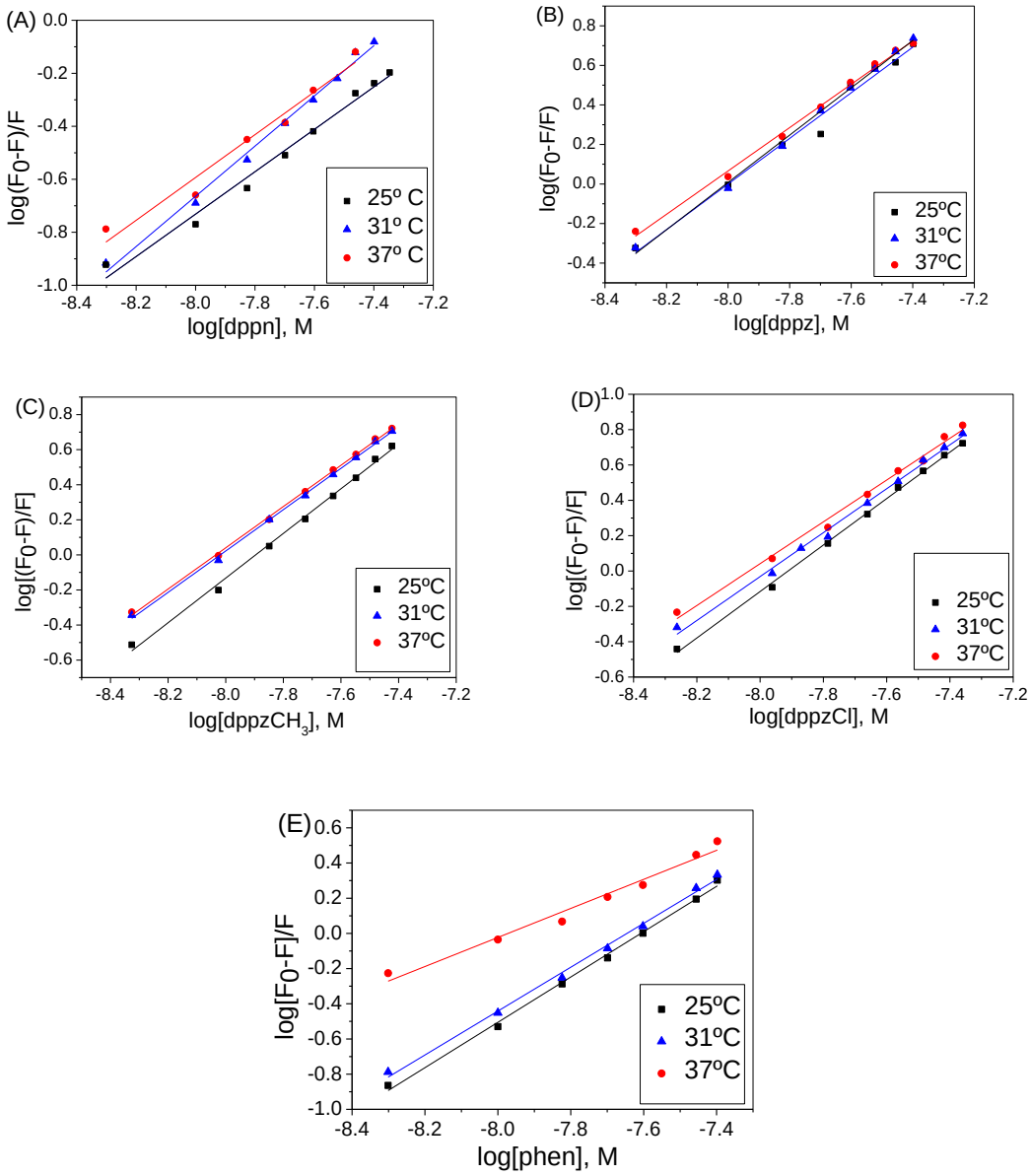
Desta forma, torna-se necessário investigar outros parâmetros envolvidos nas interações dos complexos com a HSA, os quais podem ser determinados por meio da Equação 14, onde K_b (constante de ligação) e n (número de sítios de ligação). Os gráficos que representam a Equação 22 estão apresentados na Figura 81.

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

Equação 14

Na Tabela 15 pode-se observar que os valores de K_b para todos os complexos são da ordem de 10^9 M^{-1} e que estas constantes de ligação para os complexos aumentam conforme a temperatura aumenta. Este mesmo comportamento foi observado por Cacita, N e colaboradores, quando investigaram a interação de complexos análogos, o que sugere que ocorre uma interação entre o complexo e a HSA (CACITA, N et al.,2016). O número de sítios de ligação (n) da biomolécula com o complexo, apresentam valores próximos de 1, os quais sugerem que o complexo se liga na proporção de 1:1 com a HSA. No entanto estes valores se modificam devido à alteração conformacional da HSA durante os experimentos (REIS, F.C.C.,2014).

Figura 80: Gráfico para encontrar a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação do supressor (n) em diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 31ºC e 37ºC)



Fonte: Autora.

Tabela 14: Constantes de ligação (K_b) e números de sítios de ligação do supressor (n) para diferentes concentrações dos complexos (1-5) em diferentes temperaturas de incubação (25 ºC, 31 ºC e 37 ºC)

Complexos	K_b (10^9 M^{-1}) 25ºC	n	K_b (10^9 M^{-1}) 31ºC	n	K_b (10^9 M^{-1}) 37ºC	n
Complexo (1) dppn	**0,47**	**0,81**	**1,06**	**0,83**	**7,82**	**0,94**
Complexo (2) dppz	**0,68**	**1,09**	**1,69**	**1,15**	**3,80**	**1,19**
Complexo (3) dppzCH_3	**1,12**	**1,27**	**2,82**	**1,17**	**2,96**	**1,18**
Complexo (4) dppzCl	**3,16**	**1,18**	**7,94**	**1,24**	**14,5**	**1,31**
Complexo (5) phen	**0,0037**	**0,82**	**3,46**	**1,24**	**9,80**	**1,28**

A magnitude das constantes de ligação (K_b) obtidas para os complexos **(1-5)** (10^9M^{-1}), indica que os complexos apresentam alta afinidade com a HSA, sendo estes valores de K maiores quando comparados com outros carboxilatos trinucleares de rutênio investigados em nosso grupo de pesquisa (POSSATO, B.,2017; CACITA, N et al.,2016; DA SILVA, C.F.N et al.,2018). É importante destacar que em termos estruturais o que diferencia esta classe de complexos é a presença dos ligantes bidentados, os quais podem ser responsáveis pela alta afinidade dos complexos com a HSA.

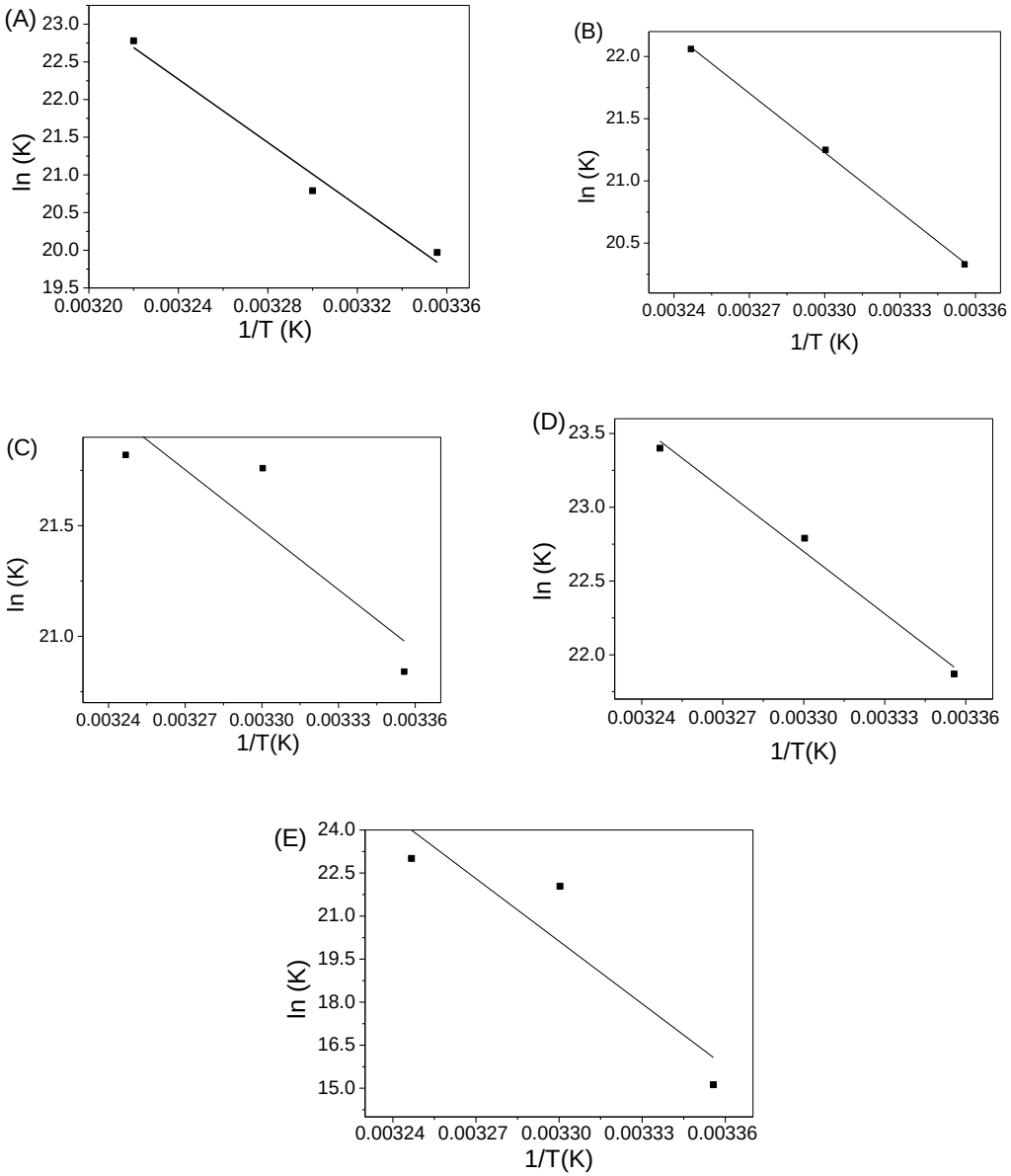
A natureza da interação entre os complexos e a HSA pode ser descrita por forças eletrostáticas, Van der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (HOU, H.N et al.,2008); (KALANUR, S.S et al.,2010). Quando os experimentos são realizados em diferentes temperaturas determinam-se os parâmetros termodinâmicos, por meio da Equação 9, apresentada no item 3.2.3. Esses parâmetros são importantes, pois definem as características físico-químicas da interação do complexo com a HSA (ROSS, P.D et al.,1981).

No caso dos parâmetros ΔH e ΔS estes representam as forças ou tipo de ligação formada, os quais podem ser analisados da seguinte maneira, quando: ΔH e $\Delta S > 0$ predominam forças hidrofóbicas; ΔH e $\Delta S < 0$ predominam forças Van der Waals e ligação hidrogênio; $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ predominam forças eletrostáticas. A partir da

Equação 9 (item 3.2.3), foram construídos gráficos de Van't Hoff para os quatro complexos (Figura 81), e os parâmetros termodinâmicos foram obtidos, os quais estão apresentados na Tabela 17. Também se calculou a variação da energia livre de Gibbs por meio da Equação 10

Observa-se na Tabela 16, que os valores de ΔH e ΔS são positivos e nestas condições predominam forças hidrofóbicas. Os valores de ΔG indicam que a interação entre os complexos e a HSA é espontânea. O mesmo comportamento foi observado por Cacita, N e colaboradores no estudo da interação do complexo coordenado ao ligante óxido nítrico ($[Ru_3O(OAc)_6(3\text{-pic})_2(NO)]PF_6$) com a HSA (CACITA, N. et al.,2016).

Figura 771: Gráficos de Van't Hoff, HSA (10^{-6} M) dos complexos (1-5, A-E) em 1diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 31ºC e 37ºC)



Fonte: Autora.

Tabela 15: Parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos e a HSA para λ_{exc}= 280 nm

Complexos	ΔH (k J/mol)	ΔS (J/K mol)	T = 25ºC ΔG (k J/mol)	T = 31ºC ΔG (k J/mol)	T = 37ºC ΔG (k J/mol)
Complexo (1) dppn	174,6	750,7	-49,47	-52,52	-58,71
Complexo (2) dppz	132,1	612,2	-50,39	-53,70	-56,85
Complexo (3) dppzCH_3	75,1	426,5	-51,62	-55,01	-56,21
Complexo (4) dppzCl	116,9	574,4	-54,19	-57,61	-60,30
Complexo (5) phen	604,5	2162,2	-37,47	-55,51	-59,29

De maneira geral, os parâmetros termodinâmicos e o tipo de interação entre os complexos e a HSA dependem da natureza dos ligantes, ou seja, estes parâmetros se relacionam com a estrutura dos complexos.

3.3.2 Tempo de vida da HSA na presença dos complexos (1-5)

A investigação da interação dos complexos com a HSA por meio dos estudos de supressão de fluorescência mostrou que a interação está ocorrendo por meio dos mecanismos estático e dinâmico.

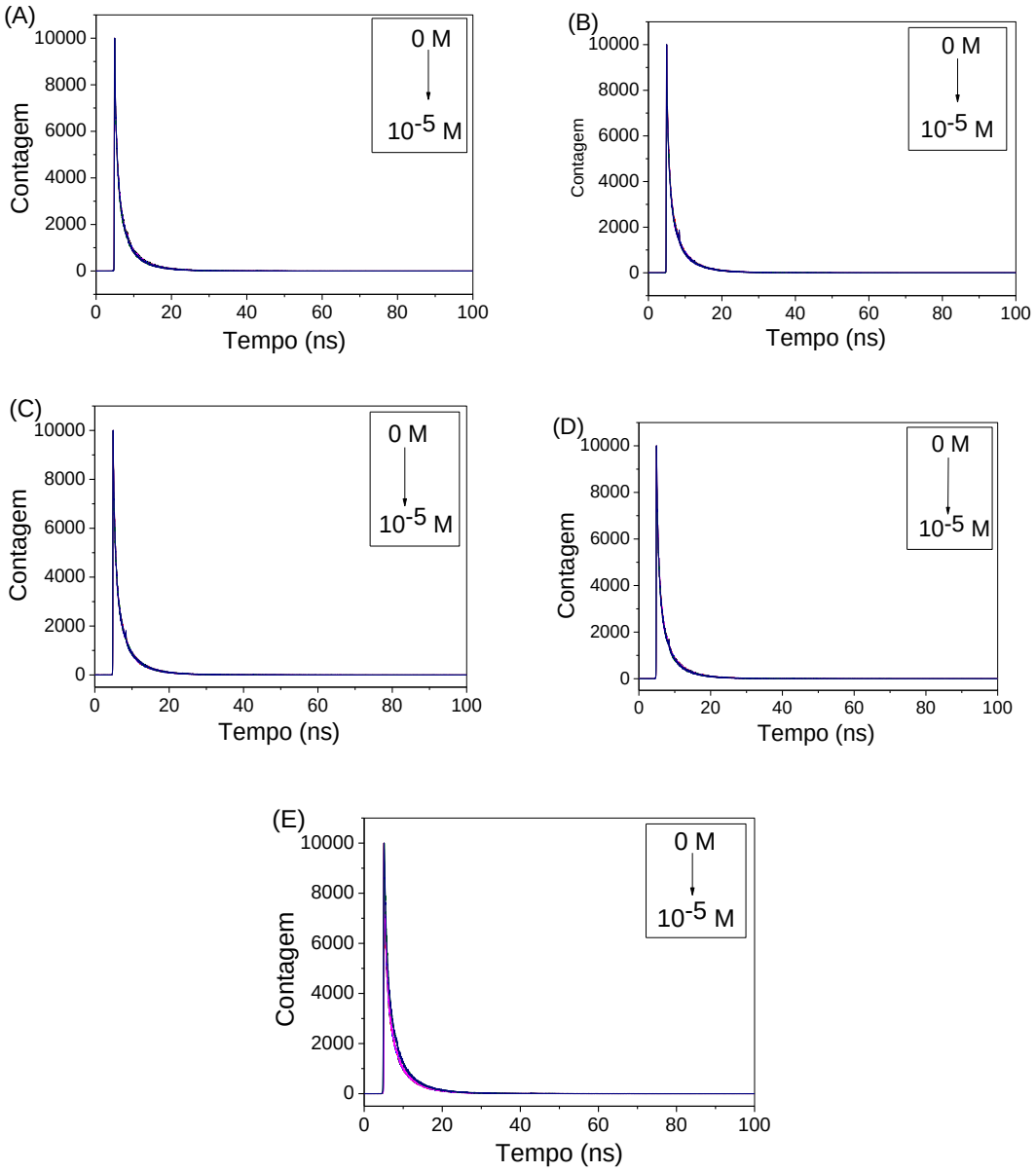
O tempo de vida da HSA no estado excitado é influenciado pela interação complexo-HSA. Como discutido anteriormente no mecanismo estático a interação supressor e fluoróforo ocorre no estado fundamental e desta forma ao variar a concentração do supressor o tempo de vida da HSA no estado excitado não varia (VALEUR, B.,2001; TAYEH, N et al.,2009). No caso do mecanismo de supressão dinâmico observa-se alteração no tempo de vida do estado excitado da HSA em função da variação da concentração do supressor, pois neste mecanismo a interação complexo-HSA ocorre no estado excitado.

A análise do tempo de vida da HSA no estado excitado foi realizada em diferentes temperaturas (25ºC, 31ºC e 37ºC) e mediante variação da concentração de

cada complexo. A excitação da HSA foi monitorada no comprimento de onda de 295 nm, com o intuito de garantir apenas a excitação do resíduo Trp-214 (VALEUR, B.,2001; TAYEH, N et al.,2009; SUN, J.,et al.,2015).

Na Figura 82, apresentam-se os gráficos com os perfis de decaimento da fluorescência da HSA na temperatura de 25ºC. Os gráficos nas temperaturas de 31ºC e 37ºC estão apresentados no **ANEXO XVIII.**

Figura 78: Perfil de decaimento da fluorescência da interação entre os complexos (1-5, A-E) e HSA, em tampão tris (pH=7,2), λ_{exc} = 295 nm, à 25 ºC



Fonte: Autora.

No caso das três temperaturas investigadas não foi observada nenhuma mudança significativa no tempo de vida da HSA com a variação da concentração dos complexos e com o aumento da temperatura. Desta forma, os resultados indicam a predominância do mecanismo estático na interação entre os complexos e a HSA (REIS, F.C.C.,2018).

3.3.3 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD): Análise conformacional da HSA

Como discutido anteriormente foi possível observar que os complexos **(1-5)** interagem com a HSA, desta forma para obter mais informações a respeito desta interação, monitorou-se a conformação da HSA por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica que permite estudar a conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições (FASMAN, G.D.,2013; HAVEL, H.A.,1996). O princípio da técnica está relacionado com a absorbância diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por cromóforos que apresentam quiralidade ou estão em ambientes quirais. A variação da absorbância está diretamente relacionada com o comprimento de onda, de acordo com a Equação 15.

$$\mathrm{CD} = \Delta\mathrm{A} = \mathrm{A}_{\mathrm{esquerda}} - \mathrm{A}_{\mathrm{direita}}$$

Equação 15

Onde: ΔA = variação da absorção da luz circulamemte polarizada;

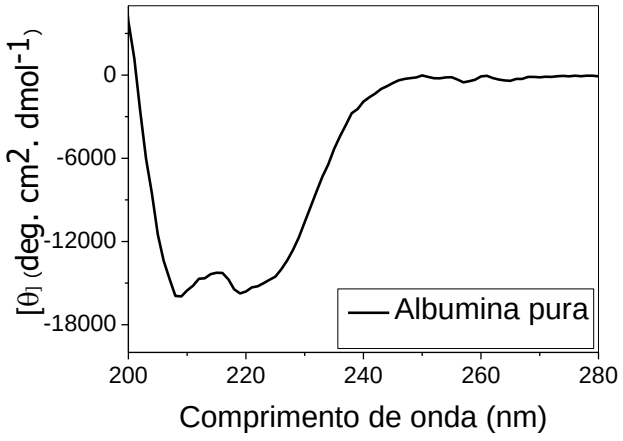
$A_{esquerda}$ = luz circulamente polarizada a esquerda

$A_{direita}$ = luz circulamente polarizada a direita

A região do ultravioleta do espectro CD é a mais explorada na investigação de estruturas proteicas principalmente devido à absorção dos grupos amidas das ligações peptídicas, pois apresentam centro opticamente ativo e caracterizam a estrutura secundária das proteínas (DA SILVEIRA, V.C et al.,2009).

A estrutura secundária da albumina é constituída por 67% de α-hélice, sendo o perfil espectral do CD caracterizado por duas bandas negativas, em 222 nm referente à transição n-π* e 208 nm atribuída a transição π-π* dos grupos amidas, Figura 83, DA SILVEIRA, V.C et al.,2009).

Figura 793: Espectros de absorção CD da HSA pura [1,0x10^{-6} M] em Tampão Tris-HCl pH 7,4 à temperatura ambiente



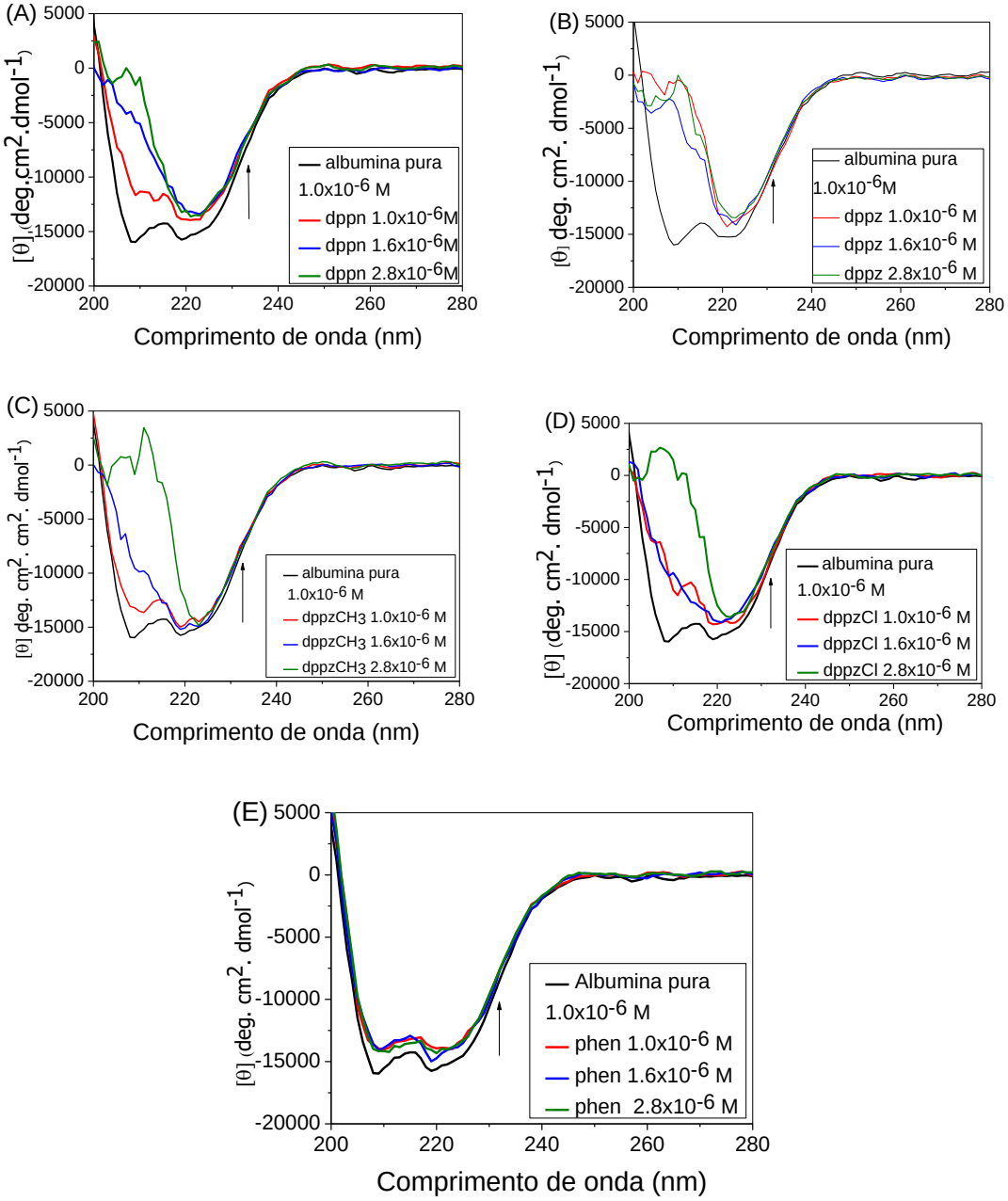
Fonte: Autora.

Os espectros de CD da HSA foram registrados na presença de diferentes concentrações dos complexos **(1-5)** e os espectros estão apresentados na Figura 85.

De acordo com o reportado na literatura a diminuição da intensidade das bandas da HSA, referentes às conformações α-hélice, é utilizada como medida da desnaturação proteica induzida pela interação dos compostos com a HSA (CARTER, D.C et al.,1994).

Como pode ser observado nos espectros apresentados na Figura 85, o perfil espectral da HSA sofre alteração significativa com o aumento da concentração dos complexos. Além do mais, observa-se maior alteração espectral para os complexos **(1-4)** que apresentam os ligantes bidentados com extensão da conjugação π.

Figura 804 Espectros de absorção CD da HSA [1,0x10^{-6} M] na presença dos complexos (1-5, A-E) em Tampão Tris-HCl pH 7,4 à temperatura ambiente



Fonte: Autora.

Desta forma, por meio da Equação 16, calculou-se a porcentagem de α-hélice presente na estrutura da HSA, após as sucessivas adições dos complexos **(1-5)**.

$$\%\alpha - \text{hélice} = \frac{\theta_{208} - 4000}{33000 - 4000} \text{x } 100$$

Equação 16

Onde:

θ_{208} = elipsidade molecular em 208 nm;

33000 = elipsidade para 100% da estrutura α-hélice;

4000= = elipsidade para 0% da estrutura α-hélice na proteína.

Na Tabela 17 apresentam-se as porcentagens de α-hélice após cada adição dos complexos **(1-5)**.

Tabela 16: Porcentagens calculadas de α - hélice da HSA, em diferentes concentrações dos complexos (1-5)

Complexos	% α- hélice Albumina pura	% α -hélice [1,0x10^{-6} M^{-1}]	% α- hélice [1,6x10^{-6} M^{-1}]	% α- hélice [2,8x10^{-6} M^{-1}]
Complexo (1) dppn	86,2%	60,0%	22,3%	3,35%
Complexo (2) dppz	86,2%	12,8%	12,3%	2,3%
Complexo (3) dppzCH_3	86,2%	73,7%	53,3%	23,3%
Complexo (4) dppzCl	86,2%	42,2%	50,3%	4,47%
Complexo (5) phen	86,2%	76,0%	76,0%	76,0%

Nos espectros de CD é possível observar que as alterações espectrais maiores ocorreram na região de 208 nm, contudo as pequenas variações nas bandas em 260 nm indicam que a interação dos complexos com a HSA também alteram a estrutura terciária da proteína (SJÖHOLM, I et al.,1972; LIU, Y et al.,2012; TRYNDA-LEMIESZ, L et al.,1999).

Com relação à porcentagem de α-hélice nota-se uma diminuição significativa com o aumento da concentração dos complexos.

Para os complexos com os ligantes dppn, dppz e dppzCl a porcentagem de α-hélice é menor do que 5%. Estes resultados indicam que os complexos alteram a estrutura secundária da HSA.

As modificações na estrutura da HSA foram investigadas para os carboxilatos trinucleares de rutênio com o ligante carbonil e neste caso não foi observada nenhuma alteração nos perfis espectrais da HSA na presença dos complexos. Isto reforça a tendência dos ligantes bidentados em induzir interações com biomoléculas (MOREIRA, M.B.,2016).

Em 2015, mudanças semelhantes nos perfis espectrais de CD da HSA foram observadas por Wei Su e colaboradores para o complexo de rutênio, Ru-TSC (HUANG, S et al.,2015). Neste caso os autores indicam que os complexos de rutênio interagem com a HSA e quebram as ligações hidrogênio no arcabouço hidrofóbico (HUANG, S et al.,2015).

Considerando esta significativa alteração espectral da HSA, bem como a magnitude dos valores das constantes de ligação dos complexos com a HSA (10^9 M^{-1}), é possível confirmar a tendência dos complexos **(1-5)** na interação com proteínas. Contudo, os resultados também indicam que apesar dos ligantes bidentados favorecerem a interação com o DNA, os valores das constantes de ligação obtidos foram menores do que o esperado para esta classe de complexos.

Nos experimentos de citotoxicidade foi possível observar a relevante toxicidade dos complexos contra as células tumorais (B16F10), o que indica que a presença de BSA no meio celular dos experimentos não afetou a disponibilidade dos complexos e consequentemente não influenciou significativamente na toxicidade. Este aspecto é importante, pois no meio celular há 10% de soro fetal bovino (BSA), o que poderia ser um fator limitante no efeito citotóxico dos complexos **(1-5)** uma vez que apresentam alta afinidade com proteínas.

4. Considerações Parciais

Os estudos prévios das propriedades biológicas dos novos carboxilatos trinuclares de rutênio **(1-5)** indicam que os complexos apresentam potencial citotóxico contra o modelo de célula tumoral (B16F10) estudado. Além do mais, não apresentam efeito citotóxico significativo contra o modelo de célula não tumoral (L929).

É importante destacar que a presença dos ligantes bidentados no arranjo estrutural dos carboxilatos trinucleares de rutênio, influenciou o aumento da citotoxicidade dos complexos desta classe.

Neste sentido, os complexos (**2-4**) que apresentam extensão da conjugação π e também os substituintes (CH_3 e Cl) nos ligantes bidentados apresentaram um efeito citotóxico maior, o que indica que a presença destes grupos bem como o aumento da hidrofobicidade dos complexos pode influenciar a atividade citotóxica dos complexos. O complexo **(4)** com o ligante dppzCl apresenta maior efeito citotóxico em relação aos outros complexos da série, com destaque para a redução da viabilidade celular de 62% na concentração de 2 μM.

Em relação à interação dos complexos com biomoméculas alvos, os resultados mostraram que os complexos interagem, mas não clivam o DNA sendo que outros mecanismos estão associados ao processo de interação cluster-DNA.

Apesar dos valores encontrados das constantes de ligação (cluster-DNA) menores do que o esperado, por meio dos ensaios de viscosidade foi possível confirmar que os ligantes bidentados apresentam um papel essencial no mecanismo de interação com o DNA. Foi observada a tendência dos complexos em intercalarem-se no DNA. O efeito observado indica que a interação eletrostática predomina nos complexos que apresentam ligantes menores (exemplo: phen) e o aumento da conjugação nos ligantes contribui com o efeito de intercalação (dppz>dppz-dppzCH_3-dppzCl).

Muitos estudos reportados na literatura indicam que estes ligantes da classe das fenazinas são excelentes intercaladores, neste sentido esperava-se obter valores altos de constantes de ligação cluster-DNA. Contudo, os resultados de interação dos complexos com o DNA mostraram que a presença destes ligantes não aumentou muito a interação com o DNA, cujas constantes de ligação apresentam valores baixos da ordem de 10^3 M^{-1}. Este efeito pode estar relacionado com o tamanho dos complexos **(1-5)**, ou seja, a nuclearidade da estrutura.

Embora o experimento de viscosidade tenha mostrado que a intercalação aumenta progressivamente com a extensão da conjugação π, (dppn>dppz>dppzCH_3>dppzCl>phen), esta não é a tendência observada para o efeito citotóxico. Isto sugere que o DNA não é o alvo principal para a atividade anticâncer dos complexos.

Os resultados obtidos com relação aos modos de interação dos complexos com a HSA reiteram a importância dos ligantes ortometalados no arranjo estrutural dos carboxilatos. Estes complexos apresentaram alta afinidade com a HSA quando comparado aos outros complexos análogos estudados em nosso grupo de pesquisa. Neste sentido, os resultados de CD mostraram que os complexos interagem com a estrutura secundária da HSA e as modificações estruturais ocorrem mesmo em concentrações micro molares dos complexos.

Os resultados de cunho biológico mostraram que os complexos sintetizados interagem com biomoléculas alvo, DNA e HSA, além de apresentarem citotoxicidade significativa contra o modelo de célula tumoral estudado. Os estudos de interação com biomoléculas alvo indicam que o DNA não é o principal alvo de interação dos complexos e que, portanto os complexos apresentam afinidade maior com a HSA o que indica a tendência destes complexos em interações com proteínas.

O fato dos complexos apresentarem maior citotoxicidade em relação aos ligantes livres, reforça a importância do processo de coordenação dos ligantes com o centro metálico. Outro aspecto interessante diz respeito aos significativos resultados de cunho biológico. A comparação dos resultados obtidos para os clusters **(1-5)** com outras séries de complexos investigados em nosso grupo de pesquisa e também reportados na literatura, indica claramente que o arranjo estrutural favoreceu a citotoxicidade e também interação dos complexos com biomoléculas alvo, sendo os resultados superiores aos que foram reportados anteriormente. Neste sentido, estudos futuros podem ser realizados para investigação da sublocalização e concentração dos complexos no meio celular.

Capítulo 5:

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os estudos conduzidos neste trabalho foi possível sintetizar e caracterizar uma nova série de carboxilatos trinucleares de rutênio com ligantes ortometalados. Além das propriedades eletrônicas, eletroquímicas e fotofísicas também se investigou as propriedades biológicas em modelo celular para avaliar a citotoxicidade dos complexos, bem como estudos de interação com biomoléculas alvo, DNA e HSA.

Os resultados das caracterizações indicam que os ligantes dppz **(2)**, dppzCH_3 **(3)**, dppzCl **(4)** bem como os precursores **(1-4)** foram sintetizados e obtidos com pureza adequada. Os valores de deslocamentos químicos obtidos para os ligantes **(2-4)**, por meio dos espectros de ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, COSY, HMQC, HMBC, confirmaram as estruturas propostas.

Os procedimentos sintéticos bem como os métodos de purificação foram adequados para a obtenção dos novos complexos **(1-5)**, os quais apresentam fórmula geral: $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(L)]PF_6$, (onde $\mathbf{L_1}$ = dppn, $\mathbf{L_2}$ = dppz, $\mathbf{L_3}$ = dppzCH_3, $\mathbf{L_4}$ = dppzCl, $\mathbf{L_5}$ = phen). Os resultados das análises elementares (C%, N%,H%) atestaram o grau de pureza dos complexos e desta forma foi possível conduzir experimentos biológicos para investigar as propriedades biológicas dos complexos.

Nos espectros de massas dos complexos **(1-5)** foi possível observar os valores da razão m/z que correspondem ao íon molecular intacto dos complexos na ausência do contra-íon PF_6, bem como confirmar a carga formal +1 dos complexos.

A partir dos resultados espectroscópicos pôde-se observar que a coordenação dos diferentes ligantes bidentados influencia pouco as propriedades eletrônica e eletroquímica dos complexos.

Por meio das análises de EPR, em baixas temperaturas (10 K), foi possível confirmar que os complexos **(1-5)** são paramagnéticos, apresentam 1 elétron desemparelhado e o perfil espectral isotrópico obtido para cada complexo confirma a deslocalização eletrônica que ocorre na unidade $[Ru_3O]^+$ como consequência da mistura orbital.

Os espectros de ^{1}H-RMN confirmaram a baixa simetria dos complexos **(1-5),** uma vez que foi possível atribuir cinco sinais diferentes para os prótons das metilas dos acetatos. O efeito do elétron desemparelhado também pode ser observado nos sinais dos hidrogênios dos ligantes, os quais aparecem extremamente deslocados em relação aos sinais dos ligantes livres.

Os complexos **(1-5)** apresentam isômeros ópticos e para os complexos **(3)** e **(4)** também foi possível observar a presença de isômeros, uma vez que os sinais dos

hidrogênios aparecem duplicados nos espectros de ^{1}H-RMN destes complexos, os quais apresentam os grupos substituintes CH_3 e Cl nos ligantes bidentados.

Com relação aos espectros eletrônicos não foi observado variação significativa nos valores de λ_{max} relacionados às transições IC e TCCL, o que indica que o arcabouço de orbitais π dos ligantes ortometalados apresenta pouca interação com os orbitais π presentes na unidade $[Ru_3O]^+$.

A coordenação dos grupos acetatos em ponte com os íons metálicos de rutênio foi confirmada por meio dos espectros de IV, sendo que foram observados os estiramentos simétricos v_s(COO) e v_{as}(COO) dos grupos acetatos, bem como os estiramentos dos ligantes coordenados na unidade $[Ru_3O]^n$. Para os complexos **(1-5)** não foi observada uma variação significativa nos valores das frequências de estiramentos dos acetatos, o que indica que a presença dos diferentes ligantes bidentados não influencia diretamente os modos de vibração dos grupos acetatos.

No caso dos complexos **(1-5)** observou-se três processos redox reversíveis ($[Ru_3O]^{+2/+1}$,$[Ru_3O]^{+1/0}$, $[Ru_3O]^{0/-1}$), os quais sofrem poucas variações em função das mudanças estruturais dos complexos, com os diferentes ligantes bidentados. Este efeito corrobora com os resultados obtidos por meio das técnicas de espectroscopia eletrônica e de infravermelho, no qual o ligante ortometalado influencia pouco nas propriedades eletrônicas da unidade $[Ru_3O]^n$.

Com a investigação preliminar das propriedades fotofísicas dos complexos foi possível obter os espectros de absorção das espécies dos complexos no estado excitado após a irradiação em 700 nm. A investigação prévia indicou que a presença dos ligantes bidentados nos complexos **(1-5)** não influencia a dinâmica dos estados excitados, bem como os tempos de decaimento. Estes resultados podem ser confirmados principalmente pela similaridade dos perfis espectrais obtidos para os complexos **(1-5)** e para o precursor **(4)**, o qual não apresenta o ligante bidentado coordenado. Nos espectros de transiente dos complexos foi possível observar a formação de novas bandas em região de maior energia e o descoramento da banda IC em 700 nm. Estudos futuros detalhados devem ser conduzidos para investigar as espécies envolvidas no estado excitado. Contudo, de acordo com estudos reportados na literatura, o surgimento das novas bandas (400 nm a 600 nm) sugere a formação de estados tripletos dos ligantes N-heterocíclicos no estado excitado. No caso do descoramento da transição IC em 700 nm, estudos de espectroeletroquímica indicam que o perfil espectral do transiente pode estar relacionado com a formação de um complexo reduzido no estado excitado. Para os

complexos oxidados ($[Ru_3O]^+$) as curvas cinéticas apresentaram um decaimento biexponencial com tempos de vida extremamente curtos da ordem de picossegundos (τ_1 = 0,39 ±0,06 ps e τ_2 = 12,4 ±3,7 ps). A investigação do espectro de transiente do complexo **(2)** reduzido indicou a formação de uma banda muito intensa na região de 400 nm a 600 nm e as curvas cinéticas apresentaram decaimento monoexponencial com tempos de vida curto e similares aos reportados para os dímeros de carboxilatos com carga formal 0. Os resultados obtidos estão de acordo com o apresentado anteriormente na literatura a respeito das propriedades fotofísicas dos carboxilatos em processos de transferência de elétrons intra e intermolecular, em sistemas de clusters e dímeros coordenados com porfirinas. Além do mais, os tempos de vida curtos desta classe de complexos refletem suas propriedades espectroscópicas, pois complexos deste tipo não emitem fluorescência e não podem ser aplicados como sensibilizadores para a produção de oxigênio singleto, mas apresentam um arranjo estrutural interessante para estudos de dinâmicas de reações de transferências de elétrons.

A investigação das propriedades biológicas dos complexos por meio dos estudos de citotoxicidade e de interação dos complexos com biomoléculas alvo indicaram que a presença dos ligantes bidentados na estrutura dos carboxilatos tem um papel importante que influencia as propriedades biológicas dos complexos.

A citotoxidade dos complexos **(1-5)** é maior com relação aos resultados obtidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa. A presença dos grupos substituintes nos ligantes também influenciou a citotoxidade dos complexos, sendo que esta observação reitera o que vem sendo discutido com relação ao efeito citotóxico dos complexos desta classe. A maior citotoxicidade foi observada para o complexo **(4)**, o qual apresenta o ligante dppzCl, sendo que estudos futuros podem ser conduzidos para avaliação do efeito de diferentes grupos substituintes na atividade anticâncer dos complexos.

Os resultados de interação dos complexos com o DNA, por meio de diferentes técnicas, mostraram que os complexos interagem com o DNA, sendo que interações eletrostáticas predominam em complexos com ligantes menores (phen) e o processo de intercalação passa a ser mais significativo à medida que a extensão π do ligante bidentado aumenta (dppn). Os valores das constantes de ligação ($K_b = 10^3\ M^{-1}$) obtidos para os complexos **(1-5)** são menores do que os valores observados para os complexos mononucleares de rutênio com os ligantes intercaladores, o que indica que a nuclearidade influencia as interações com o DNA.

No que diz respeito à interação dos complexos com a HSA, foi observada uma interação maior dos complexos com a proteína do que com o DNA. Este comportamento já havia sido observado anteriormente para uma classe de carboxilatos simétricos de fórmula geral $[Ru_3O(OAc)_6(L)_3]PF_6$, (L = ligantes azanaftalenos). No entanto, para os complexos **(1-5)** os valores das constantes indicam que a afinidade dos complexos com a HSA (K_b~10^9 M^{-1}) é ainda maior. Os resultados de dicroísmo mostraram que a interação com a HSA causa mudanças na conformação da estrutura secundária da HSA em concentrações micro molares dos complexos.

Com relação aos parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação dos complexos com o DNA e HSA, os valores de ($\Delta H>0$ e $\Delta S>0$) indicam que predominam interações de natureza hidrofóbica e $\Delta G<0$ indica a espontaneidade dos processos de interação.

De fato, os resultados indicam que o complexo que apresenta maior efeito de intercalação com o DNA (dppn) não é o responsável pela maior citotoxidade. Sendo que o complexo mais citotóxico (dppzCl) é o que também apresenta maior afinidade com a HSA. Com relação à investigação de alvos biológicos, estudos futuros podem ser conduzidos, todavia os resultados preliminares indicam que os complexos apresentam alta afinidade por proteínas.

Os estudos aqui realizados demonstraram claramente que a coordenação dos ligantes bidentados não influencia as propriedades eletrônicas e eletroquímicas da unidade $[Ru_3O]^n$, o que em termos estruturais indica que não há interações de natureza π que envolve os orbitais π dos ligantes ortometalados e da unidade $[Ru_3O]^n$. Por outro lado, a coordenação destes ligantes bidentados favoreceu as propriedades biológicas desta classe de complexos. Os resultados de citotoxicidade e de interação com biomoléculas alvo foram mais expressivos em relação aos outros carboxilatos investigados em nosso grupo de pesquisa.

6. Referências

ABE, M; MICHI, T; SATO, A; KONDO, T; ZHOU, W; UOSAKI, K; YE, S; SASAKI, Y. **Electrochemically Controlled Layer-by-Layer Deposition of Metal-Cluster Molecular Multilayers on Gold.** Angew. Chem. Int, 42, 2912 – 2915, 2003.

ABRAGAM, A; BLEANEY, B. **Electron Paramagnetic Resonance in Transition Ions**, Clarendon Press: Oxford, England, 1970.

AGUIRRE, J.D; ANGELES-BOZA, A.M; CHOUAI, A; PELLOIS, J.P; TURRO, C; DUNBAR, K.R. **Live cell cytotoxicity studies: documentation of the interactions of antitumor active dirhodium compounds with nuclear DNA**. Journal of the American Chemical Society, 131(32), 11353-11360, 2009.

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, 12, 1549-1560, 2017.

ALBANI, B.A; PEÑA, B; LEED, N. A; DE PAULA, N.A; PAVANI, C; BAPTISTA, M.S; TURRO, C. **Marked improvement in photoinduced cell death by a new tris-heteroleptic complex with dual action: singlet oxygen sensitization and ligand dissociation.** Journal of the American Chemical Society, 136(49), 17095-17101, 2014.

ALLARDYCE, C.S; DYSON, P.J**. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects**. Platinum Metals Review, 45(2), 62-69, 2001.

ALMOG, O; BINO, A & GARFINKEL-SHWEKY, D**. The structure of oxo-bridged trinuclear ruthenium and iridium hexacarboxylates.** Inorganica chimica acta, 213(1-2), 99-102, 1993.

AMARAL, M.F.Z.J; BAUMGARTNER, A.A; VESSECCHI, R; CLOSOSKI, G. C. **Directed metalation of 1-ester-substituted indolizines: base/electrophile-controlled regioselective functionalization** Org. Lett, 2015.

ANGELES-BOZA, A.M; BRADLEY, P.M; FU, P.K.L; WICKE, S.E; BACSA, J; DUNBAR, K.R; TURRO, C**. DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium (II) dppz complexes: correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity**. Inorganic chemistry, 43(26), 8510-8519, 2004.

ARMAREGO, W.L.F; LI LIN CHAI, C. **Purification of Laboratory Chemicals**, Sixth Edition, 2009.

ARORA, K; HERROON, M; AL-AFYOUNI, M.H; TOUPIN, N.P; ROHRABAUGH JR, T.N; LOFTUS, L.M; PODGORSKI, I; TURRO, C AND KODANKO, J.J.**Catch and Release Photosensitizers: Combining Dual-Action Ruthenium Complexes with Protease Inactivation for Targeting Invasive Cancers.** Journal of the American Chemical Society, 140(43), pp.14367-14380, 2018.

ATKINS. P.W; DE PAULA, J. **Elements of Physical Chemistry**, 4thed.Oxford University Press, UK. 2005:170-2.

BARONE, G; TERENZI, A; LAURIA, A; ALMERICO, A.M; LEAL, J.M; BUSTO, N;GARCIA, B. **DNA-binding of nickel (II), copper (II) and zinc (II) complexes: Structure–affinity relationships**. Coordination Chemistry Reviews, 257(19-20), 2848-2862, 2013.

BARRA, C.V; NETTO, A.V. **Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores**. Revista Virtual de Química, 7(6), 1998-2016, 2015.

BARREIRO, E. J; KÜMMERLE, A.E; FRAGA, C.A. **The methylation effect in medicinal chemistry**. **Chemical reviews**, 111, 9, 5215-5246, 2011.

BATISTA, J.H.C.; SANTOS, F.M.DOS; BOZZINI, L.A; VESSECCHI, R; OLIVEIRA, A.R.M.; CLOSOSKI, G.C. **Directed Functionalization of Halophenyl-2-oxazolines with TMPMgCl-LiCl.European** J. Org. Chem. (5), 967–977, 2015.

BENESI, H.A; HILDEBRAND, J.H.A. **Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine With Aromatic Hydrocarbons**. Journal of the American Chemical Society, 71, 8, 2703–2707, 1949.

BERERA, R; VAN GRONDELLE, R; KENNIS, J.T. **Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems**. Photosynthesis research, 101(2-3), 105-118, 2009.

BERRIDGE, M.V; TAN, A.S. **Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction**. Archives of biochemistry and biophysics, 303, 2, 474-482, 1993.

BERTINI, C.L. **NMR of paramagnetic substances**. Coord Chem Review, 150, Elsevier, 1996.

BERTRAND, B; FERNANDEZ-CESTAU, J; ANGULO, J; COMINETTI, M. M; WALLER, Z.A; SEARCEY, M & BOCHMANN, M. **Cytotoxicity of pyrazine-based cyclometalated (CNpzC) Au (III) carbene complexes: impact of the nature of the ancillary ligand on the biological properties.** Inorganic chemistry, *56*(10), 5728-5740, 2017.

BIJARI, N; SHOKOOHINIA, Y; ASHRAFI-KOOSHK, M.R; RANJBAR, S; PARVANEH, S; MOIENI-ARYA, M & KHODARAHMI, R. **Spectroscopic study of interaction between osthole and human serum albumin: Identification of possible binding site of the compound.** Journal of Luminescence, 143, 328-336, 2013.

BINETIN, S AND DEVILLERS, J. **QSAR for organic chemical sorption in soils and sediments**. Chemosphere,28(6),1171-1188, 1994.

BONINI, M.G; RADI, R; FERRER-SUETA, G; FERREIRA, A.M.D.C & AUGUSTO, O**. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide.** Journal of Biological Chemistry, 274(16), 10802-10806, 1999.

BRODIE, C.R; COLLINS, J.G & ALDRICH-WRIGHT, J.R. **DNA binding and biological activity of some platinum (II) intercalating compounds containing methyl-substituted 1, 10-phenanthrolines.** Dalton Transactions, (8), 1145-1152, 2004.

BUTSCH, K; GUST, R; KLEIN, A; OTT, I AND ROMANSKI, M. **Tuning the electronic properties of dppz-ligands and their palladium (II) complexes**. Dalton Transactions, 39(18),4331-4340, 2010.

CACITA, N; NIKOLAOU, S. **Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching.** Journal of Luminescence. 169, 115–120, 2016.

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**, 429,114-121, 2015.

CALLADINE, C.R; DREW, H. **Understanding DNA: the molecule and how is works**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 352 ,2004.

ČANOVIĆ, P; SIMOVIĆ, A.R; RADISAVLJEVIĆ, S; BRATSOS, I; DEMITRI, N; MITROVIĆ, M; ZELEN, I; BUGARČIĆ, Z.D. **Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity**. JBIC, J. Biol. Inorg. Chem., 22, 1007−1028, 2017.

CANNON, R.D & WHITE, R.P.**Chemical and physical properties of triangular bridged metal complexes.** Progress in inorganic chemistry, 195-298, 1988.

CARAMORI, G.F; DE OLIVEIRA, K.T; **Aromaticidade–evolução histórica do conceito e critérios quantitativos**.Quim. Nova, 32(7), 1871-1884, 2009.

CARNEIRO, Z.A; BIAZZOTTO, J.C; ALEXIOU, A.D.P; NIKOLAOU, S**. Nitric oxide photorelease from a trinuclear ruthenium nitrosyl complex and its in vitro cytotoxicity against melanoma cells**. Journal of Inorganic Biochemistry. 134, 36-38, 2014.

CARTER, D.C; HO, J.X. **Structure of serum albumin.** In Advances in protein chemistry. 45, 153-203, Academic Press, 1994.

CARTER, M.T; RODRIGUEZ, M; BARD, A.J. **Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt (III) and iron (II) with 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine.** Journal of the American Chemical Society, 111(24), 8901-8911, 1989.

CASASNOVAS, R; ORTEGA-CASTRO, J; FRAU, J; DONOSO, J; MUÑOZ, F. INT. J. **Theoretical pK_a calculations with continuum model solvents, alternative protocols to thermodynamic cycles.** Quantum Chem, 114 (20), 1350–1363, 2014.

CERCHIARO, G; SANT'ANA, A.C; TEMPERINI, M.L.A & DA COSTA FERREIRA, A.M. **Investigations of different carbohydrate anomers in copper (II) complexes with D-glucose, D-fructose, and D-galactose by Raman and EPR spectroscopy.** Carbohydrate research, 340(15), 2352-2359, 2005.

CHABNER, B.A; ROBERTS JR, T.G. **Chemotherapy and the war on cancer.** Nature Reviews Cancer, 5(1), 65.,2005.

CHEN, J; ZHANG, X; ZHANG, L; SHI,L; CHEN, Z. **Syntheses and Characterization of Oxo-Centered Triruthenium Compounds with Orthometalated Bipyridine**. Inorganic Chemistry. 44, 4, 2005.

CHEN, Z; DAI, F. **Oxo-Centered Triruthenium-Acetate Cluster Complexes Derived from Axial or Bridging Ligand Substitution.** Structure and bonding. Springer-Verlag Berlin Heidelberg , 93, 2009.

CLAYDEN, J; GREEVES, N; WARREN, S; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**, Oxford, July, 2000.

COTTON, F.A; NORMAN, J.G; SPENCER, A and WILKINSON, G**. Oxotriruthenium cluster complexes**. Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications, 16, 967-968, 1971.

CUNHA, C.J et al. **"Spectroelectrochemical behaviour of the trinuclear [$Ru_3O(O_2CCH_3)_6$(isonicotinamide)$_3$] cluster."** Canadian journal of chemistry 67.10 : 1632-1635, 1989.

CUNHA, C.J. **Correlações Espectroscópicas e Eletroquímicas em Clusters Trigonais de Rutênio com Ligantes N-heterocíclicos**, Universidade de São Paulo, 1989.

DAI, F.R et al. **Syntheses, characterization and redox properties of oxo-centred triruthenium cluster dimers and trimers linked by ortho-metallated polypyridyl ligands.** Dalton Transactions 11 : 1492-1502, 2008.

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, (14), 2306-2316, 2011.

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

DA SILVEIRA, V.C; CARAMORI, G.F; ABBOTT, M.P; GONÇALVES, M.B; PETRILLI, H.M & DA COSTA FERREIRA, A.M. **Oxindole-Schiff base copper (II)**

complexes interactions with human serum albumin: Spectroscopic, oxidative damage, and computational studies. Journal of inorganic biochemistry, 103(10), 1331-1341, 2009.

DAVIS, S; DRAGO, R.S. **Synthesis, characterization, and oxidation catalysis by a novel (μ_3-oxo) triruthenium carboxylate complex.** Inorganic Chemistry, 27(26), 4759-4760, 1988.

DE OLIVEIRA, A.R.M; MARQUELE-OLIVEIRA, F; DE SANTANA, D.C.A.S; NIKOLAOU, S; BONATO, P.S & DA SILVA, R.S. **HPLC separation, NMR and QTOF/MS/MS structure elucidation of a prominent nitric oxide donor agent based on an isomeric composition of a nitrosyl ruthenium complex**. Inorganic Chemistry Communications, 12, 5, 343-346, 2009.

DELUCIA. R; FILHO-OLIVEIRA. M.R et al. **Farmacologia Integrada**. 3 ed. [S.l.]: Revinter Ltda, 5, 2007.

DEVITA, V.T; CHU, E. A **history of cancer chemotherapy.** Cancer research, 68(21), 8643-8653, 2008.

DICKESON, J.E; SUMMERS, L.A. **Derivatives of 1, 10-Phenanthroline-5, 6-quinone.** Australian Journal of Chemistry, 23(5),1023-1027, 1970.

DOS SANTOS, F.M; BATISTA, J.H; VESSECCHI, R AND CLOSOSKI, G.C. **Directed Functionalization of Cyano-Substituted Furans and Thiophenes with TMPMgCl· LiCl.** Synlett, 26(20), 2795-2800, 2015.

DWYER, F.P. et al. **Biological activity of complex ions.** Nature, 170, 190-191,1952.

EFTNIK, M.R. **Fluorescence quenching reactions: probing biological macromolecular structures. In: Dewey, T. G. (Ed.) Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy.** Plenum Press, EUA, 1-41, 1991.

ELERT, G.**The physics hypertextbook**. Found July, 9, 2008.

ENOMOTO, K; LAVERNE, J.A; SEKI, S & TAGAWA, S. **Formation and decay of the triplet excited state of pyridine**. The Journal of Physical Chemistry A, 110(32), 9874-9879, 2006.

ERIKSSON, M; MEHMEDOVIC, M; WESTMAN, G; ÅKERMAN, B. **Time-resolved electrophoretic analysis of mobility shifts for dissociating DNA ligands.** Electrophoresis, 26(3), 524-532, 2005.

ESPÓSITO, B.P AND NAJJAR, R. **Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin**. Coordination Chemistry Reviews, 232(1-2),137-149, 2002.

FANALI, G; DI MASI, A; TREZZA, V; MARINO, M; FASANO, M; ASCENZI, P. **Human serum albumin: From bench to bedside.** Mol. Aspects Med. 33, 209−90, 2012.

FASMAN, G.D. (Ed.). **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules.** Springer Science & Business Media, 2013.

FDA: Food and Drug Administration
https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=glossary.page/
Acesso Jan 2019.

FEES, J; KAIM, W; MOSCHEROSCH, M; MATHEIS, W; KLIMA, J; KREJCIK, M AND ZALIS, S. **Electronic structure of the molecular light switch [Ru(bpy)$_2$(dppz)]$^{2+}$**. Inorganic chemistry, 32(2),166-174, 1993.

FELD, J.D; HSU, T; ECKERMANN, A.L; MEADE, T.J. **Trinuclear Ruthenium Clusters as Bivalent Electrochemical Probes for Ligand-Receptor Binding Interactions.** Langmuir, 10; 28, 1 939–949, 2012**.**

FRICKER, S.P. **Metal based drugs: from serendipity to design**. Dalton Transactions, 43, p. 4903-491,2007.

FUERTES, M.A; ALONSO, C; PEREZ, J.M. **Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance.** Chem. Rev., 103,645-662, 2003.

FOXON, S.P; ALAMIRY, M.A; WALKER, M.G., MEIJER, A.J; SAZANOVICH, I.V; WEINSTEIN, J.A & THOMAS, J.A. **Photophysical properties and singlet oxygen production by ruthenium (II) complexes of benzo [i] dipyrido [3, 2-a: 2′, 3′-c] phenazine: spectroscopic and TD-DFT study**. The Journal of Physical Chemistry A, 113(46), 12754-12762, 2009.

FOXON, S.P; GREEN, C; WALKER, M.G; WRAGG, A; ADAMS, H; WEINSTEIN, J.A; PARKER, S.C; MEIJER, A.J AND 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, 51(1),463-471, 2011.

FRICKER, S.P. **Metal based drugs: from serendipity to design**. Dalton Transactions, 43,4903-491,2007.

FU, P.K.L; BRADLEY, P.M; VAN LOYEN, D; DÜRR, H; BOSSMANN, S.H; TURRO, C. **DNA Photocleavage by a Supramolecular Ru (II)−Viologen Complex.** Inorganic chemistry, 41(15), 3808-3810, 2002.

GANOT, N; MEKER, S; REYTMAN, L; TZUBERY, A & TSHUVA, E**. Anticancer metal complexes: synthesis and cytotoxicity evaluation by the MTT assay.** Journal of visualized experiments: Jove, (81), 2013.

GAO, F; CHAO, H; ZHOU, F; CHEN, X; WEI, Y.F; JI, L.N. **Synthesis, GC selective DNA binding and topoisomerase II inhibition activities of ruthenium (II) polypyridyl complex containing 11-aminopteridino [6, 7-f][1, 10] phenanthrolin-13 (12H)-one.** Journal of inorganic biochemistry, 102(5-6), 1050-1059, 2008.

GLOVER, S.D; GOELTZ, B.J; LEAR, B.J; KUBIAK, C.P. **Inter- or intramolecular electron transfer between triruthenium clusters: we'll cross that bridge when we come to it.** Coordination Chemistry Reviews, 254, 331-345, 2010.

GONÇALVES, P.J. **Estudos das características fotofísicas da porfirina mesotetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB.** Tese (Doutorado), Ribeirão Preto, SP: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 133, 2006.

HARTSHORN, R.M; BARTON, J.K. **Novel dipyridophenazine complexes of ruthenium (II): exploring luminescent reporters of DNA**. Journal of the American Chemical Society, 114(15), 5919-5925, 1992.

HAVEL, H.A. **Spectroscopic methods for determining protein structure in solution**, 1996.

HENDERSON, J; GLOVER, S.D; LEAR, B.J; WALKER, D; WINKLER, J.R; GRAY, H.B AND KUBIAK, C.P. **Electron-Transfer Reactions of Electronically Excited Zinc Tetraphenylporphyrin with Multinuclear Ruthenium Complexes**. The Journal of Physical Chemistry B, 119, 24, 7473-7479, 2014.

HENDERSON, J; KUBIAK, C. P. **Photoinduced mixed valency in zinc porphyrin dimer of triruthenium cluster dyads.** Inorganic chemistry, 53(20), 11298-11306, 2014.

HITRIK, M; DANDAPAT, A; SASSON, Y. **A new mechanism for allylic alcohol isomerization involving ruthenium nanoparticles as a 'true catalyst'generated through the self-assembly of supramolecular triruthenium clusters**. RSC Advances, 6(72), 68041-68048, 2016.

HOLMLIN, R.E; STEMP, E; BARTON, J. K. **[Ru(phen)$_2$dppz)]$^{2+}$ luminescence: Dependence on DNA sequences and groove-binding agents.** Inorganic chemistry 37.1, 29-34, 1998.

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

HUANG, S; ZHU, F; QIAN, Q; XIAO, Q AND SU, W.**Thermodynamic investigation of interaction between [(η_6-p-cymene) Ru^{II} (acetone-N$_4$-phenylthiosemicarbazone) Cl] Cl anticancer drug and human serum albumin: spectroscopic and electrochemical studies**. Biological trace element research, 164(1),150-161, 2015.

HUDSON, A; KENNEDY, M.J. **An electron resonance study of some low-spin d 5 complexes of second-and third-row transition metals.** Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical,1116-1120, 1969.

HUDSON, B.P; DUPUREUR, C.M & BARTON, J.K. **^{1}H NMR Structural Evidence for the Sequence-Specific Design of an Intercalator:. DELTA.-.alpha.-[Rh[(R,R)-**

Me_2trien] phi]$^{3+}$ Bound to d (GAGTGCACTC)$_2$. Journal of the American Chemical Society, 117(36), 9379-9380, 1995.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA). **Estimativa - 2016: Incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: < https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer > Acesso em 22 de janeiro de 2019.

ITOU, M; OTAKE, M; ARAKI, Y; ITO, O & KIDO, H.**Control of Electron Acceptor Ability with Ligands (L) in Photoinduced Electron Transfer from Zinc Porphyrin or Zinc Phthalocyanine to [$Ru_3(\mu_3$-O)(μ-$CH_3COO)_6L_3]^+$.** Inorganic chemistry, 44(5), 1580-1587, 2005.

JODRELL, D.I; EVANS, T.R.J; STEWARD, W; CAMERON, D; PRENDIVILLE, J; ASCHELE, C; CAMBONI, G.**Phase II studies of BBR3464, a novel tri-nuclear platinum complex, in patients with gastric or gastro-oesophageal adenocarcinoma**. European Journal of Cancer, 40(12), 1872-1877, 2004.

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

KAPITZA, S; PONGRATZ, M; JAKUPEC, M.A; HEFFETER, P; BERGER, W; LACKINGER, L; KEPPLER, B.K AND MARIAN, B**. Heterocyclic complexes of ruthenium (III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells**. Journal of cancer research and clinical oncology, 131(2), 101-110, 2005.

KUWANA, T; DARLINGTON, R. K & LEEDY, D.W**. Electrochemical Studies Using Conducting Glass Indicator Electrodes.** Analytical Chemistry, 36(10), 2023-2025, 1964.

KEPPLER, B.K AND W, RUPP. "**Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III)**." Journal of cancer research and clinical oncology 111.2, 166-168, 1986.

KHULBE, K.C; ISMAIL, A.F; MATSUURA, T.**Chapter 3 - Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy.** Membrane Characterization, 31-46, 2017.

KNOX, R.J; FRIEDLOS, F; LYDALL, D.A; ROBERTS, J.J. **Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-diammine-(1, 1-cyclobutanedicarboxylato) platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA**. Cancer research, 46(4 Part 2), 1972-1979, 1986.

KOMOR, A.C; BARTON, J.K. **The path for metal complexes to a DNA target**. Chemical communications, 49(35),3617-3630, 2013.

KR, S.G; MATHEW, B.B; SUDHAMANI, C.N; NAIK, H.B**. Mechanism of DNA binding and cleavage**. Biomedicine, 2(1), 1-9, 2014.

KUBIAK, C.P. **Inorganic Electron Transfer: Sharpening a Fuzzy Border in Mixed Valency and Extending Mixed Valency across Supramolecular** Systems Inorganic Chemistry, 52, 5663-5676, 2013.

KUNTZ JR, I.D; GASPARRO, F.P; JOHNSTON JR, M.D & TAYLOR, R.P. **Molecular interactions and the Benesi-Hildebrand equation.** Journal of the American Chemical Society, 90(18), 4778-4781, 1968.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**, Third Edition, 2006.

LERMAN, L.S. **Structural considerations in the interaction of DNA and acridines.** Journal of molecular biology, 3(1), 18-14, 1961.

LIAO, G; YE, Z; LIU, Y; FU, B; FU, C. **Octahedral ruthenium (II) polypyridyl complexes as antimicrobial agents against mycobacterium**. Peer J, 5, 3252, 2017.

LIU, H.K; SADLER, P.J. **Metal complexes as DNA intercalators.** Accounts of Chemical Research, 44(5), 349-359,2011.

LIU, M; LIM, J.Z; GWE, Y; LEVINA, A; LAY, P.A**. Characterization of a Ruthenium(III)/NAMI-A Adduct with Bovine Serum Albumin that Exhibits a High Anti-Metastatic Activity**. Angew Chem. Int.49, 1661 –1664, 2010.

LIU, Y;YU, Q; WANG, C; SUN, D; HUANG, Y; ZHOU, Y & LIU, J. **Ruthenium (II) complexes binding to human serum albumin and inducing apoptosis of tumor cells.** Inorganic Chemistry Communications, 24, 104 – 109, 2012.

LOUDON, M; STOWELL, J.G. **Organic Chemistry,** 5, 19, Janeiro, 2009.

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, 130(4), 1163-1170, 2008.

MARTIN, F.S. **A basic trinuclear ruthenium acetate.** J. Chem. Soc. (Resumed), 2682-2684, 507, 1952.

MERLINO, A**. Interactions between proteins and Ru compounds of medicinal interest: A structural perspective**. Coordination Chemistry Reviews, 326, 111-134, 2016.

MESSORI, L; ORIOLI, P;VULLO, D; ALESSIO, E; LENGO, E. **A spectroscopic study of the reaction of NAMI, a novel ruthenium(III)anti-neoplastic complex, with bovine serum albumin.** European Journal of Biochemistry, 267, 1206-1213, 2000.

MESTRONI, G; ZASSINOVICH, G; ALESSIO, E; BOMTEMPI, A. **Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents.** Inorganic Chim Acta. 137, 63, 1987.

MIRANDA, F.S. **Desenvolvimento e estudo teórico de novos ligantes derivados da 1,10-fenantrolina e seus complexos de ferro(II).** Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2008.

MIRANDA, F.S; SIGNORI, A.M; VICENTE, J; DE SOUZA, B; PRIEBE, J.P; SZPOGANICZ, B; GONÇALVES, N.S AND NEVES, A. **Synthesis of substituted dipyrido[3,2-a:20,30-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrido[3,2-f:20,30-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxaline.** Tetrahedron 64 5410–5415, 2008.

MJOS, K.D; ORVIG, C. **Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry.** Chemical reviews, 114(8), 4540-4563, 2014.

MOND, A.W (the late). **The Acetates of Ruthenium.** J. Chem. Soc.1247-1249, 1930.

MONRO, S; COLÓN, K.L; YIN, H; ROQUE III, J; KONDA, P; GUJAR, S & MCFARLAND, S.A. **Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: Challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433**. Chemical reviews, 2018.

MORETTO, J; CHAUFFERT, B; GHIRINGHELLI, F; ALDRICH-WRIGHT, J.R & BOUYER, F. **Discrepancy between in vitro and in vivo antitumor effect of a new platinum(II) metallointercalador.** Investigation New Drugs, 29, 1164-1176, 2011.

MOREIRA, M.B; DA SILVA, C.F.C; PESCI, R.B; DEFLON, V.M AND NIKOLAOU, S**. Revisiting oxo-centered carbonyl-triruthenium clusters: investigating CO photorelease and some spectroscopic and electrochemical correlations.** Dalton Transactions, 45(42),16799-16809, 2016.

MORITA, T; ASSUMPÇÃO, M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes; padronização, preparação, purificação**. Edgard Blucher, 1976.

MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. J. Immuno. Methods, 65,1-2, 55-63, 1983.

MUDASIR; YOSHIOKA, N; INOUE, H. **DNA binding of iron(II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline.** Journal of Inorganic Biochemistry 77, 239–247, 1999.

NAIR, R.B; TENG, E.S; KIRKLAND, S.L & MURPHY, C.J. **Synthesis and DNA-binding properties of $[Ru(NH_3)_4dppz]^{2+}$.** Inorganic chemistry, 37(1), 139-141, 1998.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.** 5th ed. John Wiley & Sons INC, 1997.

NAVARRO, M; CISNEROS-FAJARDO, E.J; FERNANDEZ-MESTRE, M; ARRIECHE, D; MARCHAN, E. **Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against Leishmania mexicana of $[Cu(dppz)_2]BF_4$**. Journal of Inorganic Biochemistry, 97, 4, 364-369, 2003.

NDAGI, U; MHLONGO, N; SOLIMAN, M.E. **Metal complexes in cancer therapy– an update from drug design perspective.** Drug design, development and therapy, 11, 599, 2017.

NEVES, A.P; VARGAS, M.D. **Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer** Rev. Virtual Quim, 3, 3, 196-209. Data de publicação na Web: 5 de setembro de 2011. Disponível em: http://www.uff.br/rvq

NUNES, S.G. **Catálise oxidativa de clusters de rutênio e porfirinas supramoleculares.** Tese de Doutorado, USP-SP, 2005.

NIKOLAOU, S; DA SILVA, C.F.N. **Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio**. Quim. nova, 41(7), 833-838, 2018.

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

NIKOLAOU, S; TOMA, H.E. **A Convergent Approach for the Generation of Dendrimers Containing the [$Ru_3O(CH_3COO)_6$] Electroactive Core**. European Journal of Inorganic Chemistry, 2266-2271, 2008.

OLDHAM, C. **Complexes of simple carboxylic acids**. Prog. Inorg. Chem, 10, 223-258, 1968.

ORVIG, C AND ABRAMS, M.J. **Medicinal inorganic chemistry: introduction**. Chemical Reviews, 99(9), 2201-2204, 1999.

PACOR, S; SAVA, G; CESCHIA, V; BREGANT, F; MESTRONI, G AND ALESSIO, E. **Antineoplastic effects of mer-trichlorobisdimethylsulphoxideaminorutheniumIII against murine tumors: comparison with cisplatin and with ImH [$RuIm_2Cl_4$]**. Chemico-biological interactions, 78(2), 223-234, 1991.

PAGES, B.J; GARBUTCHEON-SINGH, K.B; ALDRICH-WRIGHT, J.R. **Platinum intercalators of DNA as anticancer agents.** European Journal of Inorganic Chemistry,(12), 1613-1624, 2017.

PARRA, G.G. **Estudo da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano nitrofurantoína e da formação de espécies ativas durante sua fototransformação**. Dissertação de Mestrado – DFM- FFCLRP - USP - 2010.

PASETTO, L.M; D'ANDREA, M.R; BRANDES, A.A; ROSSI, E AND MONFARDINI, S. **The development of platinum compounds and their possible combination**. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 60(1), 59-75, 2006.

PASTUSZKO, A; MAJCHRZAK, K; CZYZ, M; KUPCEWICZ, B & BUDZISZ, E. **The synthesis, lipophilicity and cytotoxic effects of new ruthenium (II) arene complexes with chromone derivatives**. Journal of inorganic biochemistry, 159, 133-141, 2016.

PAVAN, F.R; POELHSITZ, G.VON; LEITE, S. R; BATISTA, A. A; DEFLON, V. M; LEITE, C. Q. **Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents.** European journal of medicinal chemistry, 45, 2, 598–601, 2010.

PAVIA, DONALD et al. **Introduction to Spectroscopy**. Brooks Cole, 4, 2008.

PETERSSON, J; HENDERSON, J; BROWN, A; HAMMARSTRÖM, L & KUBIAK, C.P. **Time-resolved electron transfer in porphyrin-coordinated ruthenium dimers: from mixed-valence dynamics to hot electron transfer.** The Journal of Physical Chemistry C, 119(9), 4479-4487, 2015.

PETERS, T.Jr. **All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Aplications.** Elsevier Inc, 1995.

PORTER, G; NORRISH, W.G.R. **Chemical Reactions Produced by very high light Intensities.** Nature, October, 15, 164, 1949.

POSSATO, B; CARNEIRO, Z.A; DE ALBUQUERQUE, S AND NIKOLAOU, S. New uses for old complexes. **The very first report on the trypanocidal activity of symmetric trinuclear ruthenium complexes.** Journal of inorganic biochemistry, 176, 156-158, 2017.

POSSATO, B; DEFLON, V.M; NAAL, Z; FORMIGA, A.L AND NIKOLAOU, S. **An extended π-system and enhanced electronic delocalization on symmetric $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_3]^n$ complexes combined with azanaphthalene ligands.** Dalton Transactions, 46, 24, 7926-7938, 2017.

PubChem DRUGBANK: https://www.drugbank.ca/drugs/DB02365. Acesso 08/05/2017.

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

RANG, H.P; DALE, M.M; FLOWER R.J; **Farmacologia,** 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 14-42, 2007.

RAO, C.N; FERRARO, J.R. **Spectroscopy in Inorganic Chemistry**. Volume II, Academic Press, New York and London, 1971.

RHODES, C.J. **Electron Spin Resonance Spectroscopy: Principles and Instrumentation**, Encyclopedia of Analytical Science, 332-337, 2005.

RIXE, O; ORTUZAR, W; ALVAREZ, M; PARKER, R; REED, E; PAULL, K & FOJO, T. **Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel.** Biochemical pharmacology, 52(12), 1855-1865, 1996.

ROBIN, M.B; DAY, P. Mixed valence chemistry-a survey and classification. **In: Advances in inorganic chemistry and radiochemistry**. Academic Press, 247-422, 1968.

ROCHA, R.C; TOMA, H.E. **Transferência de elétrons em sistemas inorgânicos de valência mista**. Química Nova, 25, 4, 624-638, 2002.

ROSENBERG, B; VANCAMP, L; KRIGAS, T. **Inhibition of cell division in *Escheria coli* by electrolysis products from a platinum electrode**. Nature. 205, 698, 1965.

ROSS, P.D; SUBRAMANIAN, S**. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability**. Biochemistry, 20(11), 3096-3102, 1981.

SALES, A.E; BREYDO, L; PORTO, T.S; PORTO, A.L & UVERSKY, V.N. **Hydrophobicity-dependent effects of polymers on different protein conformations.** RSC Advances, *6*(49), 42971-42983, 2016.

SANTOS, E.R. DOS; MONDELI, M.A; POZZI, L.V et al. **New ruthenium (II)/phosphines/diimines complexes: promising antitumor (human breast cancer) and Mycobacterium tuberculosis fighting agents.** Polyhedron, 1120, 2013.

SATYANARAYANA, S; DABROWIAK, J.C; CHAIRES, J.B. **Tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomer interactions with DNA: mode and specificity of binding**. Biochemistry, 32(10), 2573-2584, 1993.

SAVA, G; ZORZET, C; TURRIN, F; VITA, M.R; SORANZO, G; ZABUCCHI, M; COCCHIETTO, A; BERGAMO, S; DIGIOVINE, G; PEZZONI, L; SARTOR, S.G. **Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis: Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen**. Clinical Cancer Research. 9, 1898-1905, 2003.

SASAKI, Y; NAGASAWA, A; TOKIWA-YAMAMOTO, A & ITO, T. **Substitution of methanol-d4 for the coordinated water in the trinuclear complexes,$[M_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3COO)_6(H_2O)_3]^+$($M_3$= Ru_3, Rh_3 or Ru_2Rh) in methanol-d_4.** Inorganica chimica acta, 212(1-2), 175-182, 1993.

SEDDON, E.A; SEDDON, K.R. **The chemistry of ruthenium**. **19,** Elsevier, 2013.

SILVA, D.O. **Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drugs as metallopharmaceuticals in cancer therapy**. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 10, 4, 312–23, 2010.

SILVERSTEIN, R.M; BASSLER G.C; MORRILL, T.C. **Spectroscopic Identification of Organic Compounds**. John Wiley & Sons, Inc, 5ed, 1991.

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, 124, 1-19, 2013.

SJÖHOLM, I; SJÖDIN, T. **Binding of drugs to human serum albumin—I. circular dichroism studies on the binding of some analgesics, sedatives and antidepressive agents**. Biochemical pharmacology, 21(22), 3041-IN12, 1972.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH.**Fundamentos de Química Analítica,** Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SLEEP, D; CAMERON, J; EVANS, L.R. **Albumin as a versatile platform for drug half – life extension Biochim. Biophys.** Acta, Gen. Subj, 1830 (12), 5526-5534, 2013.

SOLOMONS. T.W.G; CRAIG B.F. **Química. Orgânica.** 12º Ed. University of South Florida..LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.,2018.

SPENCER, A; WILKINSON, G. **μ-Oxo-triruthenium carboxylate complexes**. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 14, 570-1577,1972.

SUN, J; HUANG, Y; ZHENG, C; ZHOU, Y; LIU, Y & LIU, J. **Ruthenium (II) complexes interact with human serum albumin and induce apoptosis of tumor cells.** Biological trace element research, 163(1-2), 266-274, 2015.

SUN, Y; JOYCE, L.E; DICKSON, N.M; TURRO, C. **Efficient DNA photocleavage by $[Ru(bpy)_2(dppn)]^{2+}$ with visible light.** Chemical Communications, 46(14), 2426-2428, 2010.

SUN, Y; LUTTERMAN, D.A; TURRO, C. **Role of electronic structure on DNA light-switch behavior of Ru (II) intercalators.** Inorganic chemistry, 47(14), 6427-6434, 2008.

TAUCHAMAN, J; LYDIA, E.H; FURRER, J; THERRIEN, B; SUSS-FINK, G**. Cationic triruthenium(III) oxo complexes of the type $[Ru_3O(OAc)_6L_3]^+$ containing imidazole, pyrazole, thiazole and oxazole ligands: Synthesis, molecular structure, and cytotoxicity.** Inorganica Chimica Acta 423, 16–20, 2014.

TAYEH, N; RUNGASSAMY, T; ALBANI, J.R. **Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 50(2), 107-116, 2009.

TERBRUEGGEN, R.H; JOHANN, T.W; BARTON, J.K. **Functionalized rhodium intercalators for DNA recognition**. Inorganic chemistry 37.26, 6874-6883, 1998.

TETTEH, S; DODOO, D.K; APPIAH-OPONG, R & TUFFOUR, I. **Spectroscopic characterization, in vitro cytotoxicity, and antioxidant activity of mixed ligand palladium (II) chloride complexes bearing nucleobases.** Journal of Inorganic Chemistry, 2014.

THORDARSON, P. **Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry**. Chemical Society Reviews, 40(3), 1305-1323, 2011.

TIMERBAEV, A.R; HARTINGER, C.G; ALEKSENKO, S.S AND KEPPLER, B.K. **Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in**

characterization using modern analytical methodology. Chemical reviews, 106(6), pp.2224-2248, 2006.

TOMA, H.E; ALEXIOU, A.D.P; DOKIDAUSKAS. **Extended Electronic Interactions in a Triangular μ-oxo-triruthenium Acetate Cluster Containing Nitric Oxide.** European Journal of Inorganic Chemistry, 3010-3017, 2002.

TOMA, H.E; ARAKI, K; ALEXIOU, A.D.P; NIKOLAOU, S; DOVIDAUSKAS, SERGIO. **Monomeric and extended oxo-centered triruthenium clusters.** Coordination Chemistry Reviews, 221, 187–234, 2001.

TOMA, H.E; ARAKI, K; FORMIGA, A.L.B; ALEXIOU, A.D; NUNES, G.S. **Electrocatalytic oxidation of methanol by the $[Ru_3O(OAc)_6(py)_2(CH_3OH)]^+$ cluster: improving the metal-ligand electron transfer by accessing the higher oxidation states of a multicentered system**. Química Nova, 33(10), 2046-2050, 2010.

TOMA, H.E; ALEXIOU, A.D.P; FORMIGA, M; NAKAMURA, M; DOVIDAUSKAS, S; EBERLIN, M.N; TOMAZELA, D.M. **A nitric oxide releaser based on the μ-oxo-hexaacetate-bis(4-methylpyridine)triruthenium nitrosyl complex.** Inorganica Chimica Acta, 358, 2891-2899, 2005.

TOMA, H.E; CUNHA, C.J; CIPRIANO, C. **Redox potentials of trinuclear μ-oxo ruthenium acetate clusters with N-heterocyclic ligands**. Inorganica Chimica Acta, v. 154, p. 63–66, 1988.

TOMA, H.E; CIPRIANO, C. **Spectroelectrochemistry and cyclic voltammetry of the trinuclear $[Ru_3O(O_2CCH_3)_6(pyrazine)_3]$ cluster**. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 263(2), 313-322, 1989.

TOMA, S.H; SANTOS, J.J; ARAKI, K; TOMA, H.E. **Supramolecular Approach to Gold Nanoparticle/Triruthenium Cluster Hybrid Materials and Interfaces.** Eur. J. Inorg. Chem. 1640-1648, 2011.

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

TOPALA, T; BODOKI, A; OPREAN, L; OPREAN, R. **Experimental Techniques Employed in the Study of Metal Complexes-DNA-Interactions**. Farmacia, 62(6), 1049-1061, 2014.

TRYNDA-LEMIESZ, L; KEPPLER, B.K; KOZŁLOWSKI, H. **Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis (imidazol) ruthenate (III)].** Journal of inorganic biochemistry, 73(3), 123-128, 1999.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**, First Edtion, 2001.

VALEUR, B & BERBERAN-SANTOS, M.N. **Molecular fluorescence: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2012.

VERGARA, A; RUSSO KRAUSS, I; MONTESARCHIO, D; PADUANO, L & MERLINO, A. **Investigating the ruthenium metalation of proteins: X-ray structure and Raman microspectroscopy of the complex between RNase A and AziRu**. Inorganic chemistry, 52(19), 10714-10716, 2013.

VICENDO, P; MOUYSSET, S & PAILLOUS, N. **Comparative Study of Ru $(bpz)_3^{2+}$ $Ru(bpy)_3^{2+}$ and $Ru(bpz)_2CI_2$ as Photosensitizers of DNA Cleavage and Adduct Formation**. Photochemistry and photobiology, 65(4), 647-655, 1997.

VÎJAN, L.E; PUICĂ. **I.Spectral study of the interaction between enoxacin and calf thymus DNA.** Optoelectronics and Advanced Materials–Rapid Communications, 4(12), 2129-2131, 2010.

WAN, C; FIEBIG, T; KELLEY, S.O; TREADWAY, C.R; BARTON, J.K & ZEWAIL, A.H. **Femtosecond dynamics of DNA-mediated electron transfer**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(11), 6014-6019, 1999.

WARING, M.J. **DNA modification and cancer**. Annual Review of Biochemistry**,** 50, 159-192,1981.

WEBB, M.I & WALSBY, C.J**. EPR as a probe of the intracellular speciation of ruthenium (III) anticancer compounds**. Metallomics, 5(12), 1624-1633, 2013.

WEIDMANN, A.G; BARTON, J.K. **A monofunctional platinum complex coordinated to a rhodium metalloinsertor selectively binds mismatched DNA in the minor groove.** Inorganic chemistry, 54, 19, 9626-9636, 2015.

WEIL, J.A; BOLTON, J.R. **Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications.** John Wiley & Sons, 2007.

WHEATE, N.J. et al. **Novel platinum(II)-based anticancer complexes and molecular hosts as their drug delivery vehicles**. Dalton Transactions,.5055-5064, 2007.

WIJAYA, K; TJAHJONO, D.H; YOSHIOKA, N; INOUE, H. **DNA-Binding Properties of Iron (II) Mixed-Ligand Complexes Containing 1, 10-Phenanthroline and Dipyrido [3, 2-a: 2', 3'-c] phenazine**. Zeitschrift für Naturforschung B, 59(3), 310-318, 2004.

WOSKO, T.J; FERRARA, D.T; SARTORI, L.S. **Histological comparison of the B16 melanoma and its F1 variant**. Cancer letters, 24, 1, 57-63, 1984.

YOSHIOKA, N; INOUE, H. **DNA binding of iron (II) mixed-ligand complexes containing 1, 10-phenanthroline and 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline**. Journal of inorganic biochemistry, 77(3-4), 239-247, 1999.

ZANINI. C.A; OGA. S. **Farmacologia Aplicada**. São Paulo: Atheneu, 2, 6-25 , 1982.

ZHANG, H; SASAKI, Y; ZHANG, Y; YE, S; OSAWA, S; ABE, M; UOSAKI, K. **Synthesis and Properties of the Cyano Complex of Oxo-Centered Triruthenium Core [$Ru_3(\mu_3\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3COO)_6(pyridine)_2(CN)$].**Inorg. Chem, 53, 1288−1294, 2014.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela 17: Dados espectroscópicos de RMN - ^{1}H, ^{13}C, COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC (^{1}H - ^{13}C) e HMQC obtidos para o ligante 2 (dppz)

Número do carbono	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral ^{1}H	COSY ^{1}H - ^{1}H	Correlação HMQC	Correlação HMBC
1 = 1a	148,6	---------	-------	-------	------	--------
2 = 2a	152,7	9,28	2	H_2 - H_3	H_2 - C_2	H_2 - C_2 H_2 - C_3 H_2 - C_1
3 = 3a	124,3	7,81	2	H_3 - H_4	H_3- C_3	H_3 - C_5 H_3 - C_2
4 = 4a	133,9	9,66	2	H_4 - H_3	H_4 - C_4	H_4 - C_6 H_4 - C_1 H_4 - C_2
5 = 5a	127,6	--------	------	--------	--------	--------
6 = 6a	141,3	---------	-------	------	--------	--------
7 = 7a	142,7	--------	-------	------	--------	--------
8 = 8a	129,7	8,36	2	H_8 - H_9	H_7 - C_7	H_8 - C_9 H_8 - C_7
9 = 9a	130,8	7,94	2	H_9 - H_8	H_8 - C_8	H_9 - C_8 H_9 - C_7

Tabela 18: Dados espectroscópicos de RMN - ^{1}H, ^{13}C, COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC (^{1}H - ^{13}C) e HMQC obtidos para o ligante 3 (dppz-CH_3)

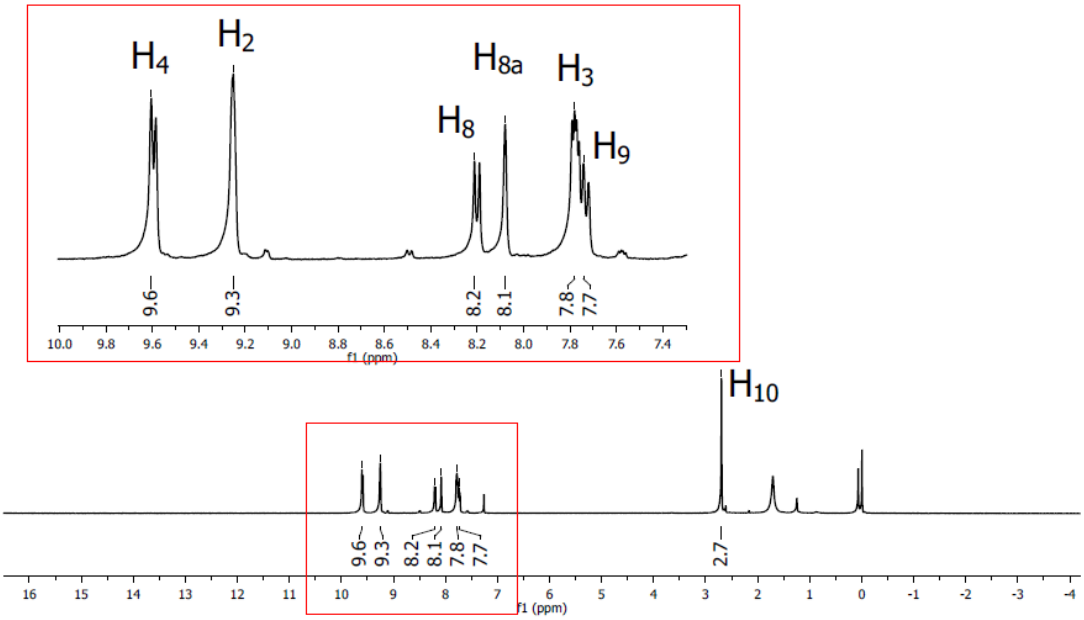
Número do carbono	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral ^{1}H	COSY ^{1}H - ^{1}H	Correlação HMQC	Correlação HMBC
1 = 1a	148,3	------	-------	-------	-------	-------
2 = 2a	152,4	9,25	2	H_2 - H_3	H_2 - C_2	H_2 - C_3 H_2 - C_4
3 = 3a	127,9	7,78	2	H_3 - H_2	H_3 - C_3	H_3 - C_2 H_3 - C_3 H_3 - C_5
4 = 4a	133,4	9,61	2	H_4 - H_3	H_4 - C_4	H_4 - C_2 H_4 - C_5 H_4 - C_1
5 = 5a	127,9	-------	-------	-------	-------	-------
6 = 6a	141,6	-------	-------	-------	-------	-------
7	142,8	-------	-------	-------	-------	-------
7a	140,5	-------		-------	-------	-------
8	129,2	8,21	1	-------	-------	-------
8a	128,2	8,08	1	H_{8a} - H_{10}	H_{8a} - C_{8a}	H_{8a} - C_{9a}
9	133,7	7,74	1	-------	H_9 - C_9	-------
9a	124,2	-------	-------	-------	-------	H_9 - C_{9a}
10	22,2	2,69	3	-------	-------	-------

Tabela 19:Dados espectroscópicos de RMN - ^{1}H, ^{13}C, COSY (^{1}H - ^{1}H), HMQC (^{1}H - ^{13}C) e HMQC obtidos para o ligante 4 (dppz-Cl)

Número do carbono	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral ^{1}H	COSY ^{1}H - ^{1}H	Correlação HMQC	Correlação HMBC
1 = 1a	148,6	-------	-------	-------	-------	
2 = 2a	153,0	9,25	2	H_2 - H_3	H_2 - C_2	H_2 - C_1 H_2 - C_3 H_2 - C_4
3 = 3a	124,1	7,75	2	H_3 - H_2 H_3 - H_4	H_3 - C_3	H_3 - C_2
4 = 4a	133,8	9,49	2	H_4 - H_3	H_4 - C_4	H_4 - C_2
5 = 5a	141,0	-------	-------	-------	-------	------
6 = 6a	141,8	-------	-------	-------	-------	------
7	142,6	-------	-------	-------	-------	------
7a	133,9	-------	-------	-------	------	------
8	128,3	8,25	1	H_8 - H_9	H_8 - C_8	------
8a	130,8	8,18	1		H_{8a} - C_{8a}	H_{8a} - C_7 H_{8a} - C_{9a}
9	131,7	7,82	1	H_9 - H_8	H_9 - C_9	H_9 - C_8
9a	136,7	-------	-------	-------	-------	

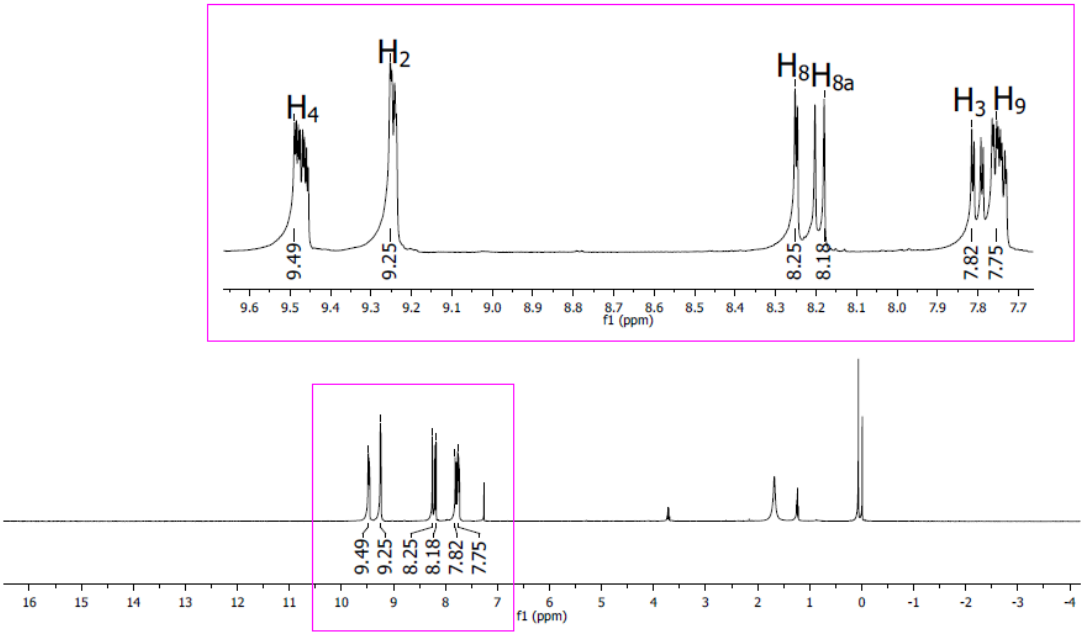
ANEXO II

Figura 81: Espectro de ^1H - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3 (dppz - CH_3)



Fonte: Autora.

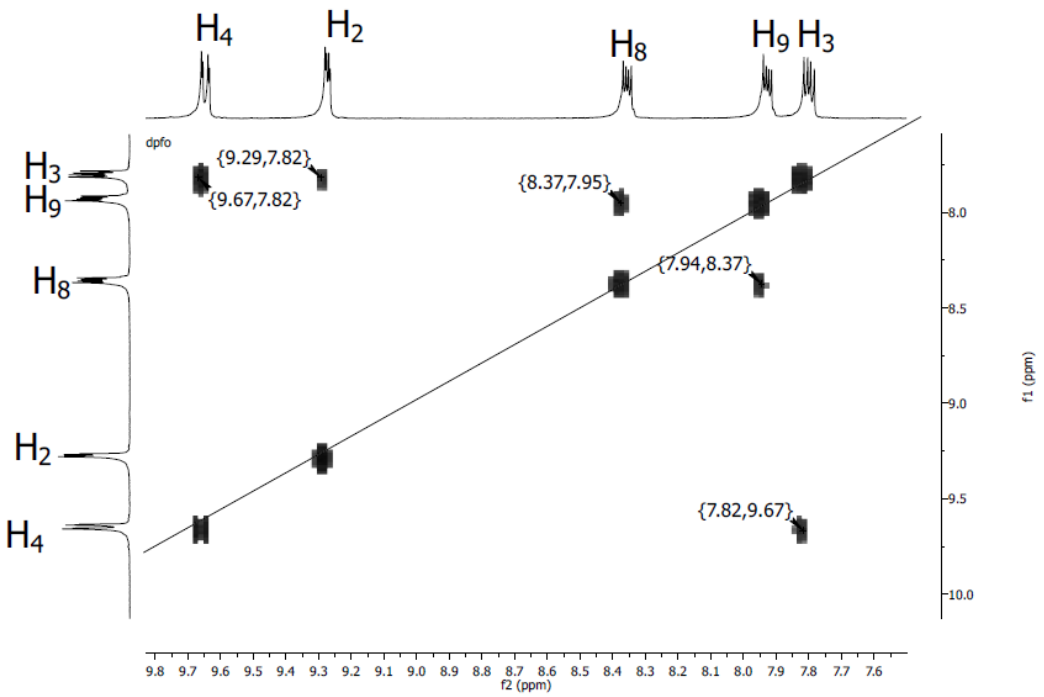
Figura 82: Espectro de ^1H - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 (dppz - Cl)



Fonte: Autora.

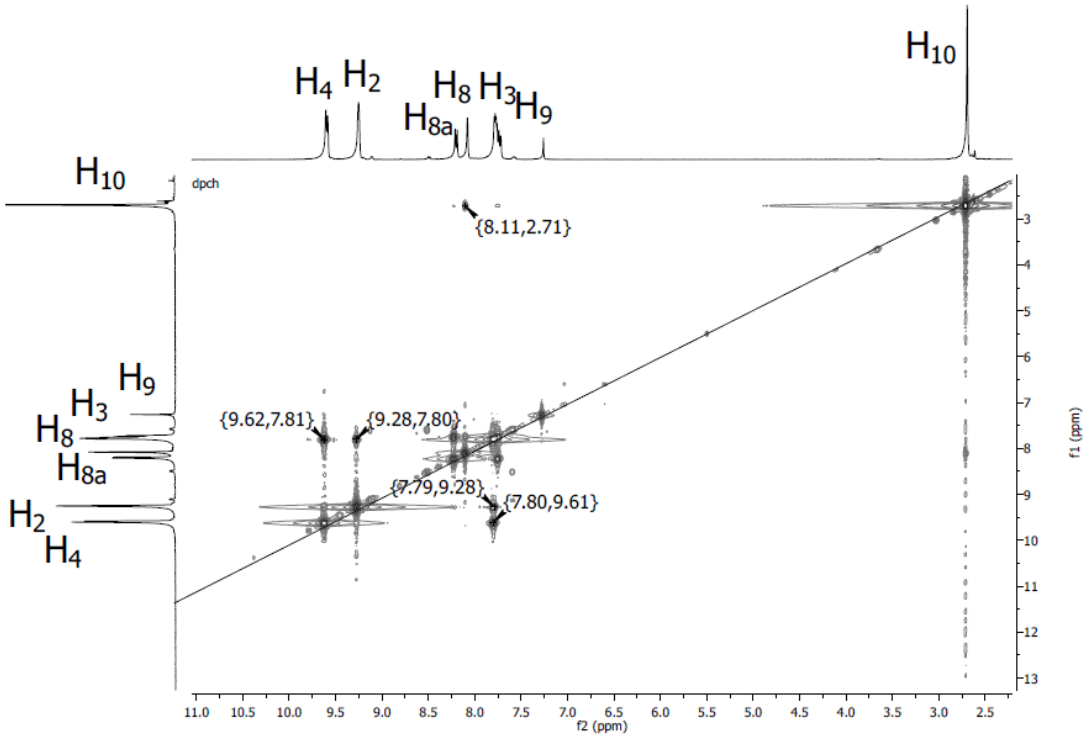
ANEXO III

Figura 83: Espectro de ^{1}H - ^{1}H COSY(400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz)



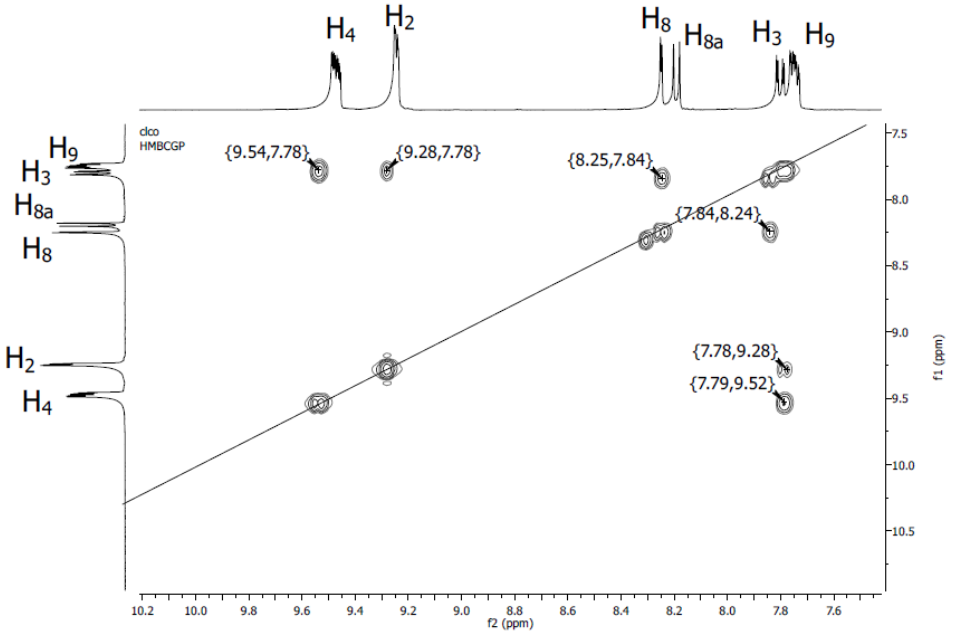
Fonte: Autora.

Figura 84: Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3. (dppz-CH_3)



Fonte: Autora.

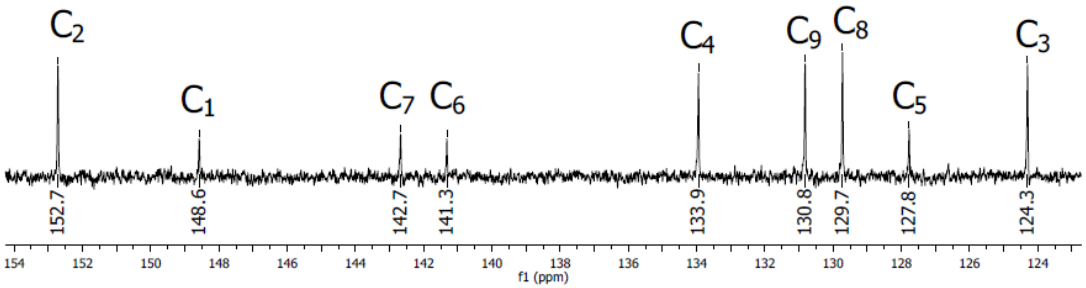
Figura 85: Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 (dppz-Cl)



Fonte: Autora.

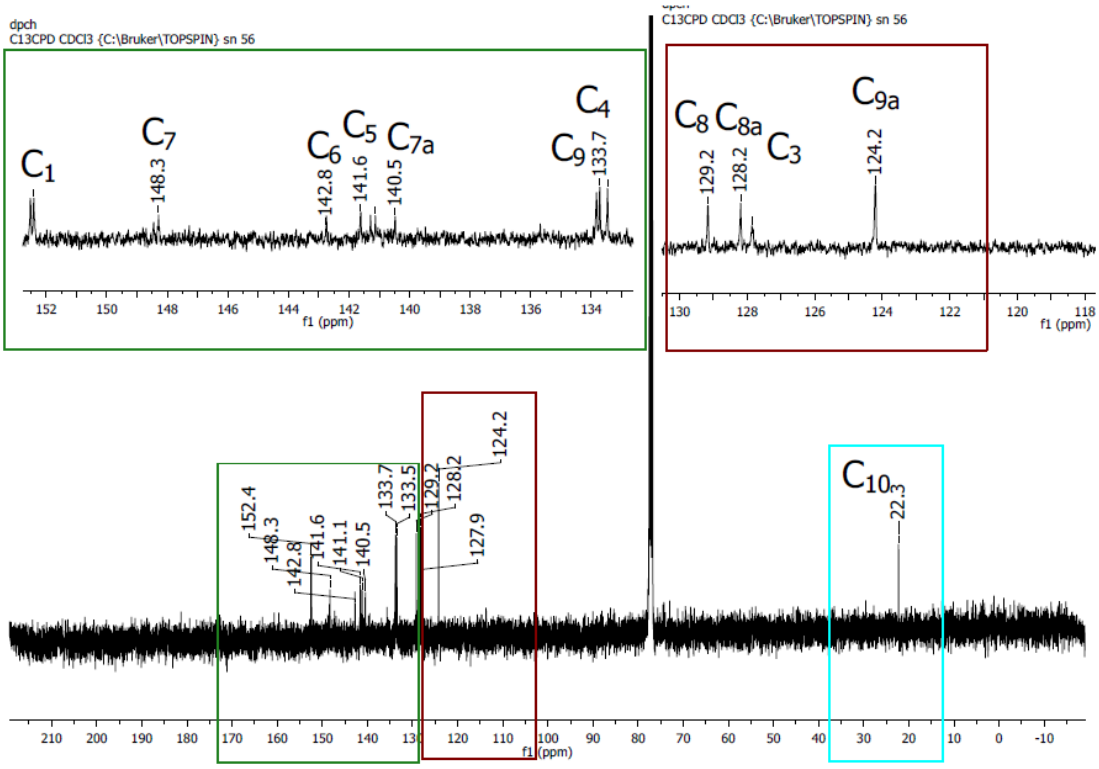
ANEXO IV

Figura 86: Espectro de ^{13}C - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 2 (dppz)



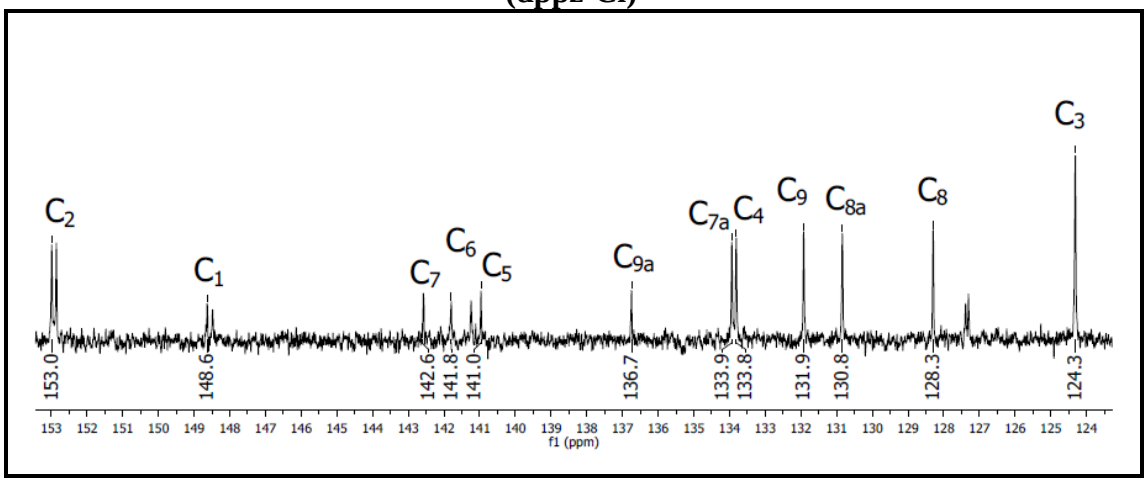
Fonte: Autora.

Figura 87: Espectro de ^{13}C - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3 (dppz-CH_3)



Fonte: Autora.

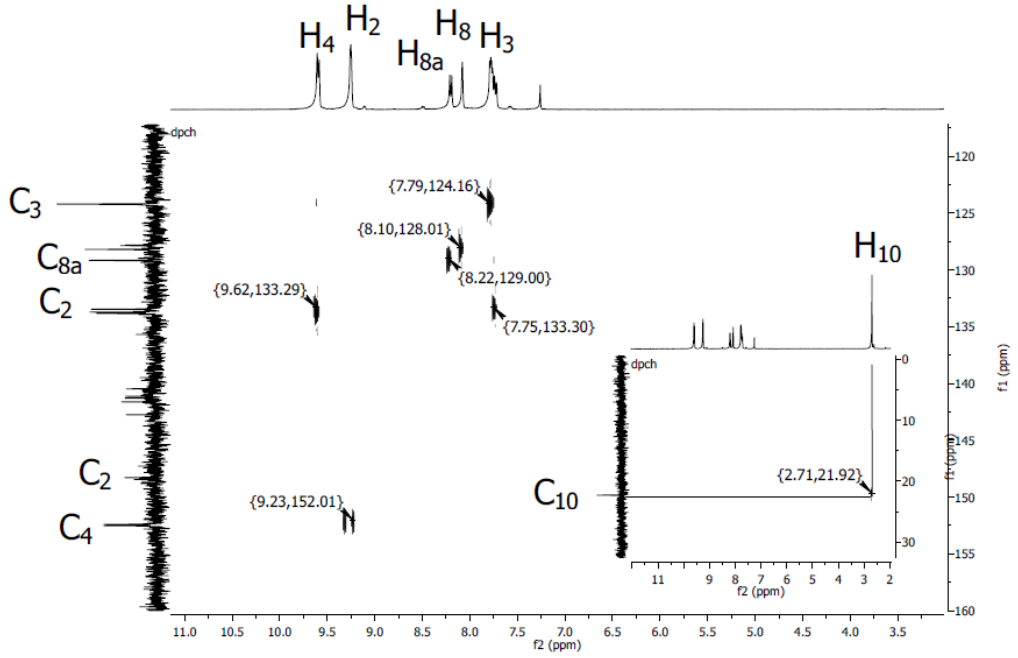
Figura 88: Espectro de ^{13}C - RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 (dppz-Cl)



Fonte: Autora.

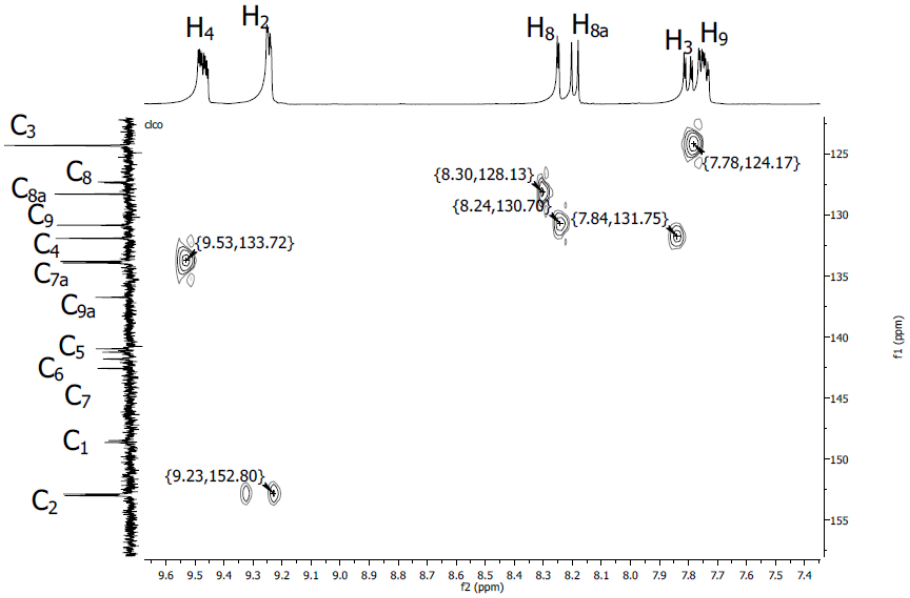
ANEXO V

Figura 89: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMQC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3 (dppz-CH_3)



Fonte: Autora.

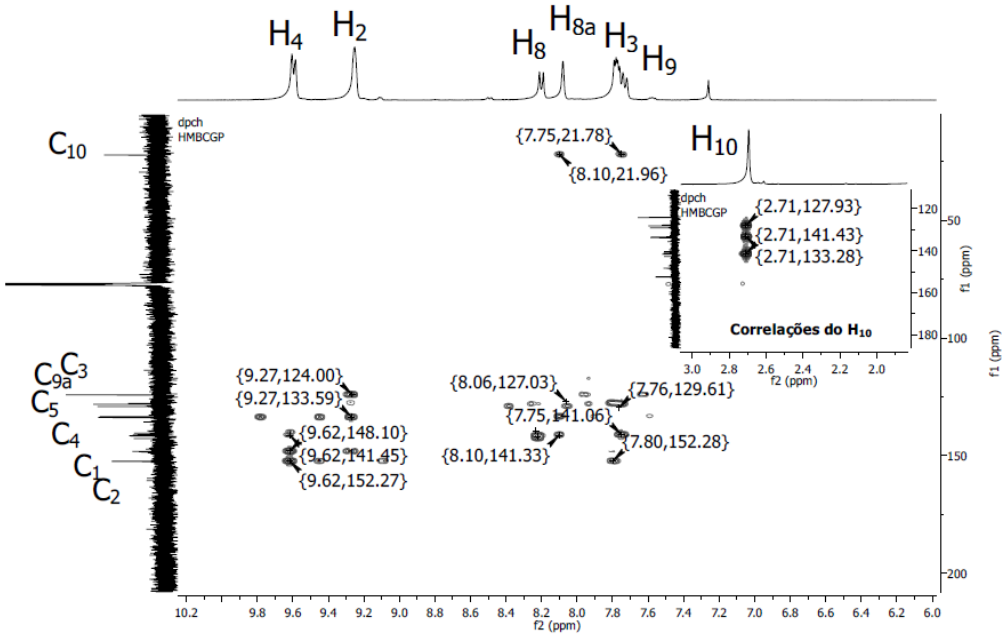
Figura 90: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMQC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 (dppz-Cl)



Fonte: Autora.

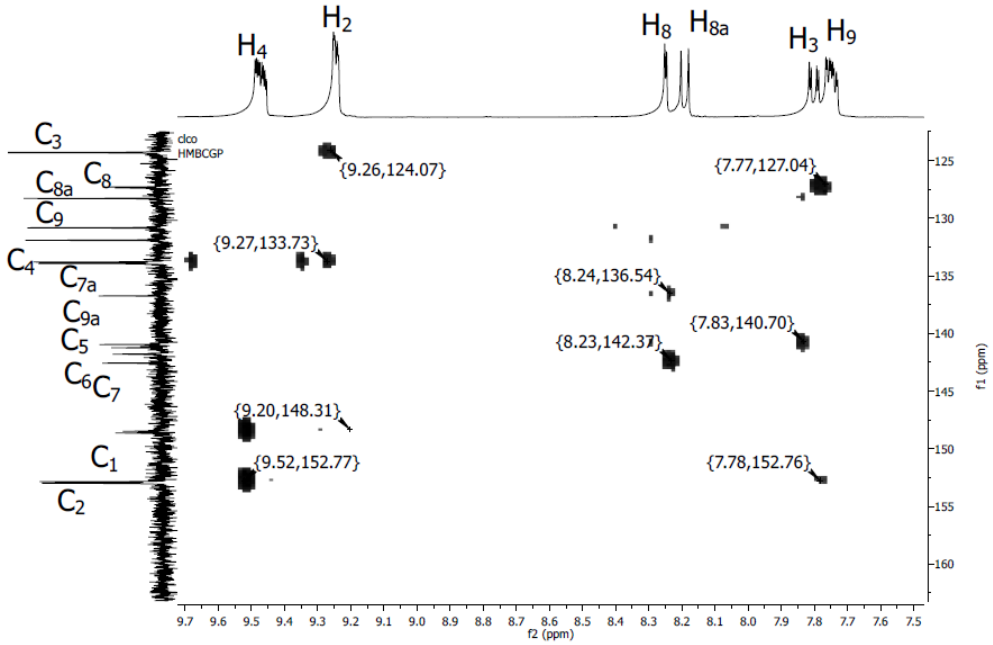
ANEXO VI

Figura 91: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 3 (dppz - CH_3)



Fonte: Autora.

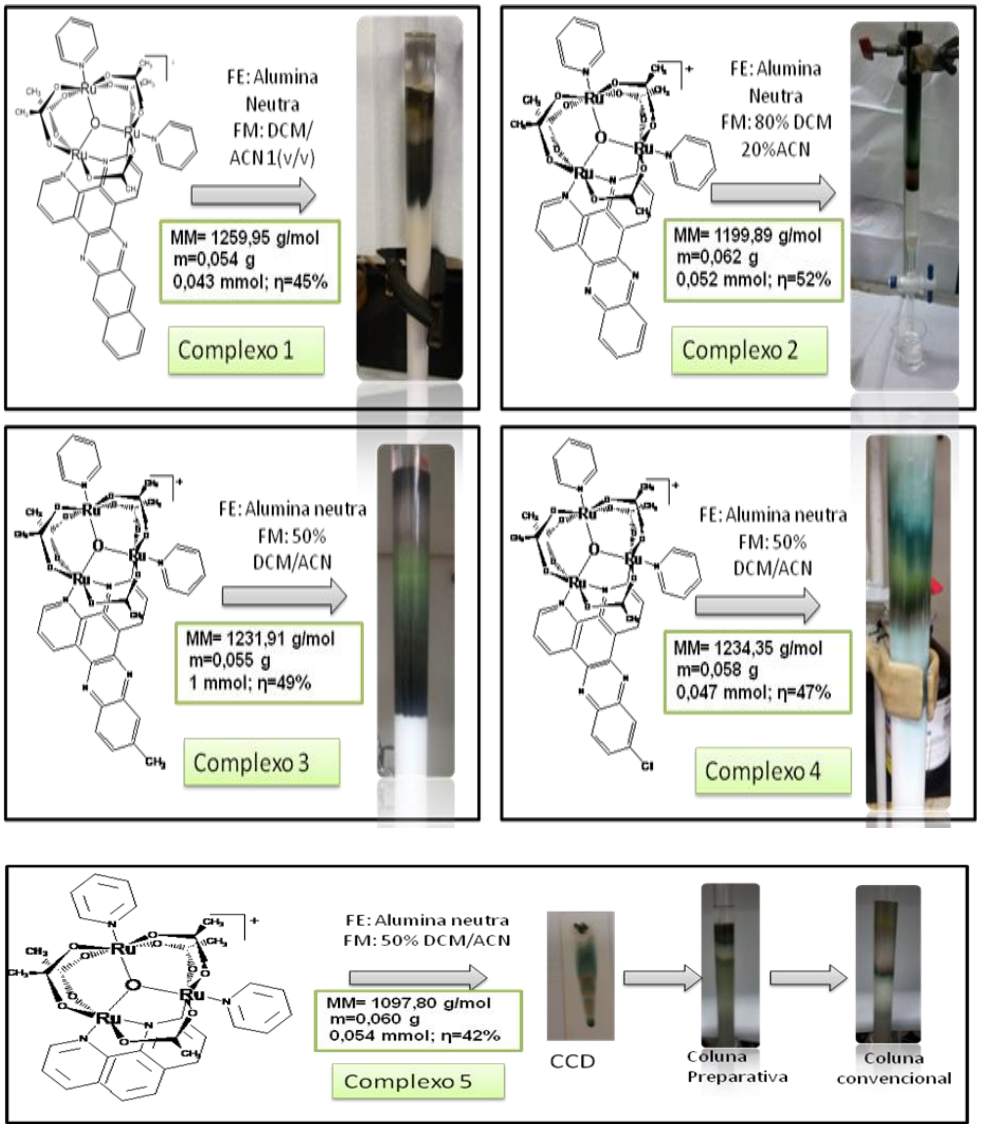
Figura 92: Espectro de ^{1}H - ^{13}C HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, 10^{-2} M) do ligante 4 (dppz-Cl)



Fonte: Autora.

ANEXO VII

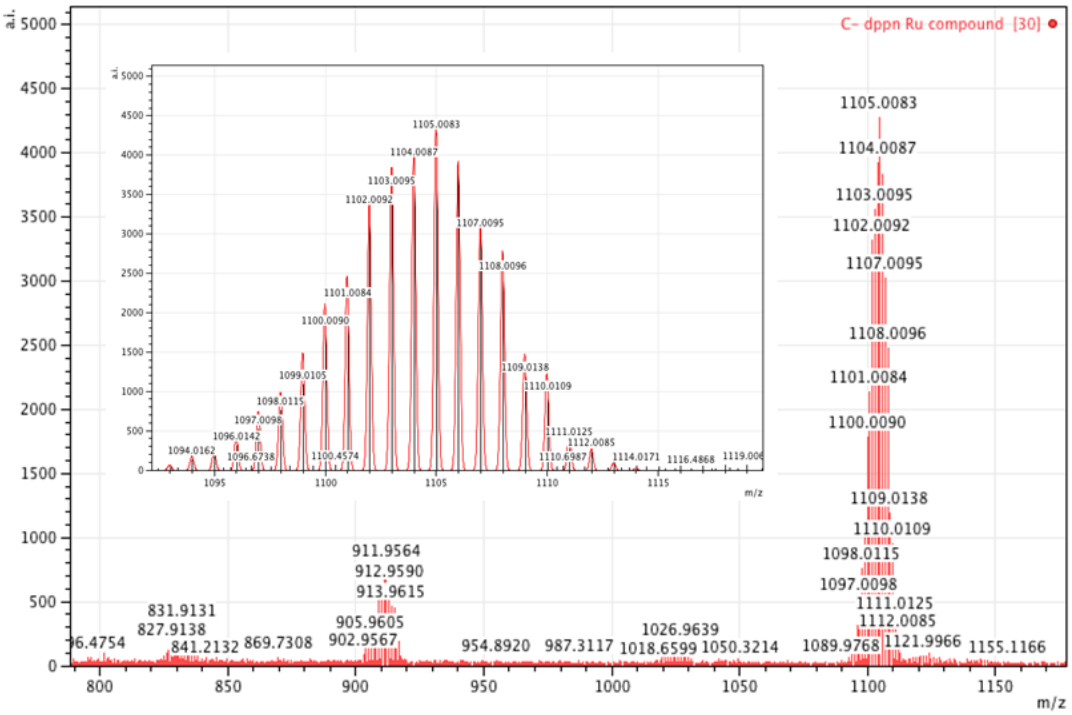
Figura 93: Representações das purificações dos complexos (1-5).



Fonte: Autora.

ANEXO VIII

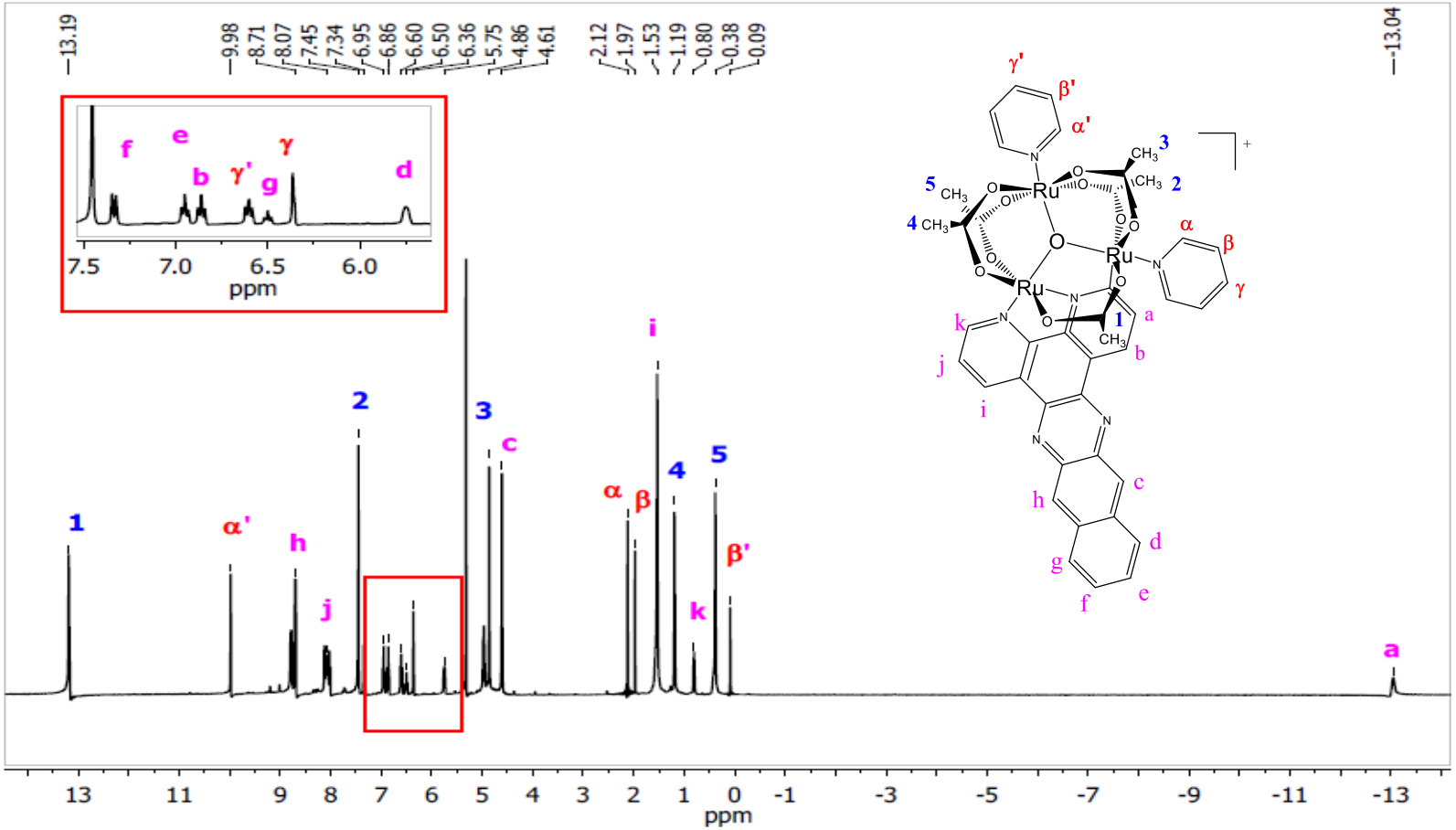
Figura 94: Espectro ESI-MS do complexo (1) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$ adquirido no modo positivo



Fonte: Autora.

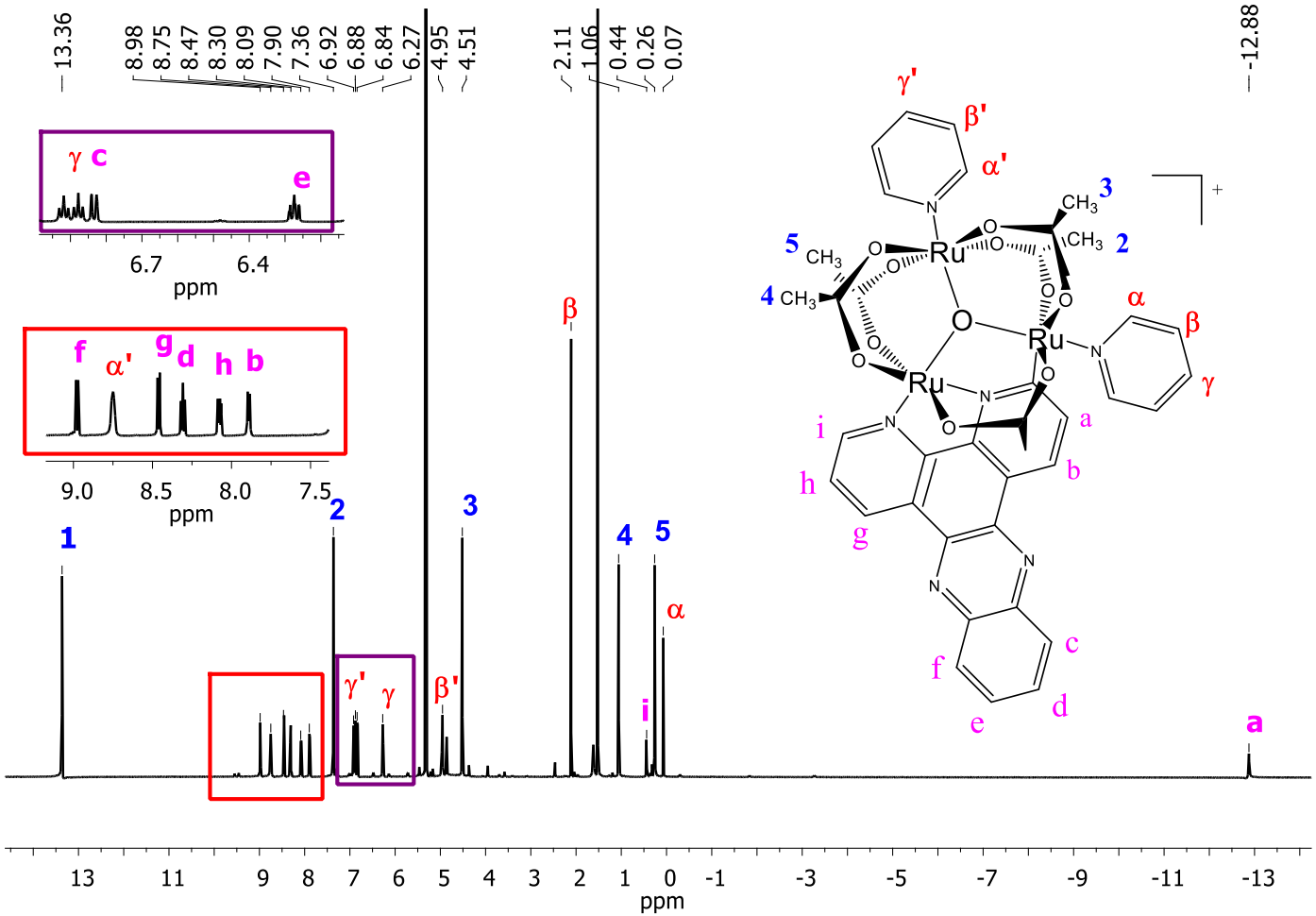
ANEXO IX

Figura 95: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



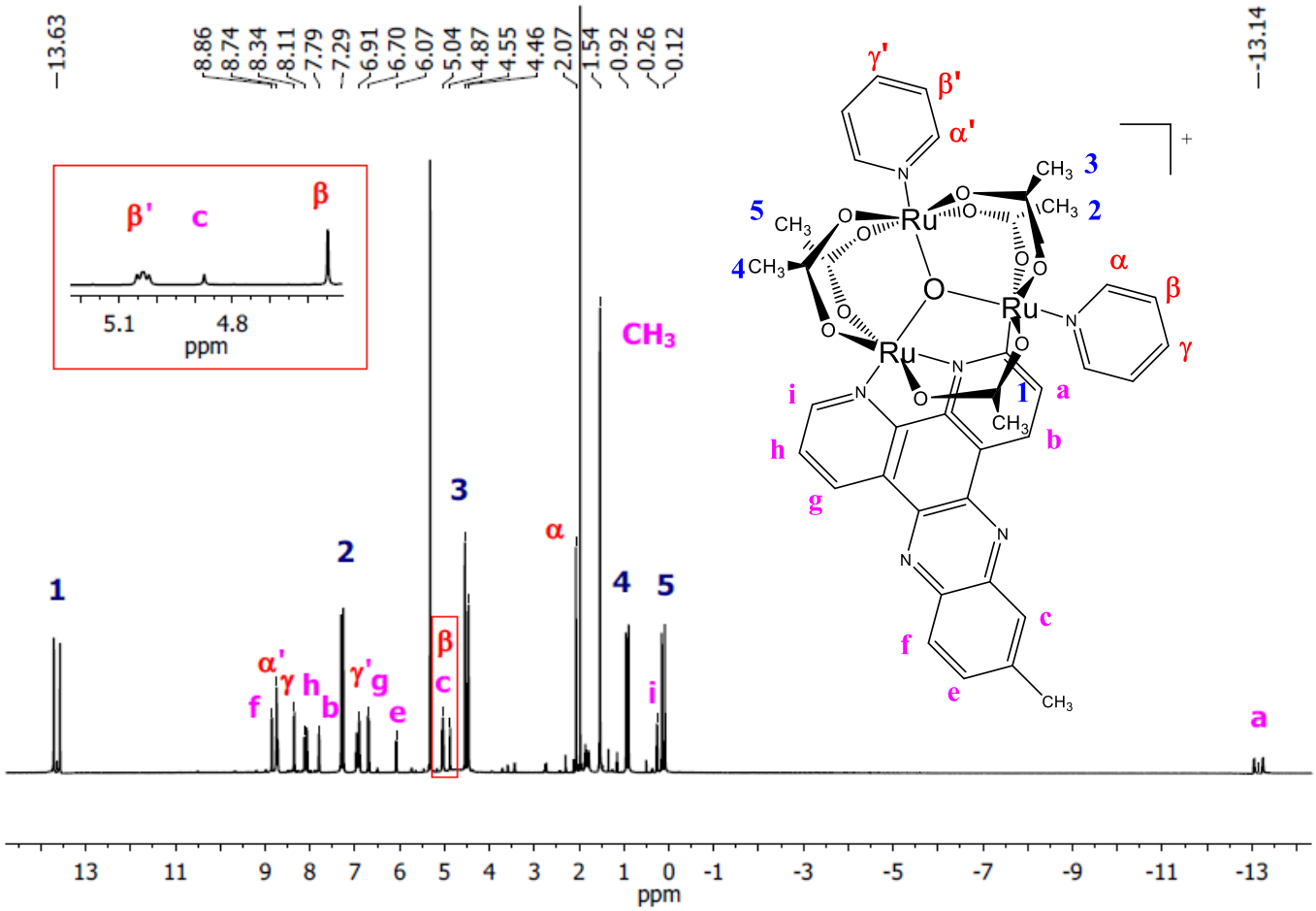
Fonte Autora.

Figura 96: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



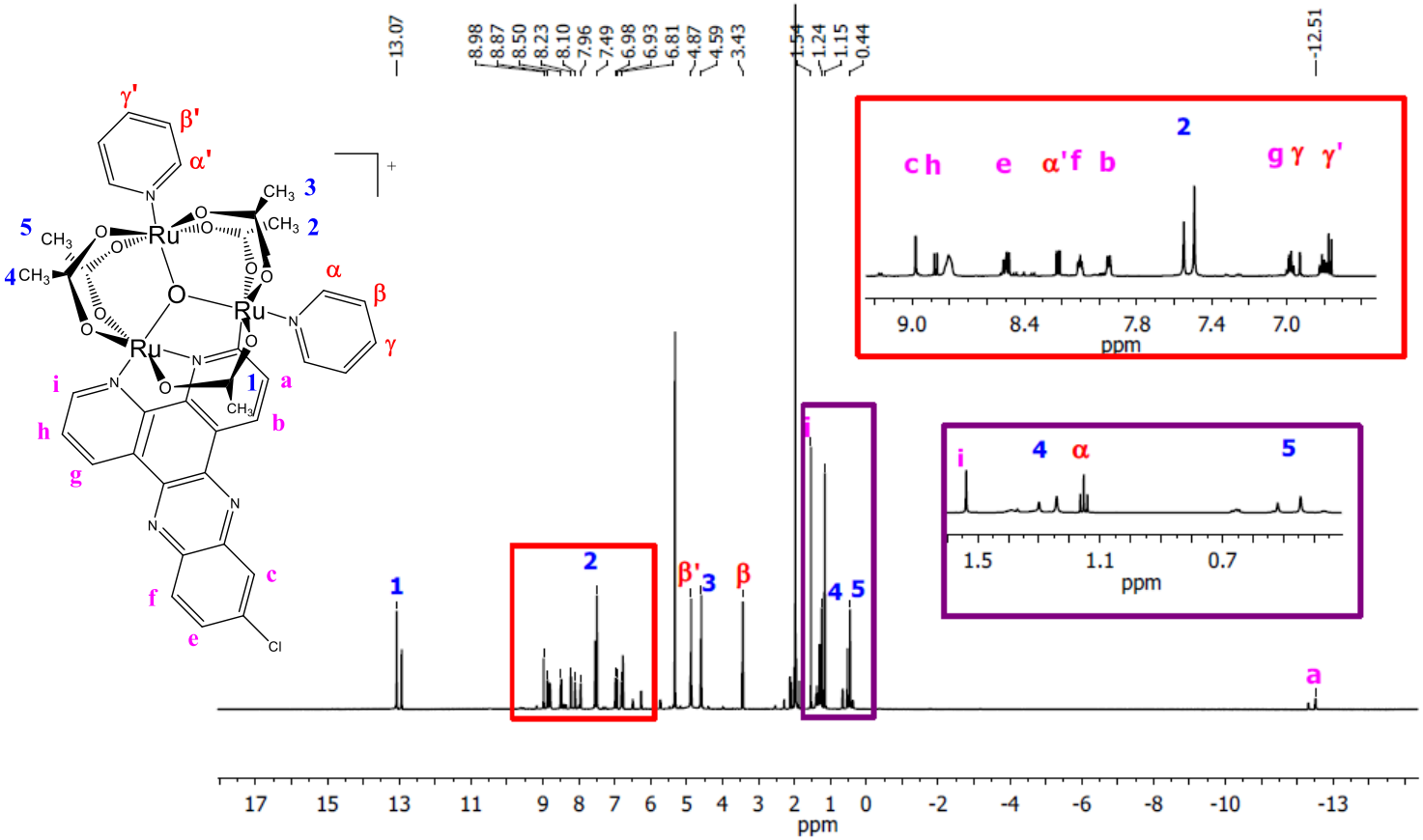
Fontre: Autora.

Figura 97: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



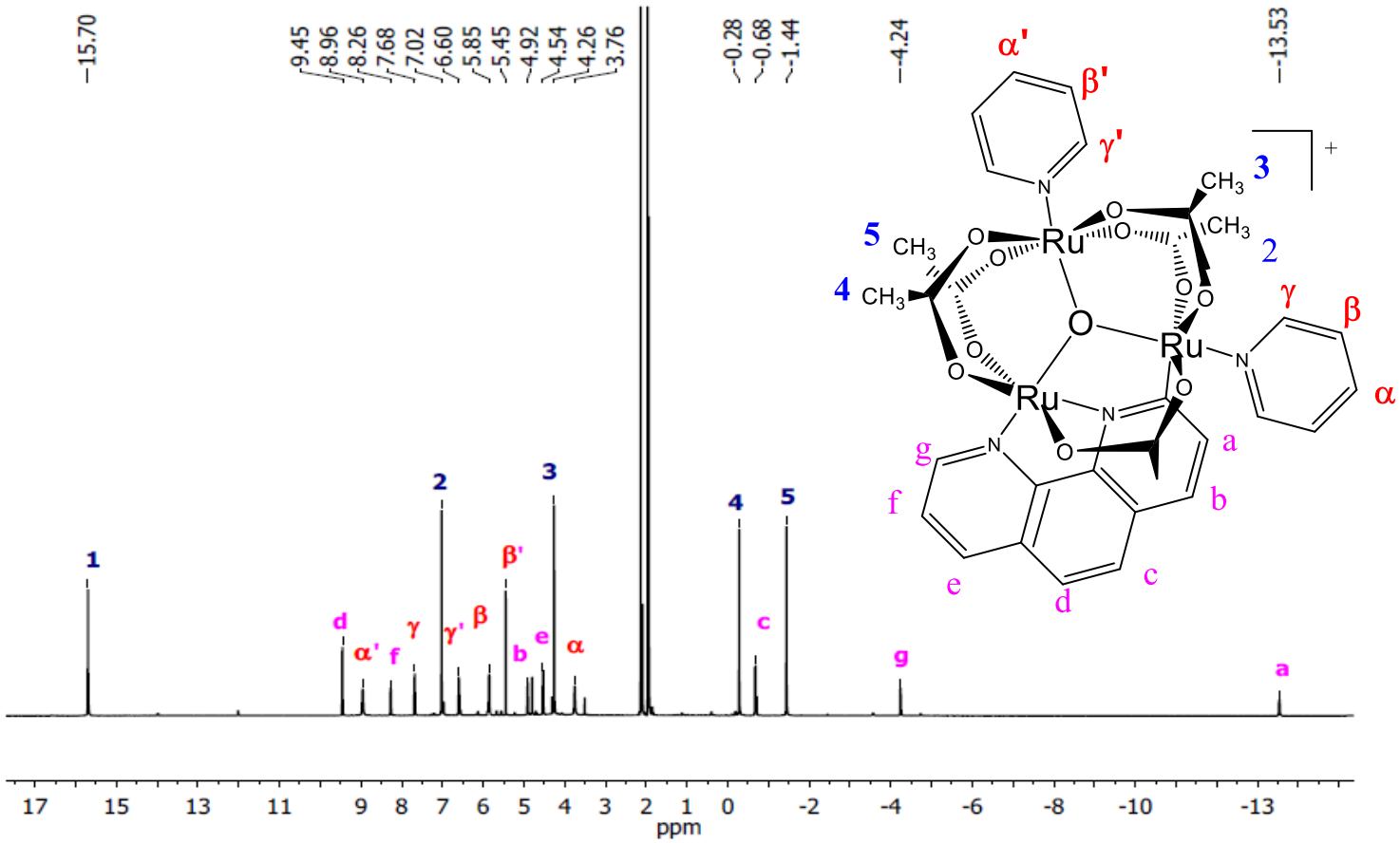
Fonte Autora.

Figura 98: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

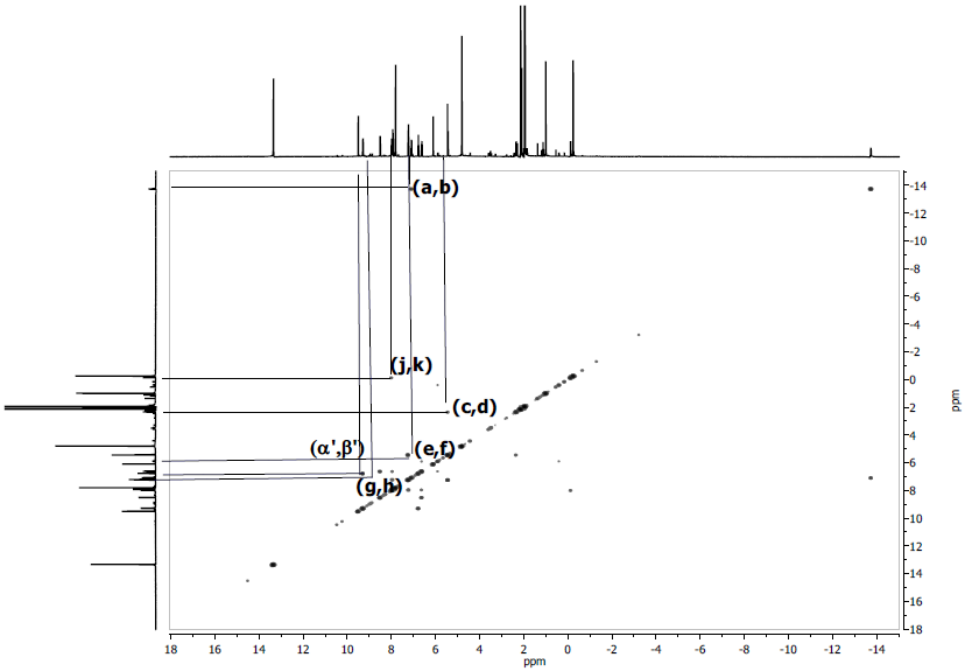
Figura 99: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

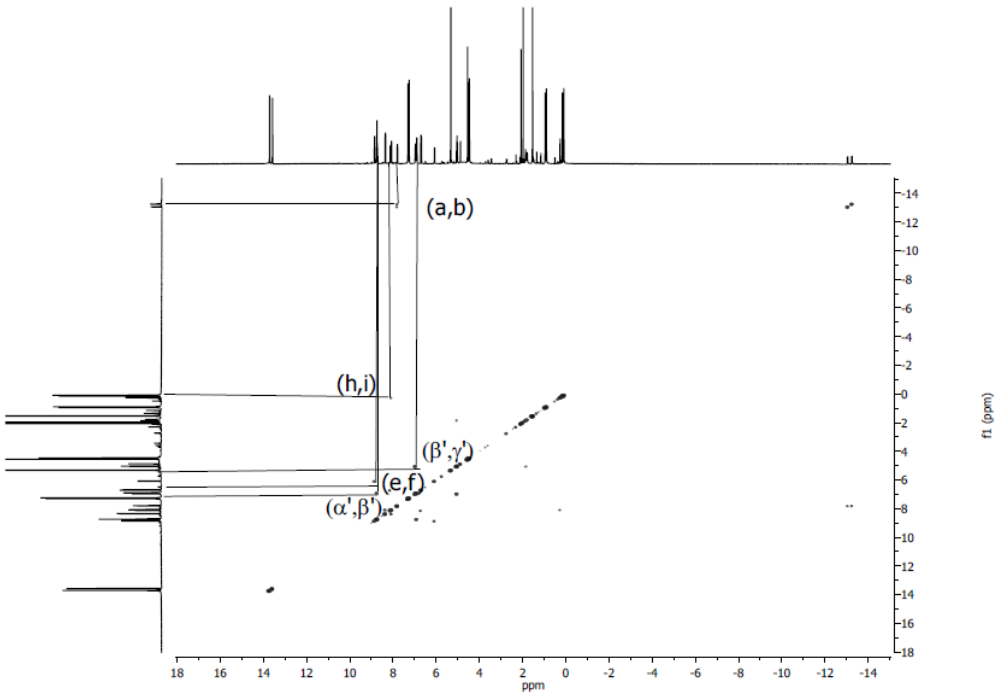
ANEXO X

Figura 100: Espectro de correlação ^1H-^1H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



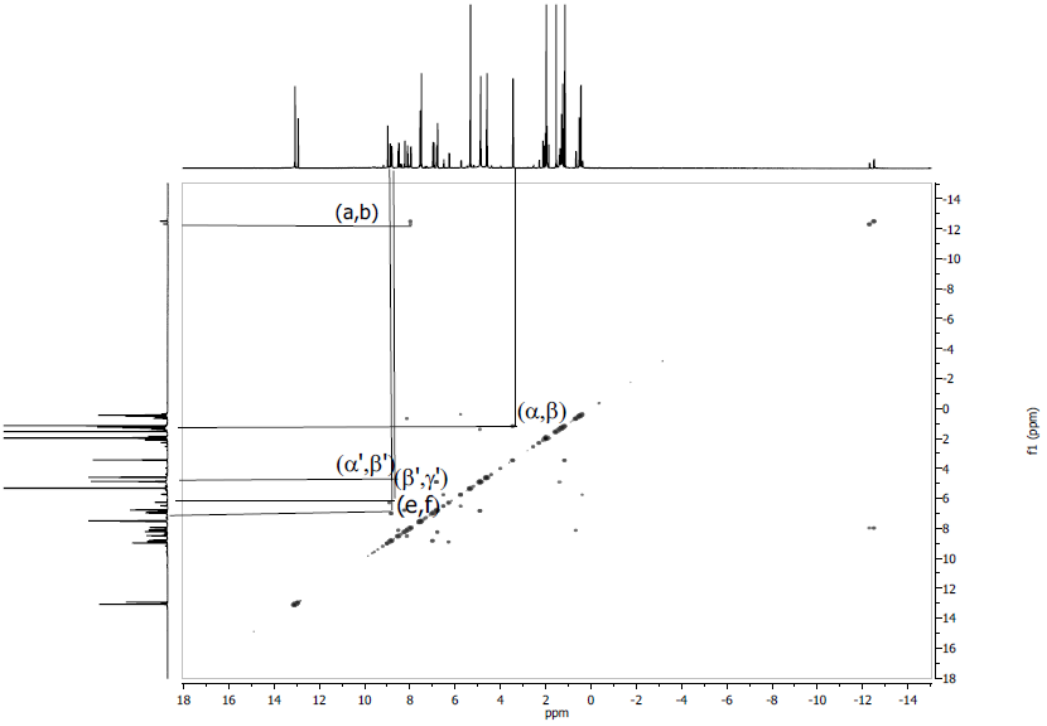
Fonte: Autora.

Figura 101: Espectro de correlação ^1H-^1H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d_2, 10^{-2} M



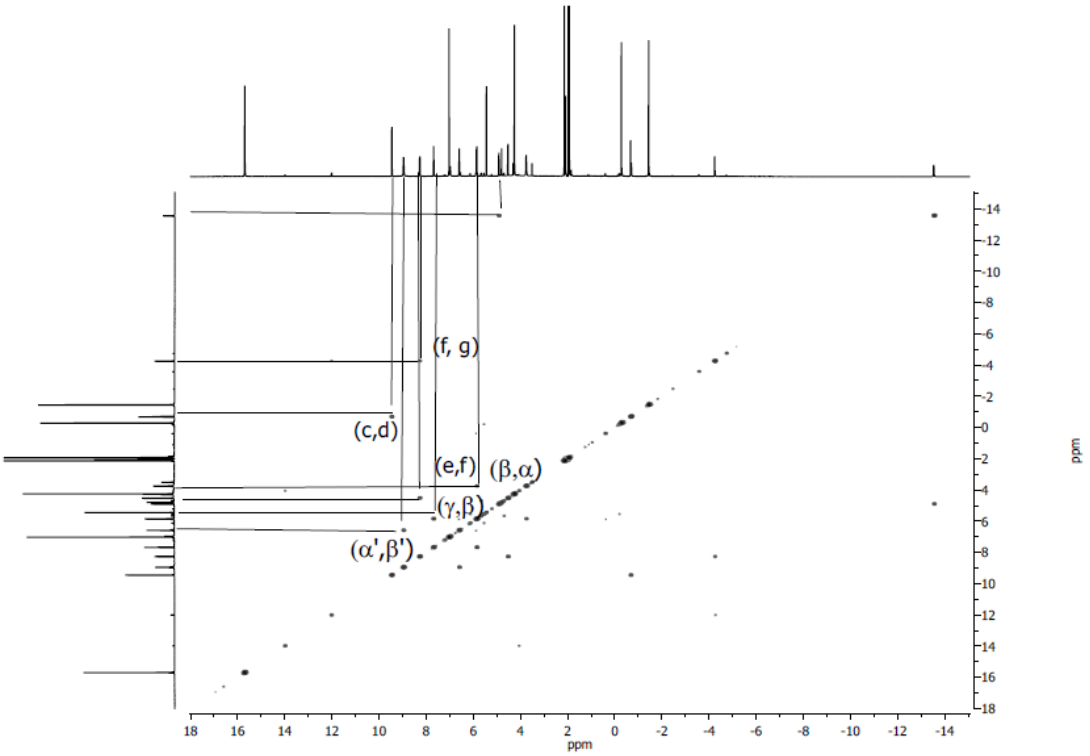
Fonte: Fonte: Autora.

Figura 102: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d$_2$, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

Figura 103: Espectro de correlação ^{1}H-^{1}H COSY do complexo $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$ obtido em solução de diclorometano-d$_2$, 10^{-2} M



Fonte: Autora.

ANEXO XI

Figura 104: Registros dos equipamentos de flash fotólise (nanosegundos e femtosegundos) do Center for Chemical and Biophysical Dynamics, laboratório Profa. Dra. Claudia Turro – The Ohio State University.

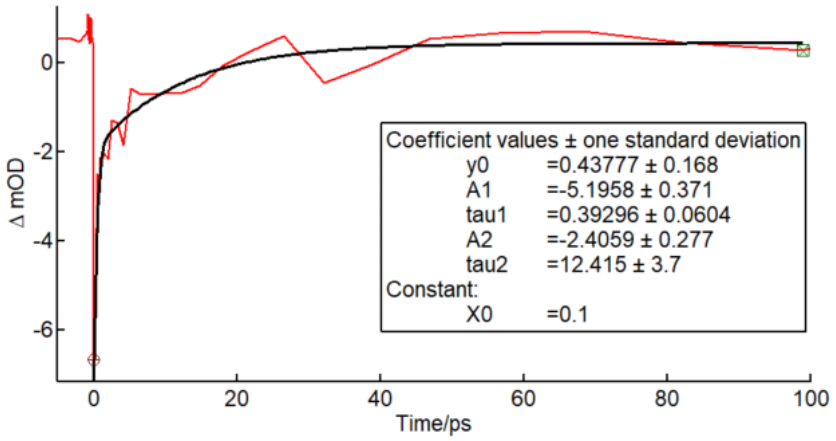
Fonte: Autora

ANEXO XII

Figura 105: Curvas de decaimento associadas aos complexos estudados (1-5, A-E)

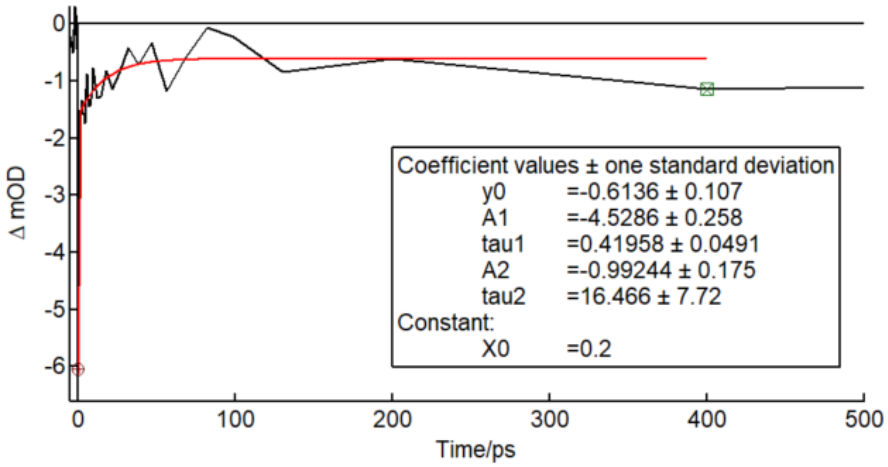
(A) Complexo (1) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppn)]^+$

kt@640nm (t_1= 0.39 ± 0.06 ps t_2= 12.4 ± 3.7 ps)



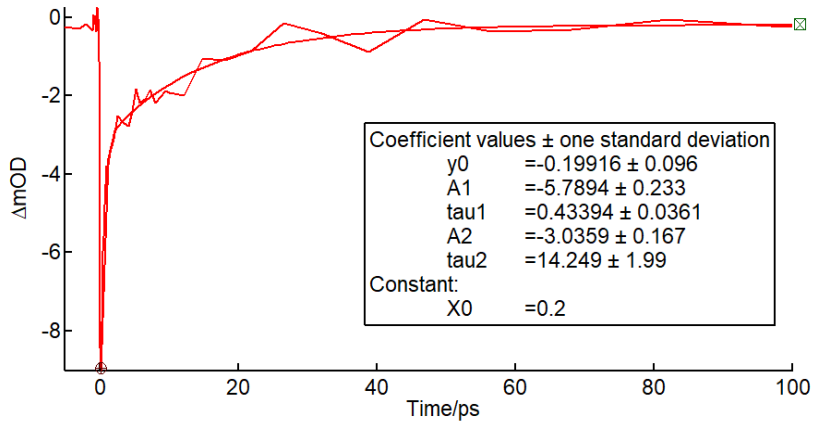
(B) Complexo (2) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppz)]^+$

kt@630nm t_1= 0.42 ± 0.05 ps t_2= 16.5 ± 7.7 ps



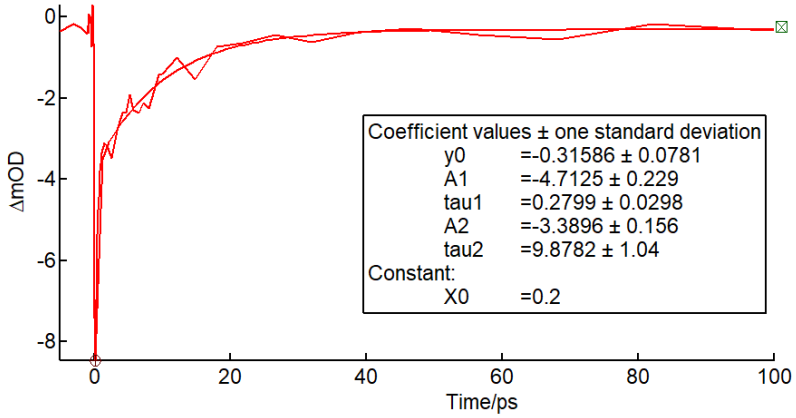
(C) Complexo (3) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCH_3)]^+$

kt@640nm t_1= 0.43 ± 0.03 ps t_2= 14.2 ± 2.0 ps



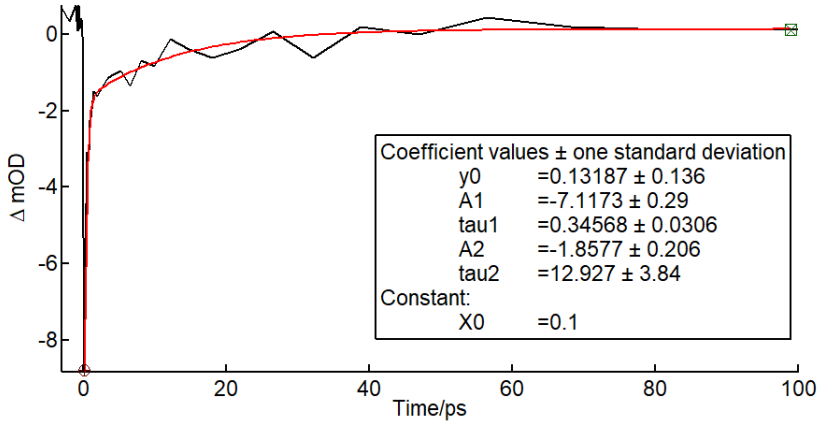
(D) Complexo (4) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(dppzCl)]^+$

kt@660nm t_1= 0.28 ± 0.03 ps t_2= 9.9 ± 1.0 ps



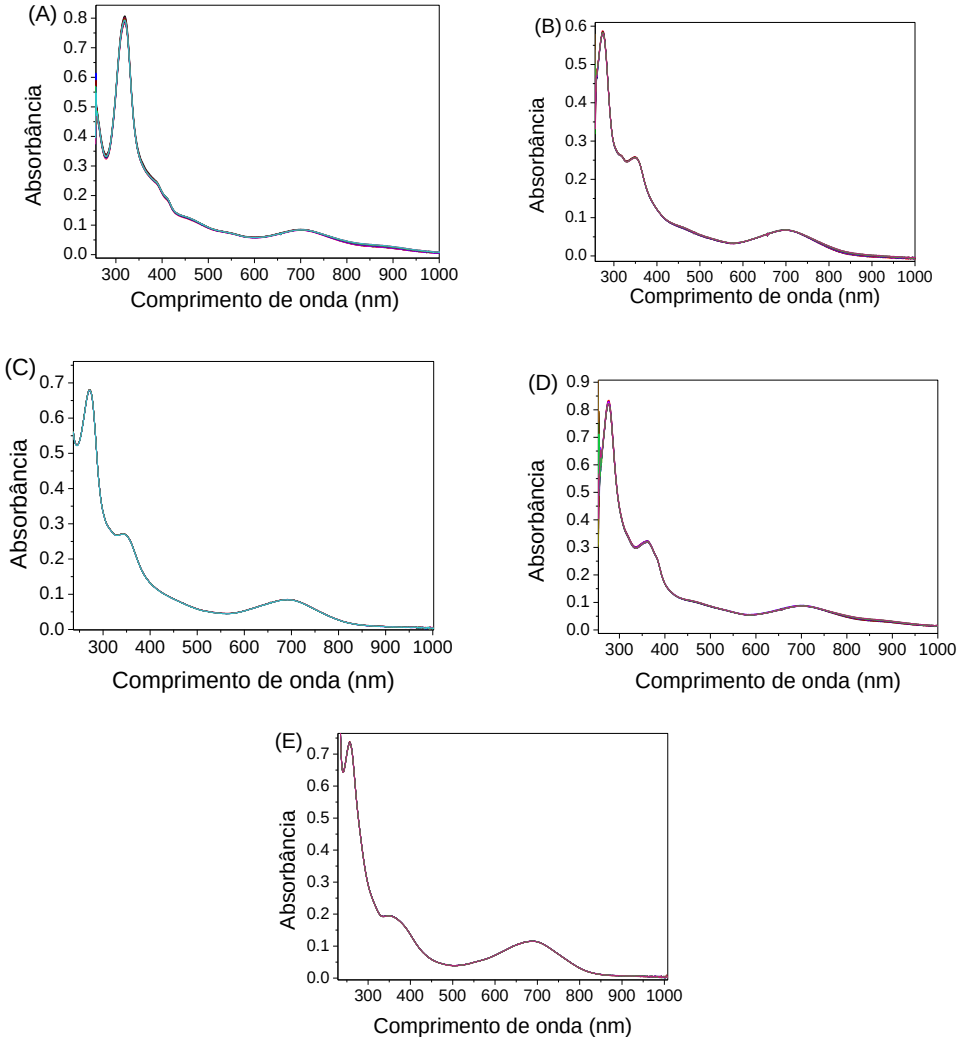
(E) Complexo (5) $[Ru_3O(OAc)_5(py)_2(phen)]^+$

kt@620nm t_1= 0.35 ± 0.03 ps t_2= 12.9 ± 3.8 ps



ANEXO XIII

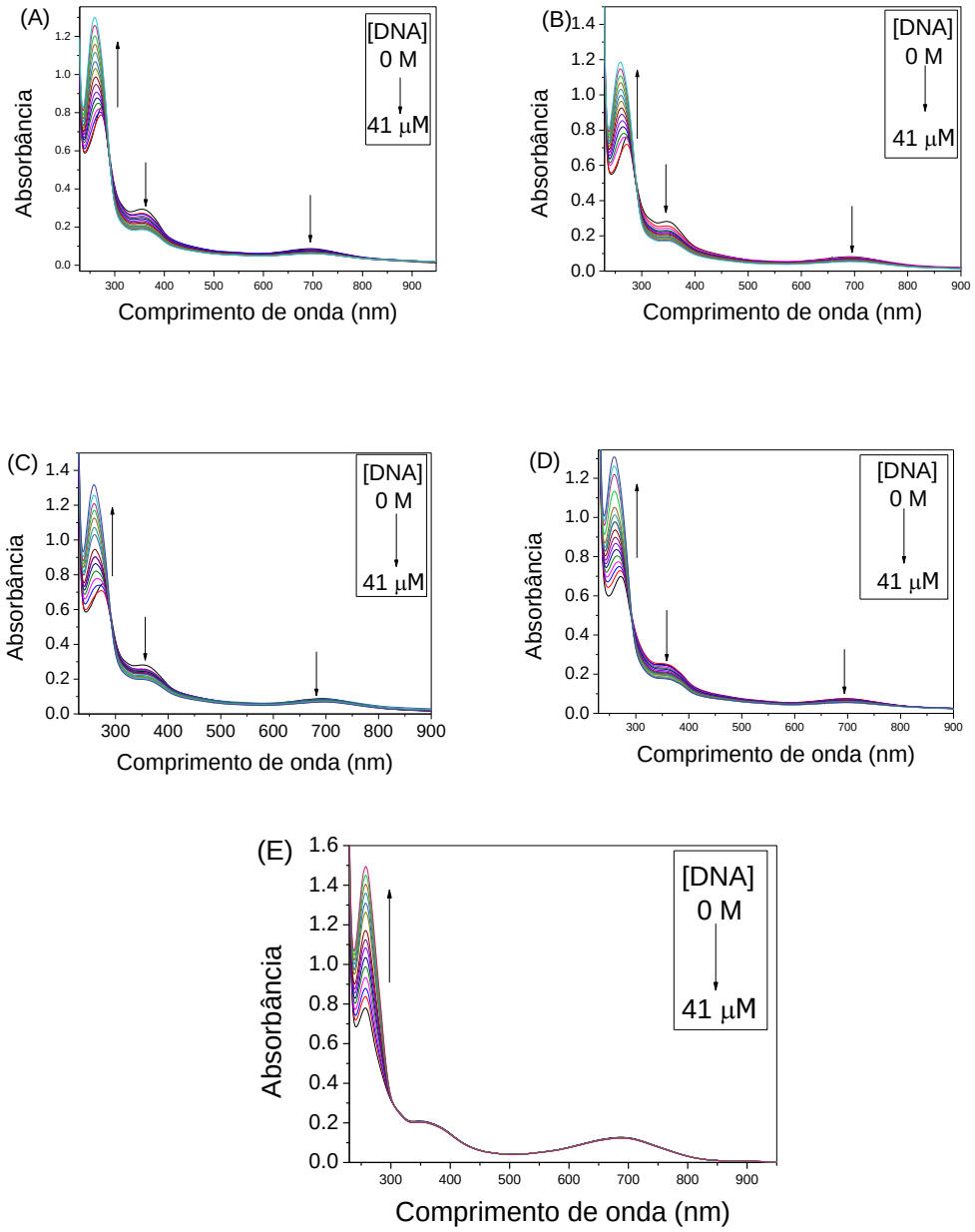
Figura 106: Espectros UV-Vis dos complexos (1-5), (A-E) na presença do meio de cultura celular. Os espectros foram registrados no intervalo de 0 h a 24 h



Fonte: Autora.

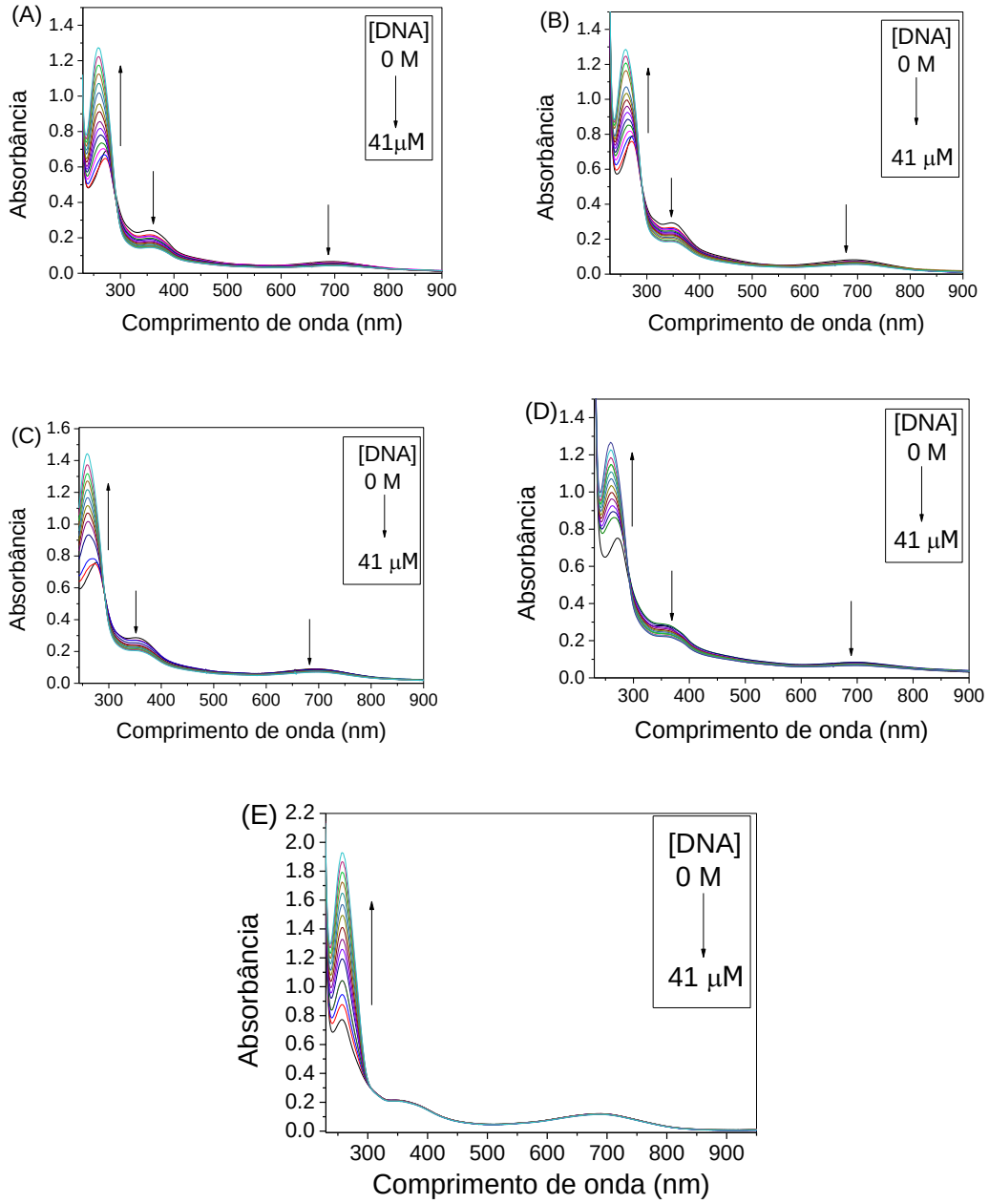
ANEXO XIV

Figura 107: Espectros de absorção na região do UV-Vis registrados da titulação espectrofotométrica, a 31ºC, dos complexos (1-5, A-E) com *ct*-DNA



Fonte: Autora.

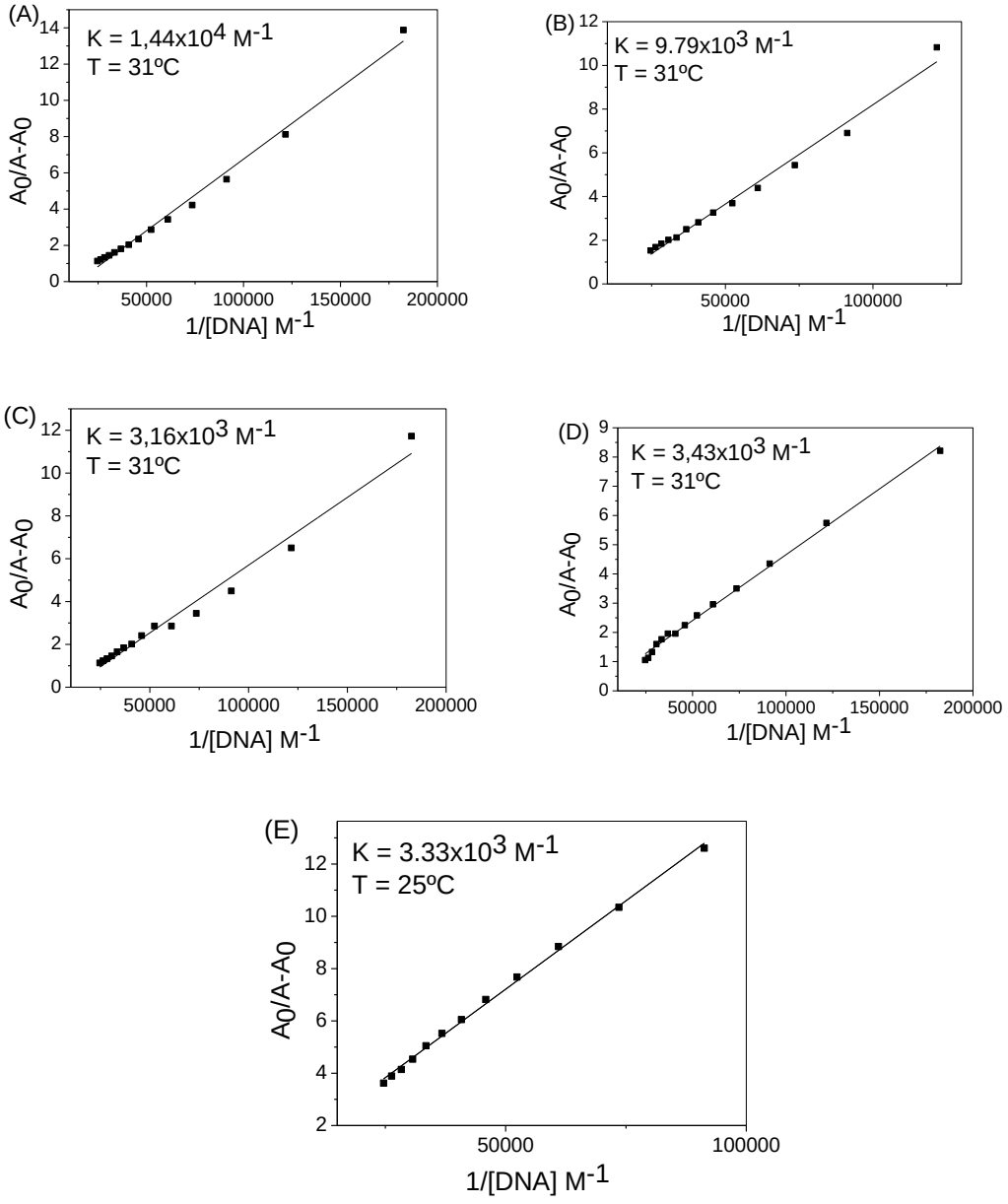
Figura 108: Espectros de absorção na região do UV-Vis registrados da titulação espectrofotométrica, a 37ºC, dos complexos (1-5, A-E) com *ct*-DNA



Fonte: Autora.

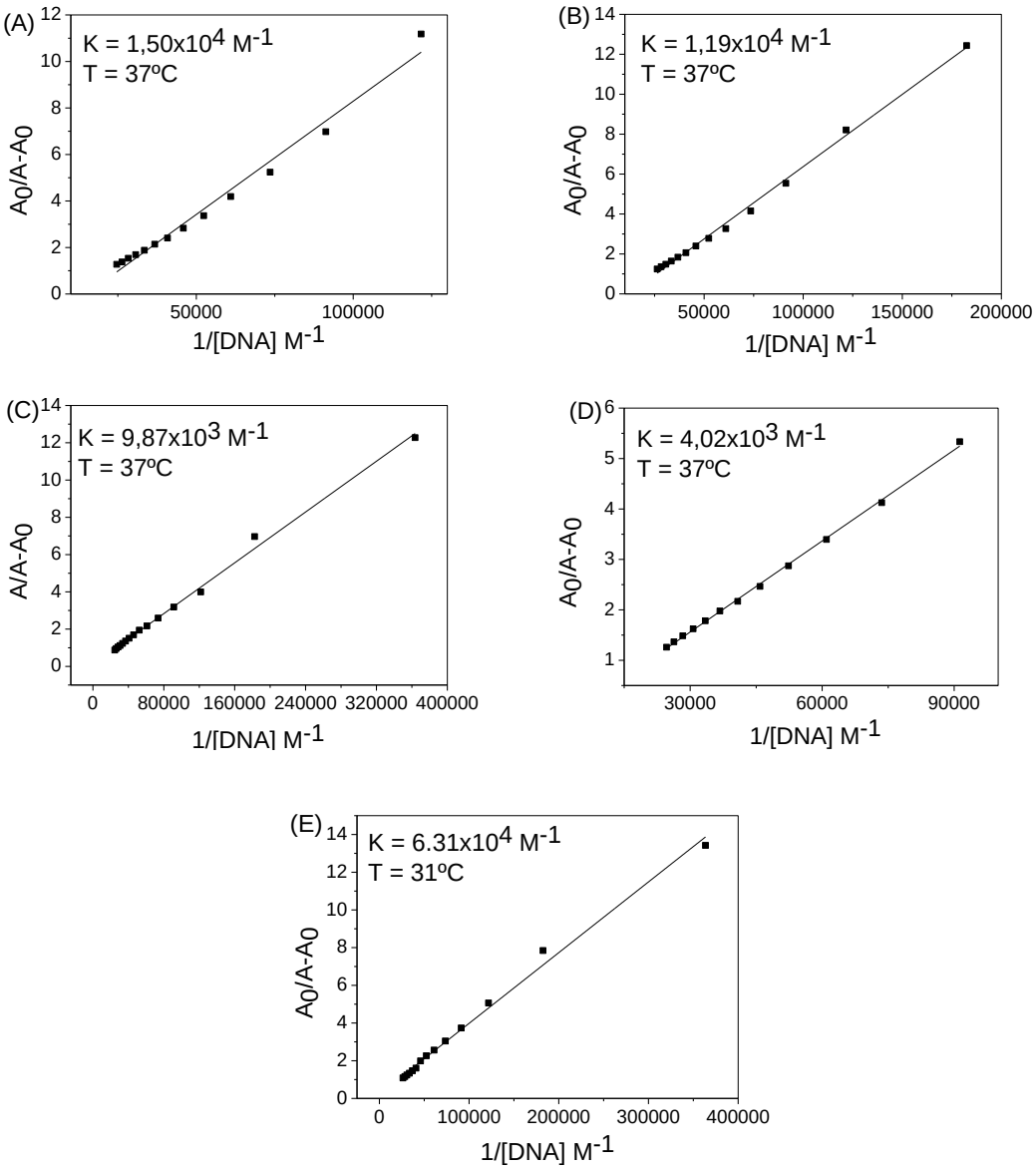
ANEXO XV

Figura 109: Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos complexos (1-5, A-E) durante a titulação com o *ct*-DNA a 31ºC



Fonte: Autora.

Figura 110: Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos complexos (1-5, A-E) durante a titulação com o *ct*-DNA a 37ºC



Fonte: Autora.

ANEXO XVI

Tabela 20: Dados de Viscosidade para o EtBr

[EtBr]/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	235	235	235	235 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	300.8	300.8	300.9	300.8	65.8 η_0	1
0.05	324	330	332	329	94	1.42
0.10	332	330	331	331	96	1.46
0.15	347	337	340	341	106	1.61
0.20	346	357	352	352	117	1.76
0.25	354	356	355	355	120	1.83

Tabela 18: Dados de Viscosidade para o complexo (1)

[dppn]/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	235	235	235	235 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	300.8	300.8	300.9	300.8	65.8 η_0	1
0.05	320	319	319	319	84.2	1.28
0.10	318	320	322	320	84.9	1.29
0.15	325	325	324	324	89	1.36
0.20	333	332	330	331	96.7	1.47
0.25	336	334	335	335	100.01	1.52

Tabela 22:Dados de Viscosidade para o complexo (2)

[dppz]/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	239	239	239	239 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	330	330	330	330	91 η_0	1
0.05	337	336	337	337	98.3	1.08
0.10	347	346	345	346	107.3	1.18
0.15	343	344	343	344	105.6	1.16
0.20	350	353	352	352	113.7	1.25
0.25	348	352	351	350	111.9	1.23

Tabela 23: Dados de Viscosidade para o complexo (3)

[dppzCH$_3$]/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	237	237	235	237 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	312	312	311	312	75 η_0	1
0.05	318	318	320	319	82.5	1.10
0.10	326	324	324	325	88.5	1.18
0.15	330	326	328	327	90	1.20
0.20	329	330	332	329	92.2	1.23
0.25	329	330	330	330	93.7	1.25

Tabela 19: Dados de Viscosidade para o complexo (4)

[dppzCl/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	236	236	237	236 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	310	310	310	310	74 η_0	1
0.05	313	315	313	314	78.4	1.06
0.10	320	319	319	319	82.8	1.12
0.15	323	323	325	324	88.06	1.19
0.20	321	323	324	323	87.32	1.18
0.25	322	324	322	322	85.8	1.16

Tabela 25: Dados de Viscosidade para o complexo (5)

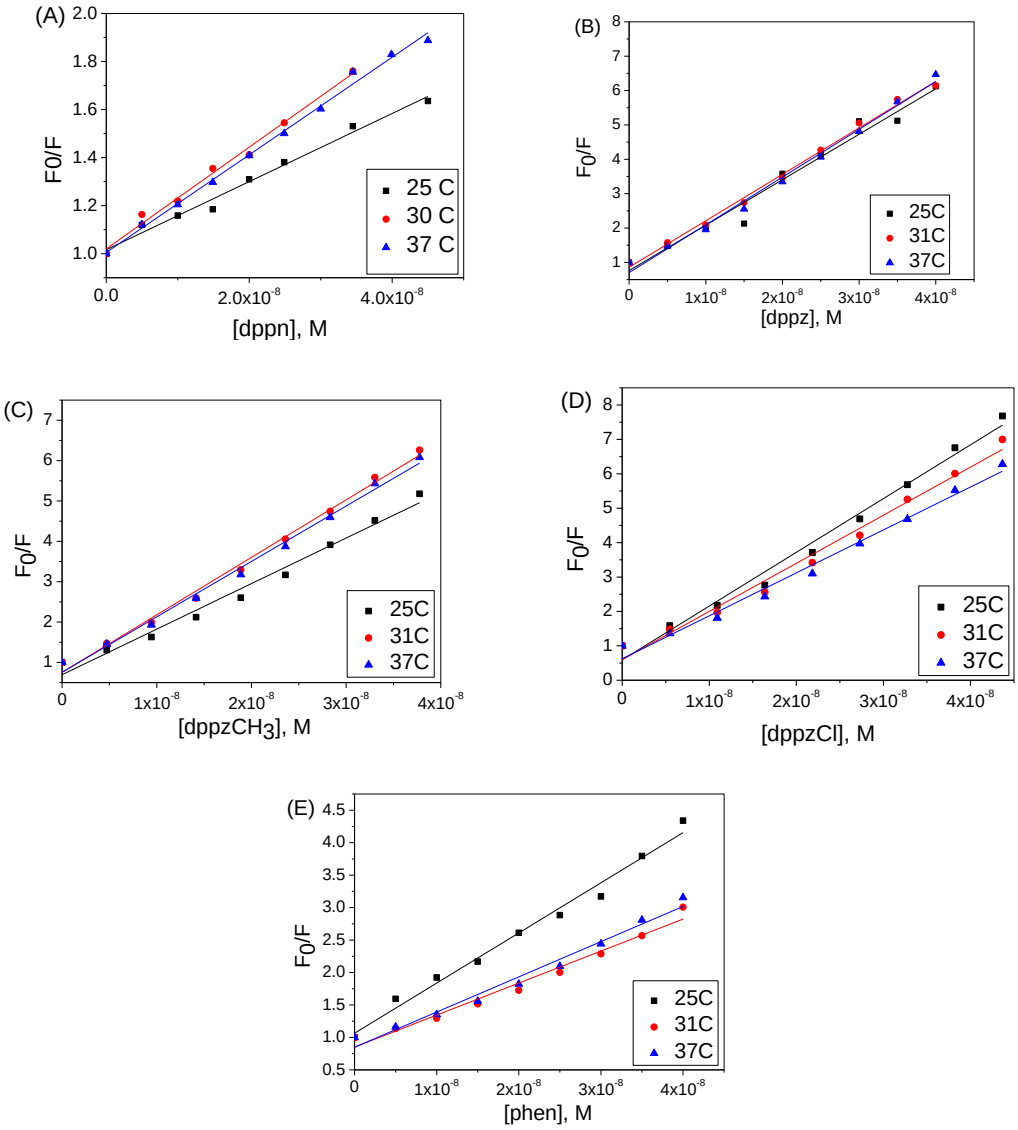
[phen]/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	237	237	235	237 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	312	312	311	312	75 η_0	1
0.05	315	314	315	315	78	1.04
0.10	316	316	315	316	79.5	1.06
0.15	318	316	317	317	80.3	1.07
0.20	315	316	315	315	78.7	1.05
0.25	320	318	316	318	81.7	1.09

Tabela 26: Dados de Viscosidade para o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$

$[Ru(bpy)_3]^{2+}$/ [DNA]	t_1	t_2	t_3	Time Average (s)	$(t - t_0)$	$(\eta/\eta_0)^{1/3}$
Buffer only	239	239	239	239 t_0	---------	----------
Buffer + DNA	330	330	330	330	91 η_0	1
0.05	327	328	328	328	89.2	0.98
0.10	324	327	326	326	87.4	0.96
0.15	330	333	333	333	94.6	1.04
0.20	329	328	329	329	90.1	0.99
0.25	333	333	331	333	97.7	1.03

ANEXO XVII

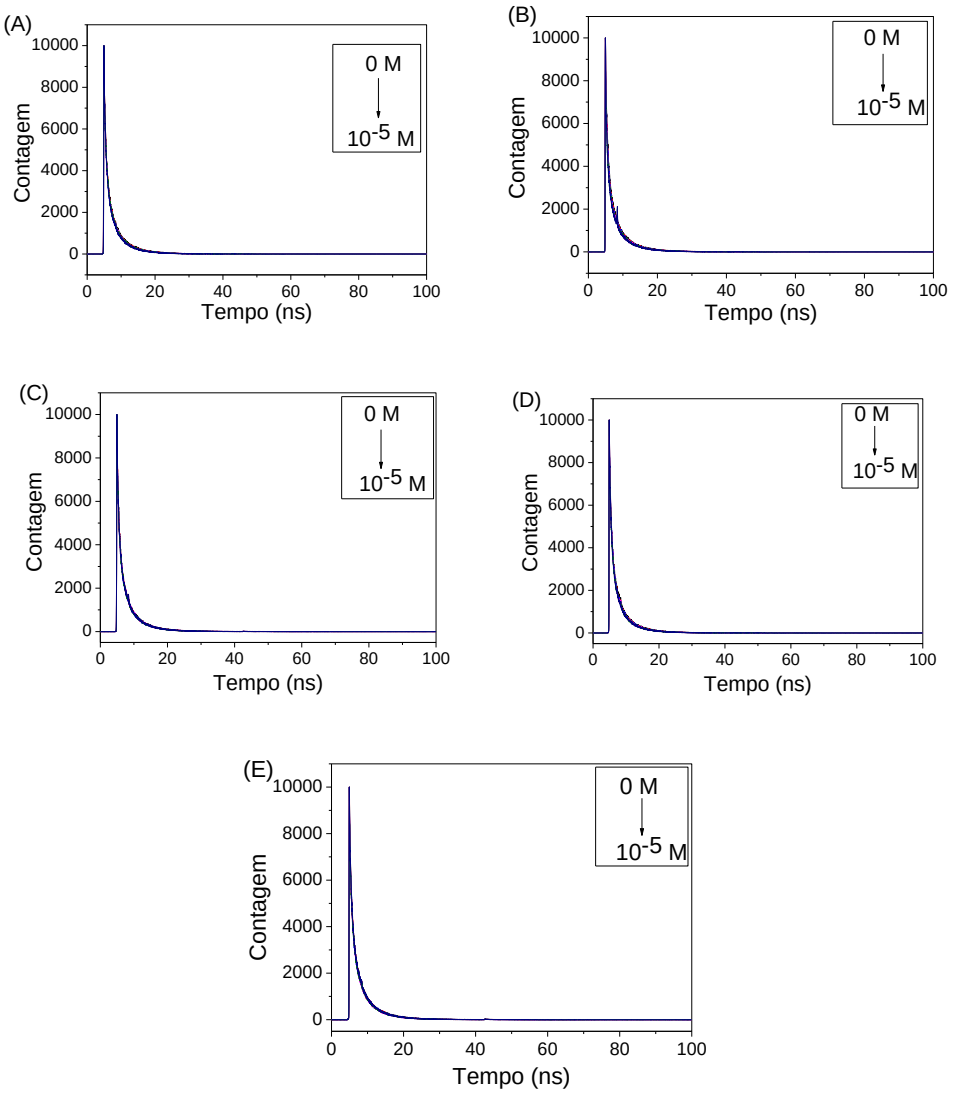
Figura 111: Curvas de Stern-Volmer (F_0/F x [complexo]) da supressão da fluorescência da HSA (λexc= 280 nm) para diferentes concentrações dos complexos (1-5, A-E) em diferentes temperaturas de incubação (25, 31 e 37 ºC)



Fonte: Autora.

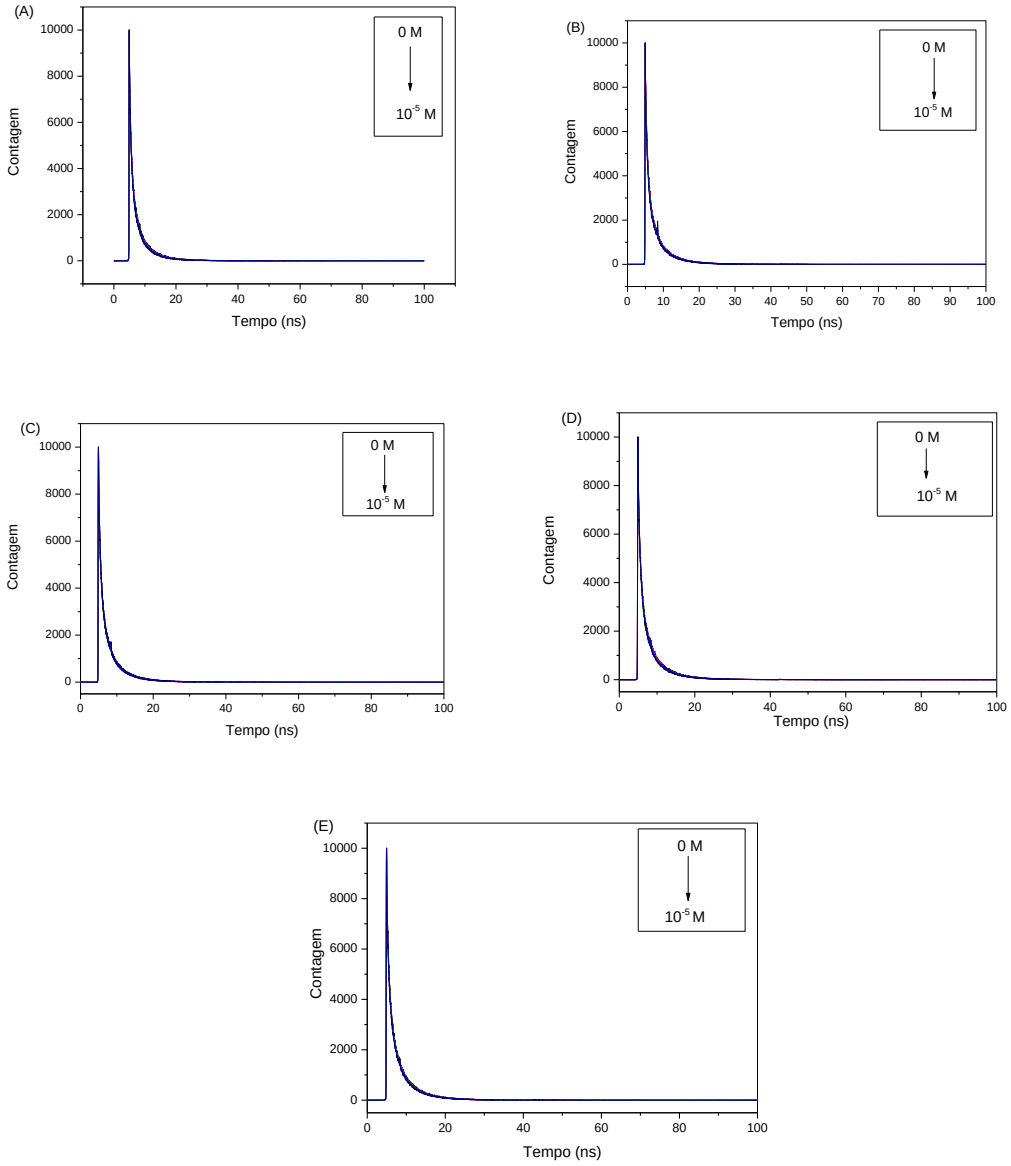
ANEXO XVIII

Figura 112: Perfil de decaimento da fluorescência da interação entre os complexos (1-5, A-E) e HSA, em tampão tris (pH=7,2), λexc = 295 nm, à 31 ºC



Fonte:Autora.

Figura 113: Perfil de decaimento da fluorescência da interação entre os complexos (1-5, A-E) e HSA, em tampão tris (pH=7,2), λexc = 295 nm, à 37 ºC



Fonte: Autora.