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

“Estudo de um complexo trinuclear de rutênio como potencial liberador de óxido nítrico”.

Natacha Cacita

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

Área: **Química**

Orientadora: Profa. Dra. Sofia Nikolaou

RIBEIRÃO PRETO -SP

2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Cacita, Natacha

Estudo de um complexo trinuclear de rutênio como potencial liberador de óxido nítrico. Ribeirão Preto, 2013.

106 p.; 30 cm

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

Orientadora: Nikolaou, Sofia.

1. Cluster trinuclear de rutênio. 2. Espectroscopia. 3. Eletroquímica. 4. Fotólise. 5. Interação com HSA.

Nome: CACITA, Natacha

Título: Estudo de um complexo trinuclear de rutênio como potencial liberador de óxido nítrico

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha mãe, Suely e meu pai Laercio, por todo apoio, dedicação, carinho e incentivo.

Ao meu noivo Rafael, pelo carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Profa. Dra. Sofia Nikolaou por me aceitar como sua aluna, por todos os ensinamentos, dedicação e compreensão.

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

Ao Prof. Dr. Elia Tfouni pelo uso dos equipamentos do laboratório.

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

Aos amigos de laboratório Caroline, Fabiana, Felipe, Joana, Jorge, Joicy, Lilian, Loyanne, Mariana, Renata, Simone, Stephanie e Tassiele, pelo apoio, conversas e descontração.

Às minhas amigas do Departamento de Química, Marcella, Priscila, Olímpia, Bianca, pelos almoços divertidos, conselhos e risadas.

Ao meu noivo Rafael Pietro, pelo amor e carinho, além da paciência e apoio em todos os momentos, tornando mais fácil superar as dificuldades encontradas pelo caminho.

Às minhas grandes amigas Paula e Fabiana pelo apoio e momentos de descontração.

À minha irmã, Nádia, minha avó Iracy, meu sogro, Hamilton, e minha sogra, Rose, pelo apoio e incentivo, ao meu cunhado Gabriel pelas caronas e incentivo.

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

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

"Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas."

Luís Fernando Veríssimo

Cacita, Natacha. **Estudo de um complexo trinuclear de rutênio como potencial liberador de óxido nítrico**. 2013. 106p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar um novo complexo trinuclear de rutênio, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, através de rotas sintéticas previamente descritas na literatura para complexos análogos.

Para a obtenção deste complexo, foram necessárias cinco etapas de síntese, cada qual gerando o precursor da etapa seguinte. Os complexos precursores $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e voltamétricas. Para o complexo de interesse, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, além da caracterização por técnicas espectroscópicas e voltamétricas, foram realizados estudos de fotólise e de interação com albumina de soro humano (HSA).

Pelas técnicas espectroscópicas, pudemos ratificar as estruturas propostas tanto para o nitrosilo quanto para os precursores estudados.

Para a caracterização do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho verificamos a coordenação do ligante NO ao centro metálico $[\text{Ru}_3\text{O}]$, devido ao estiramento característico deste ligante. Os espectros de absorção UV-vis e RMN mostraram que existe uma forte interação entre o elétron desemparelhado do centro metálico e o elétron do ligante NO. Pelos estudos de voltametria cíclica, observamos que os processos redox envolvendo o ligante NO, são compartilhados com o centro metálico.

A fotólise do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, mostrou-se eficiente, uma vez que a liberação fotoinduzida do NO ocorreu na região do visível e em pH fisiológico.

Pelos estudos de supressão de fluorescência, observamos que o complexo realmente interage com a HSA na proporção de 1:1, na região em que se encontra o resíduo de triptofano.

Palavras chave: complexo trinuclear de rutênio, óxido nítrico, espectroscopia, fotólise, albumina de soro humano.

Cacita, Natacha. **Study of nitric oxide photorelease from a trinuclear ruthenium cluster**. 2013. 106p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Abstract

The aim of the present study was synthesize and characterize a new trinuclear ruthenium complex, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, via synthetic routes previously described in the literature for analogous complexes.

To obtain this complex, it took five synthetic steps, each one yielding a precursor for the next step. The precursor complexes $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ and $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, were characterized by spectroscopic and voltammetric techniques. For the complex of interest, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, in addition to characterization by spectroscopic and voltammetric studies, it was carried out photolysis and interaction with human serum albumin.

By spectroscopic techniques, we could confirm the proposed structures for both the nitrosyl and precursors.

For characterization of the complex $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, infrared spectroscopy allowed us to verify that the ligand coordination to the metal center $[\text{Ru}_3\text{O}]$, due to the characteristic stretching band of that ligand. The absorption spectra of UV-vis and NMR showed that there is a strong interaction between the unpaired electron of the metal center and the NO ligand. By cyclic voltammetry studies, we observed that the redox processes involving the NO ligand are shared with the metal center processes.

The photolysis of the complex $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, was efficient, since the photoinduced release of NO occurred in the visible region and at physiological pH.

By fluorescence quenching studies, we observed that the complex actually interacts with the HSA in a 1:1 ratio, in the region which is the residue of tryptophan.

Keywords: Trinuclear ruthenium cluster, spectroscopy, nitric oxide, flash photolysis, human serum albumin.

Lista de figuras

Figura 1: Reação de formação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6\text{L}_3]$	3
Figura 2: Diagrama qualitativo de orbitais moleculares para complexos trinucleares de rutênio com simetria (A) D_{3h} e (B) C_{2v}	5
Figura 3: Diagrama de orbital molecular do óxido nítrico.	7
Figura 4: Formação endógena do óxido nítrico a partir da oxidação da L-arginina.....	7
Figura 5: Esquema da ligação do NO com um metal quando ocorre retrodoação.....	8
Figura 6: Esquema do diagrama de orbitais moleculares para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{NO})]$	10
Figura 7: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{NO})]$ (10^{-3} mol/L) em acetonitrila	10
Figura 8: Sequência dos aminoácidos da HSA, mostrando os domínios I a III respectivamente em azul, verde e vermelho, com suas respectivas alças interligadas por ligações dissulfeto.	12
Figura 9: Representação da estrutura terciária da HSA, com a representação de seus domínios e subdomínios.....	13
Figura 10: Acompanhamento da reação de síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CO})]$	25
Figura 11: Placas de cromatografia em camada delgada variando-se a fase móvel, 1, 2 e 3 referem-se respectivamente aos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	26
Figura 12: Coluna cromatográfica de alumina neutra empacotada em diclorometano, fase móvel B (70% de diclorometano e 30% de acetonitrila).	28
Figura 13: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ (10^{-2} mol L^{-1}) em solução de acetonitrila deuterada.....	34
Figura 14: Espectro COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ (10^{-2} mol L^{-1}) em solução de acetonitrila deuterada.....	35
Figura 15: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.....	36
Figura 16: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.....	37
Figura 17: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.	38

Figura 18: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.	39
Figura 19: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.	40
Figura 20: Espectro de COSY o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.	41
Figura 21: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$	42
Figura 22: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$	43
Figura 23: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	45
Figura 24: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$	46
Figura 25: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ ($4,98 \times 10^{-5}$ mol/L) em acetonitrila.	48
Figura 26: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ ($6,19 \times 10^{-5}$ mol/L) em acetonitrila.	49
Figura 27: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ ($8,83 \times 10^{-5}$ mol/L) em acetonitrila.	49
Figura 28: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{NO}]^+$ (1×10^{-3} mol/L) em acetonitrila.	50
Figura 29: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$	53
Figura 30: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{CO}]$	54
Figura 31: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	54
Figura 32: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{NO}]^+$	55
Figura 33: Gráfico de $E_{1/2}$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{ac})_6(\text{L})_3]^+$ versus pKa de ligantes N-heterocíclicos (pz=pirazina, mpz=metilpirazina, dmpz=2, 6-dimetilpirazina, ampz=aminopirazina, acpy=4-acetilpiridina, adpy=isonicotinamida, py=piridina, t bpy=4-terc-butilpiridina, ampy=4-aminopiridina).	59
Figura 34: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ ($1,18 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.	60
Figura 35: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ ($1,08 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.	61

Figura 36: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ ($1,29 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.	61
Figura 37: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ ($0,977 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag ⁺) em acetonitrila, após purificação em coluna cromatográfica. ..	62
Figura 38: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($0,966 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.	62
Figura 39: Cronoamperograma obtido durante a calibração do NOmeter, solução tampão (6 mL, pH=7,4).....	64
Figura 40: Curva analítica da calibração do NOmeter.	65
Figura 41: Cronoamperograma de liberação de NO em tampão fosfato (pH=7,4) para diferentes comprimentos de onda de irradiação (377, 447, 532 e 660 nm).	66
Figura 42: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de acetonitrila durante a fotólise com irradiação em 377 nm, registrados de 5 em 5 minutos.	67
Figura 43: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de acetonitrila durante a fotólise com irradiação em 447 nm, registrados de 5 em 5 minutos.	68
Figura 44: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de acetonitrila durante a fotólise com irradiação em 532 nm, registrados de 5 em 5 minutos.	68
Figura 45: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,49 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de tampão fosfato durante a fotólise com irradiação em 377 nm, registrados de 2 em 2 minutos.	69
Figura 46: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,49 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de tampão fosfato durante a fotólise com irradiação em 447 nm, registrados de 2 em 2 minutos.	70
Figura 47: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,49 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de tampão fosfato durante a fotólise com irradiação em 532 nm, registrados de 2 em 2 minutos.	70
Figura 48: Espectro de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução de tampão fosfato com pH=7,4 à 30°C variando-se o tempo de incubação de 5 em 5 minutos.	73

Figura 49: Variação da absorbância em 452 nm em função da variação do tempo em minutos de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão pH=7,4, incubados à 30°C.	74
Figura 50: Variação da absorbância em 452 nm em função da variação do tempo em minutos de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão pH=7,4, incubados à 30°C.	74
Figura 51: Espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L) em diferentes tempos de incubação à 30°C.	75
Figura 52: Variação da absorbância em 452 nm em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30°C.....	76
Figura 53: Variação da absorbância em 680 nm em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30°C.....	76
Figura 54: Variação da emissão de fluorescência em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30°C, quando excitados em 280 nm.	77
Figura 55: Variação da emissão de fluorescência em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30°C, quando excitados em 295 nm.	78
Figura 56: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 25°C) para $\lambda_{\text{exc}}=280$ nm.	79
Figura 57: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 25°C) para $\lambda_{\text{exc}}=295$ nm.....	79
Figura 58: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 30°C) para $\lambda_{\text{exc}}=280$ nm.....	80
Figura 59: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 30°C) para $\lambda_{\text{exc}}=295$ nm.....	80

mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 30°C) para $\lambda_{exc}=295$ nm.....	80
Figura 60: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 35°C) para $\lambda_{exc}=280$ nm.	81
Figura 61: Espectro de emissão de fluorescência da HSA em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 35°C) para $\lambda_{exc}=295$ nm.	81
Figura 62: Curvas da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar [supressor]/[HSA] para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{exc}=280$ e 295 nm), na temperatura de incubação de 25°C.....	82
Figura 63: Curvas da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar [supressor]/[HSA] para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{exc}=280$ e 295 nm), na temperatura de incubação de 30°C.....	83
Figura 64: Retas da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar [supressor]/[HSA] para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{exc}=280$ e 295 nm), na temperatura de incubação de 35°C.....	83
Figura 65: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C).	85
Figura 66: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) com $\lambda_{exc} = 295$ nm e $\lambda_{em} = 340$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C).	85
Figura 67: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C), levando em consideração o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s).....	86
Figura 68: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA diferentes concentrações do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{exc} = 295$ nm e $\lambda_{em} = 340$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C), levando em consideração o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s).....	87

Figura 69: Equação logarítmica (2) da supressão da fluorescência da HSA na presença do agente supressor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C).....	89
Figura 70: Equação logarítmica (2) da supressão da fluorescência da HSA na presença do agente supressor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C).....	90
Figura 71: Gráfico de van't Hoff para pH=7,4, HSA (10^{-6} molL ⁻¹) e $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm.	92
Figura 72: Gráfico de van't Hoff para pH=7,4, HSA (10^{-6} molL ⁻¹) e $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm.	93

Lista de tabelas

Tabela 1: Proporção dos solventes utilizados na preparação das fases móveis para o teste cromatográfico	27
Tabela 2: Dados obtidos pela análise dos espectros de ^1H -RMN para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L}')^+]^+$, obtidos em solução de acetonitrila deuterada	31
Tabela 3: Dados obtidos pela análise dos espectros de ^1H -RMN para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L}')^+]^+$, obtidos em solução de acetonitrila deuterada	33
Tabela 4: Valores dos coeficientes de absorvidade molar dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, e os complexos análogos já descritos na literatura	51
Tabela 5: Atribuição tentativa das bandas dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{L}]$ no espectro de infravermelho.....	56
Tabela 6: Valores das vibrações $\nu(\text{NO})$ para complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$, e os respectivos pK_a dos ligantes L	57
Tabela 7: Valores de $E_{1/2}$ e atribuição tentativa dos processos redox dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L})]$	59
Tabela 8: Quantidade de NO liberado (mol/L) em cada comprimento de onda irradiado.....	66
Tabela 9: Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante de velocidade de supressão bimolecular (k_s) para diferentes temperaturas de incubação.....	87
Tabela 10: Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação do supressor (n), (coeficiente de correlação $R = 0,998$)	90
Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos da interação entre o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ e HSA	93

Lista de abreviaturas e siglas

BSA	Albumina de soro bovino
HSA	Albumina de soro humano
UV	Ultra-violeta
RMN	Ressonância magnética nuclear
TBAH	Hidróxido de tetrabutilamônio
F_{cor}	Intensidade de fluorescência corrigida
F_{obs}	Intensidade de fluorescência observada
A_{em}	Absorbância no comprimento de onda de emissão
A_{ex}	Absorbância no comprimento de onda de excitação
δ	Deslocamento químico (ppm)
TCCL	Transição de transferência de carga cluster-ligante
IC	Transição intracluster
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência de supressor
F	Intensidade de fluorescência na presença de supressor
[S]	Concentração do supressor
τ_0	Tempo de vida do fluoróforo no estado excitado
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
k_s	Constante de velocidade de supressão bimolecular
n	Número de potenciais sítios de ligação à HSA
K_b	Constante de ligação aparente do supressor à HSA

K_{dif}	Constante de difusão
ΔG	Variação da energia livre
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação da entropia
T	Temperatura em Kelvin
R	Constante dos gases ($8,31447 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	15
3. Parte Experimental.....	16
3.1.1 Síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{PF}_6$	16
3.1.1 Síntese do complexo simétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]\text{PF}_6$	16
3.1.2 Síntese do complexo assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$	17
3.1.3 Síntese do complexo assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$	17
3.1.4 Síntese do complexo assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$	18
3.2 Materiais e Reagentes.....	19
3.3 Condições Experimentais.....	20
3.3.1 Análise Elementar.....	20
3.3.2 Espectroscopia vibracional da região do infravermelho	20
3.3.3 Espectroscopia eletrônica.....	20
3.3.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	20
3.3.5 Espectrometria de massas.....	21
3.3.6 Voltametria cíclica	21
3.3.7 Fotólise	21
3.3.8 Interação com albumina humana	22
Resultados e discussão	24
4.1 Discussão sobre a Síntese, Purificação e Resultados de Análise Elementar.....	24
4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	29
4.3 Espectrometria de Massas	42
4.4 Espectroscopia Eletrônica	47
4.5 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	53
4.6 Voltametria Cíclica	58

4.7	Fotólise.....	64
4.8	Estudo de Interação com a Proteína Albumina Humana (HSA).....	72
5.	Considerações Finais.....	94
	Referências	96

Introdução

1.1 Metalofármacos

Desde a descoberta da utilização do rutênio como metalofármaco, vários estudos estão sendo desenvolvidos a fim de sintetizar novos compostos que possam ser utilizados no tratamento de várias doenças, entre elas o câncer.

O desenvolvimento de metalofármacos visa substituir drogas utilizadas atualmente, devido à suas características que podem aumentar a atividade de determinada droga, assim como reduzir os efeitos colaterais (SILVA, 2010).

Os metais utilizados em metalofármacos são, geralmente, metais de transição, como por exemplo o rutênio. Esses metais apresentam algumas características, como a diversidade estrutural, uma grande variedade de geometrias e número de coordenação, além de uma variedade de estado redox acessíveis em meio fisiológico (RIJIT; SADLER, 2009).

Um metalofármaco muito utilizado no tratamento de câncer é a cis-platina (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]). Este composto pode ser considerado o precursor para o desenvolvimento de novas drogas baseadas em metais de transição.

A utilização do rutênio surgiu como uma alternativa para a substituição de compostos de platina, uma vez que pode mimetizar as propriedades da mesma, porém com menos efeitos de toxicidade sistêmica. Uma ampla gama de fármacos a base de rutênio pode ser encontrado descritos na literatura (GIELEN; TIEKINK, 2005; JONES; THORNBAC, 2005; ANG; DYSON, 2006; RONCONI; SADLER, 2007; JAKUPEC et al., 2008; GIANFERRARA et al., 2009; RIJIT; SADLER, 2009; BERGAMO; SAVA, 2011; NAZAROV et al., 2012).

As metalodrogas de rutênio, além de possuírem propriedades de inibição do crescimento de tumores, demonstraram aplicação em outros tratamentos, como supressor imunológico, captadores de óxido nítrico, fotossensibilizador, ação antimicrobiana e antimalárica (GIELEN; TIEKINK, 2005; JONES; THORNBAC, 2005).

Embora o rutênio não seja produzido endogenamente, nem seja um metal essencial para o organismo humano, na tabela periódica faz parte da família do ferro, compartilhando assim algumas propriedades com os metais dessa família, além de poder alcançar vários estados de oxidação em meio fisiológico, diminuindo

assim sua toxicidade. Essa semelhança explica a capacidade do rutênio de se ligar à proteínas como a albumina humana (HSA) e a transferrina, presentes no organismo humano. Estas são as principais proteínas transportadoras e armazenadoras do sangue e podem ser consideradas como os primeiros agentes de ligação para metalofármacos, quando administrados de maneira intravenosa (CARTER; HO, 1994; SUN et al., 1999; ANG; DYSON, 2006; SILVA, 2010).

A atividade desses metalofármacos depende de vários fatores, entre eles o ambiente do ligante, a geometria de ligação e das propriedades redox do centro metálico (REISNER et al., 2008). Em termos de rutênio, compostos com apenas um íon rutênio no estado de oxidação II ou III são os mais comuns. O íon rutênio no estado de oxidação III demonstra maior estabilidade em relação ao estado de oxidação II, desde que não esteja coordenado a ligantes π -receptores, que estabilizam o estado de oxidação II (JONES; THORNBACKE, 2005).

Compostos como NAMI-A (imidazolium *trans*-[tetrachloro (dimethylsulfoxide) (1H-imidazole)ruthenate(III)]) e KP1019 (indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III)]), são exemplos de complexos de rutênio que estão em fase de testes clínicos para o tratamento de câncer. Outro exemplo de aplicação para complexos de rutênio é no tratamento de pessoas com tuberculose. O tratamento convencional além de ser longo e caro, apresenta efeitos colaterais severos e a bactéria responsável pela doença tem demonstrado resistência. Desse modo, pesquisas estão sendo desenvolvidas para encontrar um tratamento alternativo. Compostos a base de rutênio e ouro têm sido estudados e se mostraram bastante promissores, quando comparados a drogas já utilizadas nesse tratamento (NASCIMENTO, et al., 2008; PAVAN et al., 2010, 2011; SANTOS, et al., 2013).

1.2 Complexos trinucleares de rutênio

A formação de complexos trinucleares de rutênio pode ser considerada uma reação de auto-organização. Ao reagir $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ com $\text{NaRCOO} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ em etanol e com o respectivo ácido carboxílico (SPENCER, A.; WILKINSON, G., 1972; BAUMANN et al., 1978), Figura 1, os íons de rutênio se auto-organizam em um

arranjo trigonal, ligados em ponte pelo átomo central de oxigênio e pelos grupos acetatos. A esfera de coordenação se completa com moléculas de solvente (H_2O ou metanol), ou com ligantes terminais N-heterocíclicos (TOMA et al., 2001).

Figura 1: Reação de formação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6\text{L}_3]$ (NIKOLAOU, 2002).

Complexos simétricos e assimétricos podem ser facilmente preparados, pois as moléculas do solvente são lábeis, assim podem ser substituídas por uma grande variedade de ligantes (SPENCER; WILKINSON, 1972, 1974; BAUMANN et al., 1978; TOMA et al., 1988; TOMA; CIPRIANO, 1989; ALEXIOU, 1993; ABE et al., 1995).

Cotton e Norman realizaram estudos de difração de raio X (COTTON; NORMAN, 1972), e demonstraram que a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ possui estrutura planar, com geometria de um triângulo eqüilátero, onde o átomo de oxigênio se encontra no centro da estrutura, e as ligações Ru-O-Ru formam ângulos de 120° . Em complexos nos quais um dos ligantes é CO ou isocianeto, essa estrutura é melhor descrita por um triângulo isóceles, devido a distorções causadas pelo ligante (ABE et al., 1996; OTA et al., 1999).

Uma forte deslocalização eletrônica no centro $[\text{Ru}_3\text{O}]^{m+}$ em complexos trinucleares de rutênio foi observada, e relatada na literatura, e foi determinado que as ligações Ru-Ru, Ru-O_{central} e Ru-O_{acetato} não são sensíveis a mudanças no estado de oxidação do íon metálico (TOMA et al., 2001). Esta forte deslocalização eletrônica pode ser explicada pelo diagrama de orbitais proposto por Cotton (COTTON; NORMAN, 1972), discutida posteriormente por outros autores (BAUMANN et al., 1978; ALEXIOU, 1993; NIKOLAOU, 2002; TOMA et al., 2002).

O diagrama de orbitais moleculares foi construído para complexos de simetria D_{3h} , $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{Ac})_6(\text{L})_3]^+$, ou seja complexos simétricos. De acordo com este modelo, o átomo central de oxigênio é considerado com simetria sp^2 , formando uma ligação σ com cada átomo de Ru, e deixando um orbital com simetria π (p_z) livre para interagir com os orbitais d_{yz} dos três íons de rutênio, gerando dois orbitais degenerados e'' não ligantes e dois orbitais moleculares a_2'' , um ligante com caráter de oxigênio e um antiligante com caráter metálico.

As interações metal-metal da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são geradas através da mistura dos orbitais d_{xz} - d_{xz} e $(d_{x^2-y^2})$ - $(d_{x^2-y^2})$. A combinação dos orbitais d_{xz} gera dois orbitais ligantes e' e um orbital antiligante a_2' . A combinação dos orbitais $(d_{x^2-y^2})$ origina dois orbitais degenerados e' e um orbital a_1' , todos não ligantes.

Os orbitais $(d_{x^2-y^2})$ também possuem simetria para interagir com os orbitais p dos átomos de oxigênio dos íons carboxilatos ligados em ponte, porém devido à distancia, este tipo de interação foi considerada fraca quando comparada com as interações Ru-O-Ru e Ru-Ru já descritas, assim não foi utilizada para a construção do diagrama de orbitais.

Para completar o diagrama, consideram-se também as interações entre o centro metálico e os ligantes terminais L. Ligantes N-heterocíclicos possuem orbitais π e π^* com simetria para interagir com os orbitais $d\pi$ dos íons rutênio. Em solução, o ligante possui rotação livre, podendo interagir em paralelo ao plano Ru_3O , interagindo com os orbitais a_2'' e e'' , ou perpendicular ao plano Ru_3O , interagindo com os orbitais a_2' ou e' .

Na Figura 2 está representado o diagrama qualitativo para complexos trinucleares de rutênio em simetria D_{3h} e C_{2v} .

Figura 2: Diagrama qualitativo de orbitais moleculares para complexos trinucleares de rutênio com simetria (A) D_{3h} e (B) C_{2v} (NIKOLAOU, 2002).

Para complexos assimétricos, ocorre um abaixamento de simetria, que passa de D_{3h} para C_{2v} , devido à substituição de um dos ligantes L por L', e consequentemente ocorre um desdobramento dos níveis e'' e e' , originando os orbitais a_2+b_1 e a_1+b_2 , respectivamente.

Complexos simétricos do tipo $[Ru_3O(Ac)_6(L)_3]^+$, apresentam estado de oxidação formal $Ru^{III} Ru^{III} Ru^{III}$, apresentando uma configuração eletrônica do tipo $(a_2'')^2(e_1')^4(a_1')^2(e_2')^4(e'')^4(a_2')^1$, com um elétron desemparelhado, tratando-se de uma molécula paramagnética (TOMA et al., 2001).

Tipicamente, esses complexos simétricos, apresentam duas bandas no espectro de absorção, uma ao redor de 700 nm e outra próxima de 300 nm (BAUMANN et al., 1978; DAVIS; DRAGO, 1988; TOMA et al., 1988; TOMA; CIPRIANO, 1989; ABE et al., 1992, 1996; TOMA; ALEXIOU, 1993). A atribuição dessas bandas é baseada no diagrama de orbitais moleculares proposto por Cotton e Meyer (COTTON; NORMAN, 1972; BAUMANN et al., 1978), deste modo a banda

em 700 nm é atribuída a transições da unidade $[Ru_3O]$, ou transições intracluster (IC); e a banda em 300 nm é atribuída a transições de transferência de carga cluster – ligante (TCCL). Alguns complexos apresentam ainda outra banda na região do UV, atribuída a transições internas do ligante N-heterocíclico (ALEXIOU et al., 2000).

1.3 Óxido nítrico e nitrosilos trinucleares de rutênio

Durante muitos anos, a molécula de óxido nítrico proveniente de fontes naturais, como alagados e oceanos, ou de fontes artificiais urbanas e industriais, foi considerado um poluente, associado a problemas ambientais (THIEMENS; TROGLER, 1991; RICHTER-ADDO; LEGZDINS, 1992).

A partir da década de oitenta, após a descoberta das funções biológicas do óxido nítrico (NO), o número de pesquisas sobre esta molécula aumentou significativamente, e vários estudos foram realizados a fim de explorar tais funções, e desenvolver novos medicamentos que influenciam direta ou indiretamente a produção de NO (LUNARDI et al., 2009). Tais funções biológicas vão desde a regulação da pressão sanguínea, passando por processos relacionados a aprendizagem e memória, até processos de defesa do organismo (IGNARRO, LOUIS J. et al., 1999; IGNARRO, L. J., 2000).

Em condições normais de temperatura e pressão (CNP), o óxido nítrico trata-se de um gás incolor e por possuir um elétron desemparelhado, apresenta paramagnetismo (AINSCOUGH; BRODIE, 1995; BECKMAN; KOPPENOL, 1996; THOMAS, 2000), Figura 3.

O elétron desemparelhado do NO ocupa um orbital antiligante, o que gera características particulares a esta molécula. Possui natureza radicalar, evidenciada pela habilidade de reagir com outras espécies que possuem elétrons desemparelhados, como o oxigênio, superóxido e outros (IGNARRO, L. J., 2000).

Figura 3: Diagrama de orbital molecular do óxido nítrico.

Endogenamente, a molécula de NO é sintetizada pela oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MONCADA et al., 1991; MARLETTA, 1993), Figura 4.

Figura 4: Formação endógena do óxido nítrico a partir da oxidação da L-arginina.

O NO produzido pelas células endoteliais possui um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Este NO difunde-se rapidamente para a célula muscular. A difusão rápida e a facilidade com que a molécula penetra em

outras células se dão devido ao seu tamanho (considerada a menor molécula classificada como bio-sinalizador), e suas características lipofílicas (MONCADA et al., 1991; DUSSE; VIEIRA, 1980; FELDMAN; GRIFFITH, 1993).

A molécula de NO possui orbitais σ vazios, fato que facilita a reação desta molécula com metais de transição. A ligação formada entre o NO e um metal de transição tende a ser estável, pois ocorre uma doação de densidade eletrônica dos orbitais σ do NO para o metal. Em alguns casos, dependendo do metal, pode ocorrer uma doação eletrônica dos orbitais d do metal para o orbital π^* da molécula de óxido nítrico, quando isso ocorre, chamamos este processo de retrodoação. Este processo tende a estabilizar ainda mais a ligação metal-NO (RICHTER-ADDO; LEGZDINS, 1992; IGNARRO, LOUIS J. et al., 1999), Figura 5. A retrodoação interfere na força de ligação do óxido nítrico, ou seja, quanto maior a retrodoação, menor a força de ligação do NO e, conseqüentemente, menor a frequência $\nu(\text{NO})$ (RICHTER-ADDO; LEGZDINS, 1992).

Figura 5: Esquema da ligação do NO com um metal quando ocorre retrodoação.

Possíveis aplicações biológicas de complexos nitrosilos, como receptores ou liberadores de NO tem sido estudadas nos últimos anos (BARRETO et al., 2005; SAUAIA, MARÍLIA GAMA et al., 2005; LIMA et al., 2005; ROCHA et al., 2008; FORNARI et al., 2009; SANTANA et al., 2010). Algumas opções para a liberação da molécula de NO proveniente de compostos de coordenação em meio fisiológico, seria a terapia fotodinâmica, que consiste na liberação de NO através de estímulos luminosos, e redução eletroquímica do NO^+ , levando em consideração em ambos os casos, que o NO^0 possui baixa afinidade por centros metálicos em estados de oxidação mais baixos (STOCHEL, GRAYNA et al., 1998).

Na literatura estão relatados apenas dois complexos nitrosilos *trinucleares* de rutênio, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{NO})]^+$ (TOMA et al., 2002) e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{pic})_2(\text{NO})]^+$ (TOMA et al., 2005).

A primeira tentativa de síntese foi feita por Spencer e Wilkinson (SPENCER; WILKINSON, 1974), através do borbulhamento de $\text{NO}_{(g)}$ em uma solução de $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]^+$, mas não se isolou uma espécie pura. Mais recentemente, alguns autores têm se interessado pelo estudo de reações de transferência eletrônica intramolecular em dímeros de valência mista nos quais a presença do ligante NO funciona como uma sonda de infra-vermelho para o monitoramento de tal reação. Já a questão da liberação fotoinduzida de NO foi explorada por Abe e colaboradores, mas não focando aspectos de bioinorgânica e sim visando o desenvolvimento de superfícies funcionais baseadas em monocamadas auto-organizadas em superfícies de eletrodos (YE et al., 2004; ZHOU et al., 2008; ZHANG et al., 2009).

Na última década, os dois nitrosilos de complexos trinucleares de rutênio mencionados acima foram estudados como liberadores de NO para potencial aplicação biológica. As vantagens destes complexos em relação aos liberadores clássicos de NO como o nitroprussiato de sódio é sua alta estabilidade (no que tange a liberação de NO) no escuro, dada a grande interação de emparelhamento eletrônico entre o elétron desemparelhado da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1}$ e o elétron desemparelhado do NO^0 , sua grande banda de absorção na região do visível, que se expande para a janela terapêutica e a presença da espécie NO^0 ao invés de NO^{-2} coordenado ao centro metálico em pH fisiológico.

Nos trabalhos mencionados, foram feitos cálculos preliminares do diagrama de orbitais moleculares para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$, onde L=piridina ou 4-metilpiridina, mostrando que o ligante NO possui uma forte influência sobre diversos níveis de energia, principalmente aqueles envolvendo os orbitais d_{zy} e d_{xz} dos íons rutênio, Figura 6.

Figura 6: Esquema do diagrama de orbitais moleculares para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{NO})]$ (TOMA et al., 2002).

Figura 7: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{NO})]$ (10^{-3} mol/L) em acetonitrila (TOMA et al., 2002).

Na Figura 6, estão representadas as transições (1 a 5) observadas no espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{NO})]^+$, Figura 7. As

transições 1, 2 e 3 envolvem essencialmente orbitais com significativo caráter de NO, enquanto as transições 4 e 5 envolvem orbitais com forte características de metal (TOMA et al., 2002).

1.4 Albumina e interações com metais

Estudar a interação entre macromoléculas biológicas e fármacos geram importantes informações, como sítios de interação, transporte e metabolismo no organismo humano. A fim de desenvolver novas drogas, a interação entre macromoléculas biológicas e complexos de metais de transição tem sido amplamente estudadas nos últimos anos.

No plasma sanguíneo existem diversas proteínas, a mais abundante é a albumina. Esta proteína atua em vários processos fisiológicos, entre eles a regulação da pressão osmótica, transporte, distribuição e metabolismo de diversos ligantes, como por exemplo fármacos, metabólitos e ácidos graxos, além de ser responsável pela regulação do pH. A albumina é sintetizada e liberada pelas células do fígado (KRAGH-HANSEN et al., 2002; KANDAGAL et al., 2006; SHAIKH et al., 2006, 2007; SAMANTA et al., 2011; CHENG, 2012).

Embora existam diversos tipos de albuminas, as mais utilizadas em pesquisas são a albumina humana (HSA) e a albumina bovina (BSA). Esta última é muito utilizada devido a sua semelhança estrutural com a albumina humana, além de ser economicamente mais viável (PAN et al., 2011).

Uma única cadeia de 585 resíduos de aminoácidos constitui a estrutura primária da HSA, o que totaliza uma massa molecular de aproximadamente 66 kD. Esta cadeia peptídica está arranjada de tal forma a apresentar três domínios homólogos, cada qual formado por três alças, que são unidas por ligações dissulfeto (HE; CARTER, 1992; SHAW; PAL, 2008), Figura 8.

Figura 8: Sequência dos aminoácidos da HSA, mostrando os domínios I a III respectivamente em azul, verde e vermelho, com suas respectivas alças interligadas por ligações dissulfeto (GALANTINI et al., 2010).

A estrutura secundária da HSA é formada principalmente por α -hélices, que constituem cerca de 67% da estrutura total, β -folhas, com cerca de 23% da estrutura total e estruturas randômicas, com os 10% restantes (CARTER; HO, 1994).

Utilizando-se a cristalografia de raio-X, foi possível determinar que a HSA apresenta um formato de coração, Figura 9, apresentando uma geometria próxima a de um triângulo equilátero, de lados com aproximadamente 80 Å e profundidade de 30 Å (CARTER; HO, 1994; CURRY et al., 1998; SUGIO et al., 1999; GALANTINI et al., 2010).

Figura 9: Representação da estrutura terciária da HSA, com a representação de seus domínios e subdomínios (KRAGH-HANSEN et al., 2002).

Com os estudos de difração de raio-X também foi possível determinar que a proteína apresenta três domínios homólogos, comumente chamados de I, II e III, e cada um desses domínios é composto por dois subdomínios, chamados A e B. O subdomínio A possui seis α -hélices, e o subdomínio B quatro α -hélices (KRAGH-HANSEN et al., 2002), Figura 8.

Sudlow realizou o que podemos chamar de um trabalho pioneiro, afim de estudar a interação de drogas com a albumina (SUDLOW et al., 1975). Este trabalho foi baseado no deslocamento de sondas fluorescentes, e mostrou que a maioria das drogas de ligam ou ao sítio I ou ao sítio II com alta afinidade. No sítio I ligam-se preferencialmente ácidos dicarboxílicos ou moléculas heterocíclicas volumosas, no sítio II ligam-se preferencialmente ácidos carboxílicos aromáticos carregados negativamente (KRAGH-HANSEN et al., 2002).

Uma característica da composição da albumina é seu baixo teor de triptofano. A HSA apresenta apenas um resíduo desse aminoácido, enquanto a BSA apresenta dois resíduos de triptofano (PETERS, 1996).

Além do aminoácido triptofano, a HSA possui outros dois resíduos de aminoácidos que absorvem na região do ultravioleta (UV) e emitem fluorescência, são eles: fenilalanina e tirosina. Porém grande parte da emissão de fluorescência da HSA é atribuída ao resíduo de triptofano. O resíduo de tirosina contribui, em menor proporção, dependendo do comprimento de onda de excitação. Quando o comprimento de onda de excitação está entre 295 e 305 nm, a tirosina não é excitada, então há apenas fluorescência relativa ao resíduo de triptofano, quando o comprimento de onda de excitação é menor que 295 nm, a fluorescência é relativa aos dois resíduos de aminoácidos, tirosina e triptofano (PETERS, 1996; XIE et al., 2005).

Os resíduos de tirosina estão localizados ao longo dos três domínios da HSA. Já o resíduo de triptofano está localizado no sítio I, subdomínio IIA, que possui características tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas, deste modo este resíduo de aminoácido é o mais utilizado em estudos de supressão de fluorescência (PETERS, 1996).

Para o estudo da interação entre uma droga e a proteína HSA, a técnica de fluorescência é amplamente utilizada, pois é possível determinar de qual resíduo a fluorescência é proveniente, determinando dessa maneira o número de sítios de interação entre a droga e a proteína, o tipo de ligação existente e o mecanismo pelo qual essa ligação ocorre, assim como determinar a distância que esta ligação se encontra do resíduo de triptofano (TAYYAB et al., 1999; KHAN, M. A. et al., 2002; MIN et al., 2004; LAKOWICZ, 2006).

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{OO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, onde 3-pic = 3-metilpiridina ou 3-picolina, através das técnicas:

- Análise Elementar
- Espectroscopia de Infravermelho
- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
- Espectrometria de Massas
- Espectroscopia Eletrônica
- Voltametria Cíclica
- Espectroscopia de Luminescência

Também se pretende verificar a capacidade do complexo de liberar óxido nítrico quando submetido à irradiação em diferentes comprimentos de onda em meio fisiológico e interação do mesmo com a biomolécula albumina humana.

Parte Experimental

Síntese do complexo

3.1.1 Síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{PF}_6$ (SPENCER, A.; WILKINSON, G., 1972; NIKOLAOU, 2002)

Fez-se reagir 5 g de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (MM=356,68; 14 mmol) com 10 g de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (MM= 218,14; 45 mmol) em uma mistura de 125 mL de etanol e 125 mL de ácido acético glacial sob refluxo por 4 horas. A solução resultante ficou em repouso por uma noite, para decantar o excesso de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. O resíduo sólido foi separado por filtração e o filtrado foi rotaevaporado até a formação de um óleo, o qual foi ressuspendido em 100 mL de metanol e rotaevaporado até a secagem (este procedimento foi repetido 3 vezes). Por fim foi adicionado 200 mL de acetona para a precipitação do complexo, e este foi isolado por filtração, lavado com éter etílico e seco ao ar e sob vácuo em dessecador contendo sílica gel, obtendo-se 6,42 g do cluster mãe (MM= 786,56; 8 mmol; $\eta=101\%$).

O rendimento da primeira síntese é maior que 100% porque o produto final é isolado contaminado com $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, que foi adicionado em excesso no início da síntese e não foi totalmente eliminado. A eliminação desse contaminante vai ocorrendo nas etapas subseqüentes.

Síntese do complexo simétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]\text{PF}_6$ (BAUMANN et al., 1978; NIKOLAOU, 2002)

Em um balão de 500 mL fez-se reagir 6,4 g do cluster mãe obtido anteriormente com 43 mL de 3-picolina (MM=93,13; 6 mmol) em 100mL de metanol sob refluxo por 5 minutos. A solução resultante foi resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se 1,3 g de NH_4PF_6 (MM=163, 8 mmol) dissolvido em 13 mL de metanol. O meio reacional foi deixado em geladeira por uma noite e o precipitado foi isolado por filtração e seco ao ar e sob vácuo em dessecador contendo sílica gel. Obteve-se 4,91 g do cluster simétrico (MM=1064,81; 4,6 mmol; $\eta=55\%$).

Síntese do complexo assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$
(BAUMANN et al., 1978; NIKOLAOU, 2002)

Em um balão de 250 mL, dissolveu-se 4,0 g (3,7 mmol) do cluster simétrico em 184 mL de metanol, a solução foi resfriada com banho de gelo e mantida sob agitação durante a adição de 18,5 mL de uma solução aquosa 65% de N_2H_4 . Nesta etapa ocorre à precipitação do cluster reduzido $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^0$, que foi isolado por filtração, lavado com pequenas porções de água, metanol e éter etílico, obteve-se 2,49 g (MM=952,8; η =62%).

Para dar sequência à síntese, 2,3 g (2,4 mmol) do complexo reduzido foram dissolvidas em uma mistura de 40,8 mL de metanol e 114,2 mL de benzeno; a solução foi desaerada com N_2 e fez-se refluxo por 5 horas sob fluxo de CO, gerado pela reação de H_2SO_4 concentrado com HCOOH. O balão que contém a solução foi protegido da luz e a reação foi acompanhada por espectros de absorção, em intervalos de 1 hora, e foi encerrada quando se observou desaparecimento da banda em torno de 900 nm e o surgimento de uma banda em torno de 600 nm. A solução resultante foi deixada em geladeira por uma noite, e o sólido obtido foi isolado por filtração, lavado com éter etílico e seco sob vácuo em dessecador com sílica gel, obteve-se 1,31 g de complexo (MM= 887,74; η =48%).

Síntese do complexo assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$
(BAUMANN et al., 1978; NIKOLAOU, 2002)

Em um balão de 25 mL, 0,84 g (9,5 mmol) do complexo obtido anteriormente foi dissolvido em 111,2 mL de CH_2Cl_2 , e adicionou-se, lentamente e sob agitação, 24,5 mL de uma solução 0,15 mol/L de Br_2 em CH_2Cl_2 . A solução foi agitada por 10 minutos e rotaevaporada até a secagem completa. O resíduo foi dissolvido em 5,6 mL de metanol e ficou sob refluxo por 30 minutos. Foi adicionado cerca de 10x de excesso de NH_4PF_6 dissolvido em metanol, e rotaevaporou-se a solução até a secagem completa. O resíduo foi dissolvido em um volume mínimo de água. O sólido obtido foi isolado por filtração, lavado com éter etílico e seco sob vácuo em dessecador com sílica gel, obtendo-se 1,05 g de complexo (MM= 1022,71; η = 91%). Nesta etapa da síntese, observamos conforme será descrito posteriormente no item 4.1, que o complexo obtido encontrava-se

contaminado. Deste modo fizemos testes de cromatografia em camada delgada para determinar a fase móvel a ser utilizada para eluir o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e dar continuidade à síntese. Após os testes em camada delgada, uma coluna de alumina neutra foi devidamente empacotada em diclorometano e utilizou-se a fase móvel composta por 70% de diclorometano e 30% de acetonitrila para eluir as impurezas, e 70% de acetonitrila e 30% de metanol para eluir o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

**Síntese do complexo assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$
(TOMA, HENRIQUE E. et al., 2002, 2005)**

Uma solução de diclorometano, 33 mL, contendo 0,35 g do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ foi desaerada durante 20 minutos com argônio, em seguida foi borbilhado NO durante 2 horas (gerado através da reação de ácido nítrico e pastilhas de cobre, passado por uma solução concentrada de NaOH para remover traços de NO_2^-), e novamente desaerado com $\text{Ar}_{(\text{g})}$ por 20 minutos. O produto foi precipitado adicionando-se éter de petróleo. O sólido violeta foi coletado em um filtro, lavado com éter de petróleo e seco sob vácuo em dessecador com sílica gel; obteve-se 0,32 g de complexo (MM= 891,90; η = 92%).

Materiais e Reagentes

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

Reagente	Procedência
Solventes	
Acetona	Neon
Acetonitrila	JT Baker
Acetonitrila Deuterada	Aldrich
Etanol	FM
Benzeno	Cinética Química
Brometo de potássio	Sigma
Diclorometano	Synth
Éter Etílico	Chemco
Metanol	JT Baker
Outros	
3-metil-piridina	Sigma
Acetato de sódio	ECIBRA
Ácido Acético Glacial	Sigma
Ácido Fórmico	JT Baker
Ácido Nítrico	Cinética Química
Ácido Sulfúrico	Synth
Alumina	Sigma-Aldrich
Br ₂	Merk
Hidrazina	Vetec
Hidróxido de Sódio	Fmaia
HSA	Sigma
NH ₄ PF ₆	Sigma
Pastilhas de Cobre	-
Fosfato de potássio monobásico	Synth
Fosfato de sódio bibásico	Synth
RuCl ₃ .XH ₂ O	Aldrich
TBAH 98%	Aldrich

Condições Experimentais

Para todos os experimentos, os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ foram devidamente protegidos da luz, para evitar a labilização do ligante CO e NO respectivamente.

Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas no Instituto de Química da USP, campus São Paulo. Foi pesado aproximadamente 6mg de complexo, e enviado para análise.

Espectroscopia vibracional da região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de KBr, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , em um espectrofotômetro IR Prestige 21 Shimadzu. Foram pesadas aproximadamente 3 mg do complexo para 200 mg de KBr.

Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos foram registrados em um espectrofotômetro Agilent 8453, na região de 190 a 1100 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1 cm. Foi preparada uma solução estoque de cada complexo em acetonitrila de concentração de aproximadamente 10^{-4} mol/L, e a partir destas soluções obtiveram-se as demais por diluição.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ^1H e COSY foram registrados em um equipamento Bruker Avance DRX-500 500 MHz. Os experimentos de RMN foram realizados no Departamento de Química da FFCLRP-USP. Foram preparadas soluções de concentração final 1×10^{-2} mol/L dos complexos em acetonitrila deuterada.

Espectrometria de massas

Foram registrados espectros de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). Os espectros de massas foram registrados em modo positivo, em um equipamento micrOTOF II - ESI-TOF Mass Spectrometer, com vazão da bomba de 300 $\mu\text{L/h}$, para a solubilização utilizou-se uma fase móvel $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ 1:1. Os experimentos foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Voltametria cíclica

Os ensaios de voltametria cíclica foram feitos em uma cela de três eletrodos: eletrodo de trabalho (disco de platina), eletrodo auxiliar (fio de platina) e eletrodo de referência (Ag/AgCl). Foi preparada uma solução de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF_6) 0,1 M em acetonitrila. As soluções dos complexos foram preparadas com solução de eletrólito suporte, de modo a apresentarem a concentração final de 1×10^{-3} mol/L. Após as medidas serem realizadas, foi adicionada uma pequena quantidade de ferroceno (utilizado aqui como padrão interno) e repetiu-se a medida. Deste modo pudemos comparar as ondas redox do complexo em estudo com o potencial do par ferrocino/ferroceno, que apresenta uma onda em 0,4 V (vs EPH), eliminando possíveis erros da medida devido ao potencial de junção líquida.

Fotólise

As fotólises do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ foram realizadas em solução aquosa de tampão fosfato, $\text{pH}=7,4$. Como o complexo é parcialmente solúvel em água, foi preparada uma solução estoque em acetonitrila do mesmo ($5,49 \times 10^{-3}$ mol/L), e uma alíquota de 30 μL dessa solução estoque foi adicionada a 2970 μL de solução tampão em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm. As soluções foram agitadas continuamente durante os intervalos de irradiação em diferentes comprimentos de onda (377, 447, 532 e 660 nm) e os espectros foram

registrados a cada 2 minutos. A irradiação foi feita em um laser da marca Laser Colibri Quantum Tech.

Dois tipos de análises foram feitas durante os experimentos de fotólise:

- espectros de absorção das amostras foram registrados em um espectrofotômetro Agilent 8453, na região de 190 a 1100 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1 cm a cada 2 minutos de irradiação;
- a liberação de NO foi detectada utilizando-se um eletrodo seletivo (NOMeter) dentro da cubeta, porém posicionado fora do feixe de luz para evitar qualquer interferência fotoelétrica. A detecção do NO foi feita utilizando um eletrodo seletivo para NO da marca Noxímetro Insight.

A calibração do NOMeter foi feita através de uma solução padrão de NO gasoso (KUDO et al., 1997). Esta solução padrão foi preparada borbulhando NO, durante 1 hora para garantir a saturação da solução, em 8 mL de solução tampão fosfato (pH=7,4) previamente desaerada, para remover o oxigênio. O óxido nítrico foi gerado a partir de uma solução de ácido nítrico 50% com pedaços de cobre metálico. Antes de borbulhar a solução padrão, o gás gerado passou por uma solução de NaOH concentrada, para eliminar vestígios de NO₂. A concentração dessa solução saturada de óxido nítrico foi admitida como sendo 2×10^{-3} mol/L (MORI; BERTOTTI, 2000). Adicionando alíquotas conhecidas da solução saturada de NO em um volume de 6 mL de uma solução tampão fosfato pH=7,4 previamente desaerada com argônio por 30 minutos, variou-se a concentração de NO e obteve-se a curva de calibração, Figura 40.

Interação com albumina humana

A interação da HSA com o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ foi investigada por espectroscopia eletrônica de fluorescência.

As soluções de HSA (1×10^{-6} mol/L) foram preparadas em tampão fosfato pH = 7,4 e a solução estoque do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($1,79 \times 10^{-3}$ mol/L) em acetonitrila. A partir da solução estoque, foram adicionadas alíquotas à 3 mL da solução de HSA afim de obter concentrações na faixa de 1×10^{-6} à 1×10^{-5}

mol/L do complexo. Lembrando que a porcentagem final de acetonitrila em cada solução foi menor do que 2%, evitando assim a desnaturação da proteína.

Um experimento de interação HSA – complexo foi realizado a fim de determinar o tempo de incubação necessário para a solução atingir o equilíbrio. Foram realizadas medidas com a variação do tempo, e determinou-se que o tempo de incubação seria de 2 horas, este dado será apresentado no item 4.7. Após esse período de incubação, os espectros eletrônicos de emissão de fluorescência foram registrados em um intervalo de 310 a 500 nm, sendo empregados dois comprimentos de onda de excitação 280 e 295 nm. Por fim para a realização dos diferentes cálculos de regressão, a intensidade de fluorescência foi corrigida para os efeitos de reabsorção e filtro interno, utilizando a Equação 1:

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

Equação 1

sendo F_{cor} e F_{obs} as intensidades de fluorescência corrigida e observada respectivamente; A_{em} e A_{ex} as absorbâncias das amostras (HSA e complexo) nos comprimentos de onda de emissão e excitação respectivamente (LAKOWICZ, 2006).

Durante os experimentos, observamos que ao utilizarmos uma solução de HSA previamente preparada e estocada, o espectro de emissão de fluorescência apresentou uma banda em 420 nm, que não é característica do complexo em solução tampão de HSA. Ao repetirmos o experimento, utilizando uma solução de HSA recém preparada, esta banda não foi observada. Deste modo concluímos que as medidas devem ser realizadas apenas com soluções recém preparadas.

Resultados e discussão

4.1 Discussão sobre a Síntese, Purificação e Resultados de Análise Elementar

Primeiramente foi feita a síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, chamado de cluster mãe. Esta síntese é um exemplo de auto-organização. Fez-se reagir $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ com $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e seu respectivo ácido carboxílico, no caso ácido acético glacial, em metanol. Deste modo os íons metálicos se organizam espontaneamente em um arranjo trigonal, ligados em ponte pelo átomo central de oxigênio e pelos grupos carboxilatos (SPENCER, A.; WILKINSON, G., 1972; BAUMANN et al., 1978). Nesta etapa da síntese não se calcula o rendimento da reação, uma vez que o produto está contaminado com o excesso do acetato de sódio.

Na segunda etapa da síntese, os ligantes H_2O , que são lábeis, são facilmente substituídos pelos ligantes 3-picolina, uma vez que estes são ligantes σ -doadores e estabilizam o centro metálico em estados de oxidação altos (TOMA et al., 2001; NIKOLAOU, 2002). Nesta etapa o rendimento foi de 55% e uma pequena amostra foi separada e enviada para a análise elementar: Calculada: C 37,7%, H 4,1%, N 4,4%; obtido: C: 33,7%, H 3,4%, N 4,3%.

A terceira etapa consiste na síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, a partir do precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$. Nesta etapa foi feita uma redução do precursor seguida por refluxo, sob fluxo de CO durante 5 horas. A reação foi acompanhada por espectros eletrônicos tirados de uma em uma hora, Figura 10. Quando ocorre a redução do complexo, há um aumento da densidade eletrônica do centro metálico, aumentando a afinidade deste pelo ligante CO, ocorrendo à substituição de um ligante 3-picolina por um CO.

Figura 10: Acompanhamento da reação de síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CO})]$.

Esta síntese apresentou um rendimento de 48%, e uma amostra foi enviada para análise elementar: Calculada: C 33,7%, H 3,6%, N 3,1%, obtida: C 32,2%, H 3,0%, N 3,0%.

A quarta etapa da síntese consiste em oxidar o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ com uma solução de bromo em diclorometano. Nesta etapa ocorre uma diminuição da densidade eletrônica, diminuindo a afinidade do centro metálico pelo ligante CO, e este é substituído por um ligante lábil, no caso H_2O , presente no meio reacional. O rendimento desta etapa foi de 91% e a análise elementar: Calculada: C 32,7%, H 3,9%, N 3,2%, obtida: C 21,5%, H 3,9%, N 2,3%.

Paralelamente à síntese, os complexos estavam sendo caracterizados individualmente, utilizando as técnicas de cálculo do coeficiente de absorvidade molar, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de RMN e voltametria cíclica. Pela análise dos resultados obtidos para cada complexo (que serão apresentadas e discutidas nos itens seguintes), chegamos a conclusão de que os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ estavam contaminados, com ligante 3-picolina livre ou seus respectivos precursores, e caso a síntese prosseguisse, obteríamos o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ contaminado e com baixo rendimento. Por

esse motivo optamos por purificar o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ por ele ser o precursor imediato do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.

Para realizarmos a purificação, primeiramente foram feitos testes preliminares por cromatografia em camada delgada, com alumina neutra como fase estacionária, para determinarmos a fase móvel a ser utilizada, Figura 11.

Figura 11: Placas de cromatografia em camada delgada variando-se a fase móvel, 1, 2 e 3 referem-se respectivamente aos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

As proporções das fases móveis utilizadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Proporção dos solventes utilizados na preparação das fases móveis para o teste cromatográfico

Diclorometano	Acetonitrila	Metanol	Placa
100%	0%	-	A
70%	30%	-	B
40%	60%	-	C
10%	90%	-	D
0%	100%	0%	E
-	70%	30%	F
-	40%	60%	G
-	10%	90%	H
-	0%	100%	I

Pela Figura 11 e Tabela 1, definimos que a melhor fase móvel para separar o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ de suas impurezas foi a B (70% de diclorometano e 30% de acetonitrila) para eluir o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ como impureza e F (70% de acetonitrila e 30% de metanol) para eluir o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

Após a definição das fases móveis a serem utilizadas, uma coluna de alumina neutra foi devidamente empacotada em diclorometano, e o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ foi introduzido na mesma, dissolvido em uma quantidade mínima de diclorometano, Figura 12.

Figura 12: Coluna cromatográfica de alumina neutra empacotada em diclorometano, fase móvel B (70% de diclorometano e 30% de acetonitrila).

A quinta e última etapa consiste na síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ através do borbulhamento de NO em uma solução do precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ em diclorometano por 2 horas. Nesta etapa ocorre a substituição do ligante H_2O , que é lábil, pelo ligante NO, que é um ligante π -acceptor e estabiliza o centro metálico por retrodoação. O rendimento obtido nesta síntese foi de 92% e a análise elementar: calculada: C 32,3%, H 3,6%, N 4,7%, obtida C 25,3%, H 3,2%, N 5,3%.

4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Foram preparadas soluções de cada complexo (10^{-2} mol/L) em acetonitrila deuterada, e estas amostras foram enviadas para o Departamento de Química da FFCLRP para realização das análises.

É conhecido que os sinais dos ligantes coordenados ao centro $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são dependentes do estado de oxidação dos íons rutênio. Complexos reduzidos no estado de oxidação formal $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}$ são diamagnéticos, e os sinais dos ligantes coordenados são próximos ao dos ligantes livres. Já complexos no estado de oxidação formal $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$, ou complexos oxidados, são paramagnéticos, e os sinais dos ligantes sofrem influência da anisotropia paramagnética do centro metálico, que apresenta um elétron desemparelhado (ABE et al., 1996; ALEXIOU, 1997; NIKOLAOU et al., 2001; TOMA et al., 2002).

O efeito de anisotropia paramagnética pode manifestar-se de dois modos diferentes: por pseudocontato, o qual envolve uma interação dipolar através do espaço, logo decresce com a distância, e/ou pelo mecanismo de contato, que depende da orientação dos núcleos observados em relação ao centro paramagnético. Este último promove deslocamentos tanto para campos mais altos quanto para campos mais baixos (BERTINI; LUCHINAT, 1996). Assim, os prótons em posição α do ligante piridínico sofrem maior influência da anisotropia paramagnética do centro Ru_3O , sofrendo os maiores deslocamentos, tanto para campo mais alto quanto para campo mais baixo.

As Figuras 13, 15, 17 e 19, mostram os espectros de RMN obtidos para cada complexo. Estes espectros de ^1H -RMN foram atribuídos por comparação com espectros de complexos análogos já descritos na literatura, assim como seus ligantes livres (TOMA et al., 2002, 2005), e espectros COSY, Figuras 14, 16, 18 e 20.

Os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ possuem um elétron desemparelhado, assim apresentam anisotropia paramagnética e seus sinais encontram-se deslocados em relação aos ligantes livres.

Para os complexos assimétricos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, o sinal das metilas aparece duplicado, pois devido ao abaixamento de simetria, que passa de D_{3h} para C_{2v} , existem dois tipos de acetados magneticamente diferentes: quatro vicinais e dois em posição trans em relação ao ligante CO, H_2O ou NO respectivamente (ALEXIOU et al., 2000; NIKOLAOU, 2002).

O ligante 3-metilpiridina livre, apresenta sinais na região de compostos aromáticos (de 6 a 9 ppm), referentes aos prótons α (dubleto), α' (singleto), β (triplete) e γ (dubleto). Como não se trata de um ligante simétrico, não há equivalências entre os prótons, assim cada um possui um deslocamento específico. Para os prótons do grupo metil (δ) desse ligante, o sinal é observado na região de 2 a 3 ppm, região característica para sinais de cadeias alifáticas.

Para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{NO}]^+$, todos complexos oxidados (possuem um elétron desemparelhado) que apresentam anisotropia paramagnética, esperamos observar diferenças significativas entre os valores dos deslocamentos químicos quando comparados com o ligante livre. Já para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{CO}]$ no estado de oxidação zero, ou seja, um complexo reduzido que não apresenta anisotropia paramagnética, os sinais dos ligantes devem possuir valores próximos aos valores dos sinais dos ligantes livres.

Os espectros COSY, Figuras 14, 16, 18 e 20, foram utilizados para verificarmos as correlações entre os prótons.

A Figura 13 apresenta o espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$. Além dos sinais do ligante coordenado, também foram observados sinais do ligante livre (*), revelando a natureza da contaminação do complexo.

Foram observados deslocamentos para campo alto e baixo para os sinais do ligante coordenado, uma vez que o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ apresenta anisotropia paramagnética, como mencionado acima.

Para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, Figura 15, observaram-se pequenos deslocamentos para campo baixo nos sinais dos prótons, pois este

complexo encontra-se no estado de oxidação zero, e conseqüentemente não apresenta anisotropia paramagnética. Além disso, os sinais das metilas dos acetatos, que tipicamente caem na região de campo alto ao redor de 2 ppm, encontram-se desdobrados, característicos de complexos assimétricos devido aos ambientes químicos diferentes dos grupos CH_3 (ALEXIOU, A.D.P. et al., 2000; NIKOLAOU, 2002).

Na Figura 17 encontra-se o espectro do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, que novamente apresenta anisotropia paramagnética, assim seus sinais encontram-se deslocados para campo alto e baixo devido à anisotropia paramagnética do centro metálico $[\text{Ru}_3\text{O}]$.

Na Tabela 2, encontram-se os valores obtidos dos deslocamentos químicos (δ ppm) e das integrais obtidas para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.

Tabela 2: Dados obtidos pela análise dos espectros de ^1H -RMN para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L}')^+]$, obtidos em solução de acetonitrila deuterada

δ (ppm)	$\text{L}'=(3\text{-pic})$	$\text{L}'=(\text{CO})$	$\text{L}'=(\text{H}_2\text{O})$	3-pic (livre)*	Acetato (livre)*
$\text{CH}_3(\text{a})$	4,75 (18H)	1,94 (12H)	4,73 (12H)	-	2,1
$\text{CH}_3(\text{b})$	-	1,74 (6H)	4,83 (6H)	-	2,1
$\text{H}\alpha(3\text{-pic})$	0,096 (3H)	9,03 (2H)	-1,65 (2H)	8,42	-
$\text{H}\alpha'(3\text{-pic})$	-0,43 (3H)	9,01 (2H)	-1,65 (2H)	8,44	-
$\text{H}\beta(3\text{-pic})$	5,73 (3H)	8,03 (2H)	-1,49 (2H)	7,16	-
$\text{H}\gamma(3\text{-pic})$	6,37 (3H)	8,19 (2H)	5,85 (2H)	7,45	-
$\text{H}\delta(3\text{-pic})$	1,37 (9H)	2,67 (6H)	5,88 (6H)	2,32	-

*(POUCHERT; BEHNKE, 1993)

Foram observados sinais dos ligantes livres, que foi identificado a partir de seus valores dos deslocamentos químicos (δ ppm), Tabela 2, determinamos assim que o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ estava contaminado com o ligante 3-picolina livre. Pelos deslocamentos definidos para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, determinou-se que os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e

$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ por sua vez, encontram-se contaminados com o precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$.

Pelos espectros COSY dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, Figuras 14, 16, 18 e 20, respectivamente, pudemos ratificar a estrutura proposta para cada um dos complexos estudados.

Já o nitrosilo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ encontra-se no estado de oxidação formal $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$, caracterizando um complexo oxidado. Estes complexos possuem um elétron desemparelhado e, portanto, são paramagnéticos. Sendo assim os sinais de seus ligantes não são sensíveis somente aos efeitos indutivos do centro metálico, mas também ao paramagnetismo da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ (TOMA et al., 2001; NIKOLAOU et al., 2001).

Na Tabela 3 foram retomados os valores dos deslocamentos químicos (ppm) para complexos com diferentes ligantes L afim de mostrarmos a dependência dos sinais com o estado de oxidação dos complexos.

Tanto pela Tabela 3 quanto pela Figura 19, é possível observar que os sinais dos ligantes do nitrosilo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$ apresentam valores de δ intermediários entre os valores observados para os ligantes livres e complexos reduzidos (diamagnéticos) e os valores observados em complexos oxidados (paramagnéticos). Esse resultado mostra que a interação dos elétrons desemparelhados da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e do ligante NO^0 é tão severa que remove parcialmente dos nitrosilos trinucleares o efeito de sua anisotropia paramagnética, promovendo em um complexo oxidado um comportamento próximo ao de um complexo reduzido (TOMA et al., 2002, 2005).

Tabela 3: Dados obtidos pela análise dos espectros de ^1H -RMN para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L}')]^+$, obtidos em solução de acetonitrila deuterada

δ (ppm)	$\text{L}=(3\text{-pic})_2(\text{NO})$	$\text{L}=(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})$	$\text{L}=(4\text{-pic})_2(\text{NO})^b$	3-pic (livre) ^a	4-pic (livre) ^a	Acetato (livre) ^a
$\text{CH}_3(\text{a})$	3,93 (12H)	4,73 (12H)	3,73 (12H)	-	-	2,1
$\text{CH}_3(\text{b})$	3,25 (6H)	4,83 (6H)	3,11 (6H)	-	-	2,1
$\text{H}\alpha(3\text{-pic})$	4,32 (2H)	-1,65 (2H)	4,82 (4H)	8,42	8,61	-
$\text{H}\alpha'(3\text{-pic})$	4,28 (2H)	-1,65 (2H)	-	8,44	-	-
$\text{H}\beta(3\text{-pic})$	8,04 (2H)	-1,49 (2H)	8,01 (4H)	7,16	7,27	-
$\text{H}\gamma(3\text{-pic})$	5,51 (2H)	5,85 (2H)	-	7,45	7,65	-
$\text{H}\delta(3\text{-pic})$	1,78 (6H)	5,88 (6H)	4,98 (6H)	2,32	-	-

(^aNIKOLAOU, 2002; ^bTOMA, et al., 2002)

Figura 13: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ ($10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 14: Espectro COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ ($10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 15: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 16: Espectro de COSY do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(CO)]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 17: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 18: Espectro de COSY do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(H_2O)]$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 19: Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.

Figura 20: Espectro de COSY o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ (1×10^{-2} mol/L) em solução de acetonitrila deuterada.

4.3 Espectrometria de Massas

A técnica ESI-MS é uma técnica analítica muito utilizada. Possui capacidade de produzir íons multiplamente carregados, diminuindo assim a razão m/z , tornando possível a análise de compostos com elevada massa molecular. Por se tratar de uma técnica de ionização suave, provoca pouca fragmentação dos analitos estudados.

Os espectros de massas dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ encontram-se nas Figuras 21 à 24.

Figura 21: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$.

Pela Figura 21, observamos o pico do íon molecular intacto em 953 m/z , que corresponde ao fragmento $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$. Foi possível observar também que ocorre a perda de um ligante 3-picolina, dando origem ao pico em m/z 860.

Figura 22: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$.

A Figura 22, mostra o espectro de massas para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$. O pico em m/z 889 corresponde ao íon molecular intacto para este complexo, e podemos observar que ocorre a fragmentação com a perda de um ligante 3-picolina e formação de um aduto com metanol, dando origem ao pico em m/z 829.

Além do pico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, observamos também um pico em m/z 953, que corresponde ao pico do íon molecular intacto do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, com sua respectiva fragmentação, mostrada

anteriormente. Conforme discutido no item que tratou sobre a purificação dos complexos, sabe-se que o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ encontrava-se contaminado com seu precursor simétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$. Além da questão da contaminação da amostra em si, constatou-se que houve contaminação da coluna no espectrômetro de massas, uma vez que as análises foram feitas de modo sequencial. Esses dois fatos são responsáveis pela observação do pico correspondente ao complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ com intensidade superior ao pico do próprio complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ que constituía esta amostra.

A Figura 23 corresponde ao espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$. Podemos observar o pico do íon molecular intacto em m/z 878. O pico em m/z 860 corresponde à fragmentação que ocorre para este complexo, com a perda da molécula de água. Porém, observamos novamente o pico do íon molecular intacto do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, indicando que existe uma contaminação, e o pico em m/z 860 não corresponde somente à fragmentação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, pois existe uma contribuição da fragmentação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$.

Figura 23: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

O espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ está apresentado na Figura 24.

Figura 24: Espectro de massas do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.

Pela Figura 24, foi possível observar o pico do íon molecular intacto em m/z 890, que corresponde ao fragmento acima discriminado. Observamos também que ocorre preferencialmente a perda de um ligante 3-picolina e formação de um fragmento com metanol, representado pelo pico em m/z 826. A dissociação do NO é muito menos eficiente, não sendo observada no espectro de massas.

Este espectro mostra ainda um pico em m/z 953 com baixa intensidade, que corresponde provavelmente ao precursor simétrico $\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, embora tenha-se procedido à purificação através de coluna cromatográfica.

4.4 Espectroscopia Eletrônica

As sínteses dos complexos foram acompanhadas, em um primeiro momento, por espectros eletrônicos, uma vez que os complexos trinucleares de rutênio apresentam bandas bem características (BAUMANN et al., 1978, 1979; TOMA, et al., 1988, 2001; ALEXIOU et al., 2000).

Os espectros eletrônicos dos complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$, no estado de oxidação formal $[\text{Ru}_3^{\text{III}}, \text{III}, \text{III}]\text{O}$ (ou complexos oxidados), consistem basicamente de uma banda larga com máximo entre 600 e 700nm, atribuída às transições intracluster (IC) da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, e de ombros na região de 300-400nm correspondentes às transições de transferência de carga cluster - ligante (TCCL) (BAUMANN et al., 1978, 1979; TOMA, HENRIQUE E. et al., 1988, 2001; ABE et al., 1995; ALEXIOU et al., 2000). Para complexos com carga formal zero (ou reduzidos), tanto a banda TCCL quanto a banda IC sofrem deslocamentos batocrômicos, ou seja, deslocam-se para comprimentos de onda maiores. Por outro lado, para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ coordenada a ligantes π -receptores, a banda IC ao redor de 900 nm sofre deslocamento hipsocrômico, deslocamento para comprimentos de onda menores, devido à interação de retrodoação (BAUMANN et al., 1979; ABE et al., 1996; TOMA, HENRIQUE E. et al., 2001; SALSAMAN et al., 2006).

Exemplos de ligantes π -receptores são os ligantes CO e NO, que possuem um par de elétrons livres e orbitais π^* vazios, os quais podem comportar pares de elétrons oriundos do metal. De modo geral, este efeito torna a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ deficiente em elétrons, estabilizando seus níveis $d\pi$ e deslocando a banda IC (BAUMANN et al., 1979; ABE et al., 1996; TOMA, HENRIQUE E. et al., 2001; NIKOLAOU, 2002).

A estrutura eletrônica dos complexos trinucleares de rutênio tem sido discutida qualitativamente em termos do diagrama de orbitais moleculares propostos por Cotton e Norman (COTTON; NORMAN, 1972), centrado no sistema π de simetria D_{3h} para os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$, e C_{2v} para os complexos assimétricos onde um ligante L é diferente dos demais. Nestes sistemas o átomo de oxigênio central é considerado com hibridização sp^2 deixando um orbital p_z de simetria π livre para interagir com os orbitais $d\pi$ do rutênio (d_{yz} , d_{xz} e $d_{x^2-y^2}$) (COTTON; NORMAN, 1972; BAUMANN et al., 1978).

Na Figura 25 encontra-se o espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$. Observa-se uma banda em 688 nm correspondente à transição IC, e ombro em 313 nm, correspondente a transição TCCL, regiões características para complexos simétricos no estado de oxidação +1.

Para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, Figura 26, ocorre um deslocamento da banda IC para 587 nm. Geralmente esta banda encontra-se ao redor de 900 nm para clusters com carga formal zero, ou reduzidos. O deslocamento para um comprimento de onda menor (587nm) ou hipsocrômico, ocorre devido à interação de retrodoação entre o centro metálico $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e o ligante CO. O ligante CO possui um par de elétrons livres e orbitais π^* vazios, os quais podem comportar pares de elétrons, sendo denominado como um ligante π -receptor, ou seja, quando ligado ao centro $[\text{Ru}_3\text{O}]$, torna este centro metálico deficiente em elétrons, estabilizando os níveis $d\pi$, gerando o deslocamento observado (TOMA et al., 2001; NIKOLAOU, 2002).

Figura 25: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ ($4,98 \times 10^{-5}$ mol/L) em acetonitrila.

Figura 26: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ ($6,19 \times 10^{-5}$ mol/L) em acetonitrila.

Na figura Figura 27, encontra-se o espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

Figura 27: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ ($8,83 \times 10^{-5}$ mol/L) em acetonitrila.

Para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, foram observadas bandas em 679 nm, correspondente à transição IC e em 312 nm, correspondente à transição

TCCL, novamente em regiões características para complexos no estado de oxidação +1.

O espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ é mostrado na Figura 28, e consiste de bandas em 730 nm, atribuída às transições internas da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, também chamada de transição intracluster (IC), 542, 456 e 372 nm, atribuídas à transições de transferência de carga cluster→ligante (TCCL), sendo que esse perfil espectral é característico de complexos trinucleares de rutênio coordenados ao óxido nítrico (TOMA et al., 2002, 2005).

Em trabalhos anteriores, Toma e colaboradores fizeram um cálculo preliminar do diagrama de orbitais moleculares para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$, onde L=piridina ou 4-metilpiridina, mostrando que o ligante NO possui uma forte influência sobre diversos níveis de energia, particularmente aqueles envolvendo os orbitais d_{zy} e d_{xz} dos íons rutênio (TOMA et al., 2002, 2005).

Figura 28: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{NO}]^+$ (1×10^{-3} mol/L) em acetonitrila.

Na Tabela 4 encontram-se os valores dos coeficientes de absorvidade dos complexos estudados e de complexos já descritos na literatura.

Tabela 4: Valores dos coeficientes de absorvidade molar dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, e os complexos análogos já descritos na literatura

Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$	688 – IC	4663
	313 – TCCL	9525
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_3]^{+(a)}$	686 – IC	4280
	312 – TCCL	8450
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$	587 – IC	3250
	327 – TCCL	5640
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{CO})]^{(b)}$	585 – IC	4590
	345 – TCCL	6570
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$	679 – IC	2433
	312 – TCCL	1916
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})]^{+(c)}$	683 – IC	4296
	391 – TCCL	2679
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$	730 – IC	597
	542 – IC	1395
	456 – IC	1610
	372 – TCCL	2057
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{pic})_2(\text{NO})]^{+(d)}$	690 – IC	1200
	540 – IC	2420
	460 – IC	2670
	360 – TCCL	3300

(^a SPENCER; WILKINSON, 1972; ^b BAUMANN et al., 1979; ^c NUNES, 2005;

^dTOMA et al., 2005)

Entretanto, no caso dos dois complexos trinucleares de rutênio $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ coordenados ao NO^0 descritos até o momento (TOMA et al., 2002, 2005) o deslocamento hipsocrômico da banda IC é inferior ao deslocamento observado para outros sistemas com ligantes π -receptores (BAUMANN et al., 1978, 1979; ABE et al., 1996; TOMA et al., 2001). Além disso, observou-se também que as bandas

TCCL apresentam-se na região do visível, comportamento característico da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ reduzida, ou seja, no estado de oxidação zero. De fato, o espectro do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ investigado neste trabalho apresentou o mesmo perfil descrito acima, com as bandas IC e TCCL com valores de $\lambda_{\text{máx}}$ intermediários em relação aos valores observados para complexos oxidados e reduzidos. Este comportamento é perfeitamente compatível com o descrito anteriormente, e mostra que a forte interação entre o centro metálico e o ligante NO promove um comportamento misto deste centro entre as espécies $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$. Este comportamento atípico tem sido racionalizado em termos do diagrama de orbitais moleculares propostos por Toma e colaboradores (TOMA et al., 2002, 2005), que mostra que o principal diferencial desta classe de compostos é a forte interação eletrônica entre o elétron desemparelhado da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e do elétron desemparelhado do NO^0 .

4.5 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

As Figuras 29 à 32 mostram os espectros de infravermelho obtidos para cada um dos complexos.

Os espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ foram atribuídos por comparação com complexos análogos já descritos na literatura (ABE et al., 1992; ALEXIOU, 1993; TOMA et al., 2001, 2002, 2005).

Figura 29: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$.

Pela Figura 29, observamos que as bandas de maior intensidade correspondem às frequências de vibração dos carboxilatos (1429 cm^{-1}), ligados em ponte aos íons rutênio e do contraíon PF_6^- (844 cm^{-1}), utilizado na síntese do complexo.

Em um primeiro momento, a técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho pode ser utilizada para verificarmos a coordenação de ligantes ao centro metálico. Na Figura 30, podemos observar um forte estiramento em 1839 cm^{-1} , correspondente ao ligante CO, além do estiramento correspondente ao estiramento dos carboxilatos ligados em ponte aos íons rutênio em 1423 cm^{-1} . Por este espectro de infravermelho, pudemos confirmar que o ligante CO coordenou-se ao centro metálico, e o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{CO}]$ foi sintetizado.

Figura 30: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{CO}]$.

Figura 31: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{H}_2\text{O}]^+$.

Nota-se que na Figura 31, não há mais um estiramento em 1839 cm^{-1} , que caracterizava a coordenação do CO ao centro metálico. As bandas destacadas correspondem aos estiramentos referentes aos carboxilatos ligados em ponte (1423 cm^{-1}) e ao contra-íon PF_6 (843 cm^{-1}).

Figura 32: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{NO}]^+$.

Para o nitrosilo, a técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada em um primeiro momento para observar a coordenação do óxido nítrico ao complexo, uma vez que o NO apresenta um estiramento bem característico. Este estiramento ($\nu(\text{NO})$) foi observado em 1883 cm^{-1} , Figura 32. Este pico é bastante simétrico e não é observado no precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$. O valor se enquadra na faixa característica para complexos nitrosilos lineares M-NO, próximo da frequência vibracional do NO livre (1876 cm^{-1}) (WESTCOTT; ENEMARK, 1999).

O ânion PF_6^- , de simetria O_h , possui seis modos normais de vibração, porém apenas dois são ativos no infravermelho, $\nu(\text{PF})$ e $\delta(\text{FPF})$, estas vibrações aparecem em torno de 840 e 550 cm^{-1} . Para o íon acetato, esperam-se 15 modos normais de vibração, e, apenas um deles não apresenta atividade no infravermelho (NAKAMOTO, 1997). No espectro dos complexos analisados, foram encontradas 5 dessas vibrações. Uma característica de acetato em ponte é apresentar frequências próximas às do acetato livre (1578 e 1414 cm^{-1}), o que de fato foi observado, Tabela 5. Os modos vibracionais relacionados com a molécula de 3-metilpiridina, foram atribuídos por comparação entre a molécula livre e coordenada. O centro $[\text{Ru}_3\text{O}]$ apresenta quatro modos vibracionais, dos quais três são ativos no infravermelho: $\pi(\text{Ru}_3\text{O})(600\text{ cm}^{-1})$, $\nu_d((\text{Ru}_3\text{O}))(440\text{ cm}^{-1})$ e $\delta_d(\text{Ru}_3\text{O})(282\text{ cm}^{-1})$. A banda em 282 cm^{-1} não foi encontrada devido ao intervalo de frequências detectado no aparelho utilizado para efetuar as medidas (escala de 400 a 4000 cm^{-1}).

Na Tabela 5 encontram-se os valores de estiramentos observados para os complexos.

Tabela 5: Atribuição tentativa das bandas dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{L}]$ no espectro de infravermelho

L=(3-pic) (cm^{-1})	L=(CO) (cm^{-1})	L=(H ₂ O) (cm^{-1})	L=(NO) (cm^{-1})	Atribuição tentativa
442	-	440	-	ν_d [Ru ₃ O]
558	557	557	557	δ (FPF)
621	622	620	622	δ_s {Ru ₃ O}
-	685	683	687	δ_s (OCO)
795	-	800	795	π (anel)
842	844	843	843	ν_{as} (PF)
950	949	952	954	ν_s (CC) _{Ac}
1045	1047	1043	1046	resp. anel 3-pic ou δ (CH) _{Ac}
1111	1112	1110	1109	δ_{as} (CH) 3-pic
1199	1198	1190	1197	δ_s (CH) 3-pic
1248	1243	1247	-	δ_{as} (CH) 3-pic
1349	1345	1350	1354	δ_s (CH) _{Ac}
1419	1423	1423	-	ν_s (COO) Ac
1433	-	-	1428	ν_s (COO) Ac
1482	-	1481	1484	ν_s (anel)
1576	1573	-	-	ν_{as} (COO) Ac
1555	-	1560	1594	ν_s (COO) Ac
2930	2930	2930		ν_{as} (CH)MeOH
-	1939	-	-	ν (CO)
-	-	-	1883	ν (NO)

ν - estiramento, δ - deformação do ângulo no plano

Para efeito de comparação, na Tabela 6 encontram-se os valores dos estiramentos do NO para os complexos nitrosilos trinucleares de rutênio, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2\text{NO}]$, variando-se os ligantes L.

Tabela 6: Valores das vibrações $\nu(\text{NO})$ para complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$, e os respectivos pKa dos ligantes L

L	$\nu(\text{NO})$ (cm^{-1})	pKa
py ^a	1865	5,25
3-pic	1883	5,63
4-pic ^b	1874	5,98
(TOMA et al., 2002 ^a , 2005 ^b)		

Pela Tabela 6, observamos que embora os ligantes L sejam diferentes, os valores dos estiramentos do NO encontrados são praticamente os mesmos (levando em consideração o erro relativo à medida, $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$).

É sabido que, tipicamente, diversas classes de nitrosilos de rutênio apresentam uma correlação entre o valor de $\nu(\text{NO})$ e o valor de pKa dos respectivos co-ligantes. Essa correlação reflete o enfraquecimento da ligação nitrogênio-oxigênio do NO em função do fortalecimento da retrodoação com o centro metálico que, por sua vez, é influenciada pelo pKa dos demais ligantes (TFOUNI; FORD, PETER, 1980; BENTO; TFOUNI, 1988; BEZERRA et al., 1999; TFOUNI et al., 2003).

No caso dos complexos trinucleares de rutênio este comportamento típico parece não se manifestar. Observa-se que, mesmo para ligantes com valores de pKa diferentes, os valores da vibração $\nu(\text{NO})$ não sofrem deslocamentos muito significativos, nem tão pouco seguem uma tendência clara de variação dependente dos valores de pKa desses ligantes L. Possivelmente este dado corrobore o fato de que, no caso dos complexos trinucleares de rutênio, aparentemente o comportamento do centro metálico e do ligante NO é mais dependente da forte interação entre as duas unidades através da mistura orbital e interação entre seus elétrons desemparelhados do que da influência dos ligantes periféricos L. Contudo é importante fazer a ressalva de que esta é ainda uma conclusão preliminar, pois a série de ligantes L explorada até este momento é ainda pequena (TOMA et al., 2002, 2005, e este trabalho).

4.6 Voltametria Cíclica

Os complexos de fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6\text{L}_3]^n$ apresentam uma série de quatro ou cinco ondas reversíveis entre +2,5 a -1,5 V (E vs EPH) (TOMA; CIPRIANO, 1989). Os estados de oxidação envolvidos nessa janela de potencial podem ser formalmente expressados como $\text{Ru}_3^{\text{IV,IV,III}}\text{O}/\text{Ru}_3^{\text{IV,III,III}}\text{O}/\text{Ru}_3^{\text{III,III,III}}\text{O}/\text{Ru}_3^{\text{III,III,II}}\text{O}/\text{Ru}_3^{\text{III,II,II}}\text{O}/\text{Ru}_3^{\text{II,II,II}}\text{O}$. Uma das características é a separação de aproximadamente 1 V entre ondas consecutivas, refletindo a forte deslocalização eletrônica da molécula (TOMA et al., 2001).

Tipicamente, os valores de $E_{1/2}$ dos processos redox dos centros metálicos diminui linearmente com o valor de pKa dos ligantes N-heterocíclicos (TOMA et al., 1988; ROCHA et al., 2008), Figura 33. Essa dependência reflete a afinidade relativa dos íons metálicos reduzidos/oxidados pelos ligantes coordenados (BUCKINGHAM; SARGESON, 1964). À medida que o pKa de um ligante aumenta, os estados de oxidação maiores ($[\text{Ru}_3\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Ru}_3\text{O}]^{3+}$) são favorecidos pela interação σ -doadora do ligante, refletida no decréscimo dos valores de $E_{1/2}$ para os processos de oxidação. Já para estados de oxidação baixos ($[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ e $[\text{Ru}_3\text{O}]^{-1}$) o complexo é estabilizado por interações com ligantes π -receptores (TOMA et al., 2001; NIKOLAOU, 2002).

A 3-picolina (3-metilpiridina) possui um pKa ligeiramente (5,63) maior que a piridina (5,28), logo é mais básica que a piridina, assim, o potencial redox do centro $[\text{Ru}_3\text{O}]$ com ligantes 3-picolina deve ser menor que com ligantes piridina, pois a 3-picolina é um ligante σ -doadora de elétrons, ou seja, estabiliza os estados de oxidação mais altos, deslocando os potenciais para valores menores, como foi observado experimentalmente de acordo com os valores de $E_{1/2}$ da Tabela 7.

Tabela 7: Valores de $E_{1/2}$ e atribuição tentativa dos processos redox dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L})]$

	$\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{II}} / \text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}$	$\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}} / \text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$	$\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$	$\text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{III}}$
L=(3-pic)	-1,31	-0,049	0,98	1,95
L=(CO)	-	-0,85	0,65	1,27
L=(H ₂ O)	-	-1,21	0,039	1,04
L=(NO)	-0,93	-0,23	1,21	-

Figura 33: Gráfico de $E_{1/2}$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{ac})_6(\text{L})_3]^+$ versus pKa de ligantes N-heterocíclicos (pz=pirazina, mpz=metilpirazina, dmpz=2, 6-dimetilpirazina, ampz=aminopirazina, acpy=4-acetilpiridina, adpy=isonicotinamida, py=piridina, tbpy=4-terc-butilpiridina, ampy=4-aminopiridina)(TOMA et al., 1988).

Os voltamogramas dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]$ estão apresentados nas Figuras 34 à 38. Todos os complexos apresentaram o mesmo comportamento, tanto nas varreduras anódicas e catódicas, quanto em vários ciclos sucessivos.

Figura 34: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$ ($1,18 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag⁺) em acetonitrila.

A voltametria cíclica do precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, Figura 34, exibe quatro ondas com valores de $E_{1/2}$ em -1,31, -0,049, +0,98 e +1,95 V vs. Ag/Ag⁺ atribuídas aos pares redox sucessivos $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{III}}$. A separação entre os picos de potencial anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) foi de aproximadamente 60 mV, aumentando em alguns casos para 80-200 mV, caracterizando um processo quase-reversível (Toma et al, 1988). Os potenciais sucessivos apresentaram uma diferença de aproximadamente 1 V, indicando uma intensa deslocalização eletrônica na molécula (TOMA et al., 2001)

Os voltamogramas dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, Figura 35 e Figura 36, apresentam ondas adicionais de menor intensidade, indicando que estes complexos estavam contaminados. Após análise dos valores de $E_{1/2}$, chegamos à conclusão que os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ estão contaminados com o complexo precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$. Após a

purificação feita por coluna cromatográfica, não foram observadas tais contaminações, Figura 37.

Figura 35: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ ($1,08 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 0,1M TBAH, Ag/Ag^+) em acetonitrila.

Figura 36: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ ($1,29 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 0,1M TBAH, Ag/Ag^+) em acetonitrila.

Figura 37: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ ($0,977 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag^+) em acetonitrila, após purificação em coluna cromatográfica.

Figura 38: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($0,966 \times 10^{-3}$ mol/L, 0,1M TBAH, Ag/Ag^+) em acetonitrila.

Pelos voltamogramas dos complexos, Figuras 34 à 38, foram feitas as atribuições das ondas redox por comparação com o cluster simétrico de piridina

(TOMA et al., 1988). A Tabela 7 apresenta os valores de $E_{1/2}$ para os quatro complexos analisados.

Para o nitrosilo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, Figura 38, foram observadas três processos quase-reversíveis centrados em -0,93, -0,23 e +1,21V VS Ag/Ag^+ , que foram atribuídos tentativamente a $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{II}} / \text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}} / \text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{IV}}$ e são característicos de complexos nitrosilos. Porém, a onda em -0,23 V pode envolver o processo NO^+/NO^0 , pois em sistemas convencionais, o par NO^+/NO^0 exibe valores de $E_{1/2}$ entre -0,6 a +0,3 V vs Ag/Ag^+ (TOMA et al., 2002, 2005).

No caso do complexo nitrosilo, a diferença entre os valores sucessivos de potenciais não é regular, quando comparado com o complexo simétrico tris-picolina, Tabela 7. Sabe-se que existe uma forte interação entre o ligante NO e o centro metálico $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, onde o centro metálico está formalmente no estado de oxidação III, III, III. Assim, os pares redox III, III, III/III, III, II e IV, III, III/III, III, III foram deslocados para potenciais mais negativos e positivos respectivamente. Isto significa que os processos redox envolvendo o ligante NO são compartilhados com o centro $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Consequentemente, as propriedades eletroquímicas do par NO^+/NO^0 não podem ser observadas isoladamente como em complexos convencionais de NO (TOMA et al., 2002, 2005).

4.7 Fotólise

As fotólises do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ foram feitas em tampão fosfato pH=7,4, que corresponde ao pH fisiológico. Foram feitos dois tipos de acompanhamento, o primeiro deles utilizando um eletrodo seletivo para NO (NOMeter), e o segundo deles através do acompanhamento das alterações espectrais em função do tempo.

Para a utilização do NOMeter, primeiramente foi necessário calibrar o mesmo, para tal utilizamos uma solução padrão de NO. Esta solução padrão foi preparada borbulhando NO em uma solução tampão (8 mL, pH=7,4) previamente desaerada com argônio afim de remover o oxigênio, durante 1 hora para garantir a saturação da solução com o gás. O óxido nítrico foi gerado a partir de uma solução de ácido nítrico 50% com pedaços de cobre metálico. O gás gerado passou por uma solução concentrada de NaOH para eliminar vestígios de NO_2 . A concentração dessa solução saturada foi admitida como sendo 2×10^{-2} mol/L (MORI; BERTOTTI, 2000).

Para a construção da curva de calibração do NOMeter, outra solução tampão (6 mL, pH=7,4) foi previamente desaerada durante 30 minutos com argônio para eliminar o oxigênio presente. O NOMeter foi colocado nesta solução, e após a sua estabilização foram adicionadas alíquotas conhecidas da solução padrão, assim obtivemos a curva de calibração, Figura 39.

Figura 39: Cronoamperograma obtido durante a calibração do NOMeter, solução tampão (6 mL, pH=7,4).

Pela Figura 39, observamos que a cada alíquota adicionada ocorre um aumento da corrente. Esta variação da corrente pela concentração de NO em solução dão origem à curva analítica da calibração do NOmeter, Figura 40, que foi utilizada para o cálculo das concentrações de NO liberados pelo complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ após a irradiação em diferentes comprimentos de onda.

Figura 40: Curva analítica da calibração do NOmeter.

A fim de realizar uma detecção específica do NO, realizou-se a fotólise com irradiação contínua em quatro comprimentos de ondas diferentes, 377, 447, 532 e 660 nm, utilizando o eletrodo seletivo para NO. Na Figura 41, encontram-se os cronoamperogramas de liberação de NO para diferentes comprimentos de onda de irradiação.

Pela Figura 41, observamos que imediatamente após a exposição da solução ao laser, o cronoamperograma indicou aumentos substanciais da corrente detectada pelo eletrodo seletivo, indicando a produção fotoquímica de NO. O sinal gerado pelo sensor de NO aumentou rapidamente quando a fotólise foi iniciada e, após um período de irradiação atingiu um equilíbrio. Estimou-se a quantidade de NO liberado utilizando-se a curva de calibração do eletrodo de NO, e os valores obtidos encontram-se na Tabela 8.

Figura 41: Cronoamperograma de liberação de NO em tampão fosfato (pH=7,4) para diferentes comprimentos de onda de irradiação (377, 447, 532 e 660 nm).

Tabela 8: Quantidade de NO liberado (mol/L) em cada comprimento de onda irradiado

Comprimento de onda (nm)	Liberação NO (10^{-6} mol/L)
377	2,15
447	2,10
532	0,95
660	-

Observa-se que em comprimentos de onda abaixo de 450 nm, a liberação de NO é maior. Esses comprimentos de onda correspondem à região onde ocorrem as bandas TCCL. Além disso, ocorre ainda liberação na região do visível, na qual ainda observa-se uma banda de natureza de transferência de carga para os complexos trinucleares nitrosilos. Este fato pode ser explicado devido à maior mistura orbital dos íons rutênio e do ligante óxido nítrico, que ocorre com maior extensão na região do ultra-violeta, mas contempla também os níveis de transferência de carga de energia mais baixa. Porém, essa mistura ocorre em menor extensão na região das transições intra-cluster, de modo que os orbitais moleculares envolvidos nestas

transições tem baixa contribuição de orbitais com caráter de NO (TOMA et al., 2002, 2005).

De fato, no comprimento de onda de irradiação de 660 nm não foi observada liberação de NO, pois a transição eletrônica centrada em 680 nm corresponde exatamente às transições intra-cluster, e assim não há envolvimento significativo do ligante NO (TOMA et al., 2002, 2005).

O segundo tipo de acompanhamento da liberação de NO através da irradiação da amostra foi feito através das alterações espectrais em função do tempo. Primeiramente foi feito um experimento para a observação da liberação de NO em solvente orgânico (acetonitrila). Foram preparadas soluções com o nitrosilo (concentração de aproximadamente 10^{-5} mol/L), estas soluções foram irradiadas e espectros foram tirados de 5 em 5 minutos, Figuras 42 à 44.

Figura 42: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de acetonitrila durante a fotólise com irradiação em 377 nm, registrados de 5 em 5 minutos.

Figura 43: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de acetonitrila durante a fotólise com irradiação em 447 nm, registrados de 5 em 5 minutos.

Figura 44: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de acetonitrila durante a fotólise com irradiação em 532 nm, registrados de 5 em 5 minutos.

Pelas Figura 42, Figura 43 e Figura 44, observamos que após um curto período de tempo, aproximadamente 15 minutos, não existe mais o nitrosilo em

solução, mostrando que ocorreu a liberação do NO. Notamos também que o espectro do fotoproduto obtido corresponde à espécie solvatada $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

Também foram feitas irradiações de soluções aquosas do complexo, e para tal, foram preparadas soluções em tampão fosfato (pH=7,4), de modo que a concentração final do complexo na cubeta fosse de aproximadamente 10^{-5} mol/L, utilizando uma solução estoque em acetonitrila do nitrosilo ($5,49 \times 10^{-3}$ mol/L). Para cada comprimento de onda irradiado utilizamos uma solução do complexo em tampão fosfato. Para cada amostra foram registrados espectros eletrônicos de 2 em 2 minutos, Figuras 45 à 47.

Figura 45: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,49 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de tampão fosfato durante a fotólise com irradiação em 377 nm, registrados de 2 em 2 minutos.

Figura 46: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,49 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de tampão fosfato durante a fotólise com irradiação em 447 nm, registrados de 2 em 2 minutos.

Figura 47: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,49 \times 10^{-5}$ mol/L, pH=7,4) em solução de tampão fosfato durante a fotólise com irradiação em 532 nm, registrados de 2 em 2 minutos.

O comportamento do nitrosilo para as irradiações em 377, 447 e 552 nm é o mesmo nos três comprimentos de onda, tendo-se observado a redução gradual da

banda em 452nm e a formação de uma banda em 680nm, gerando um perfil de espectro para o fotoproduto que é compatível com o espectro típico de complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$. Foram observados também dois pontos isosbéticos em aproximadamente 405 e 560 nm.

A ocorrência destes pontos isosbéticos indica que a reação que ocorre durante a fotólise é a mesma para todos os comprimentos de onda irradiados, indicando a presença em solução somente das espécies $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ e seu fotoproduto, a espécie solvatada $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, reação 1.

Reação 1

Embora o complexo não libere NO na janela terapêutica, observou-se a liberação de NO na região do visível, assim este complexo pode ser um composto promissor para a liberação controlada de NO em meio fisiológico.

4.8 Estudo de Interação com a Proteína Albumina Humana (HSA)

A técnica de espectroscopia de fluorescência é muito utilizada para o estudo de interação com proteínas. A HSA, em particular, possui três resíduos de aminoácidos que absorvem na região do UV e emitem fluorescência, são eles: fenilalanina, tirosina e triptofano. A supressão de fluorescência é relacionada a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma amostra. O perfil dessa redução de fluorescência pode evidenciar a região na qual estão ocorrendo modificações ou interações envolvidas no processo (EFTINK, 1991; HU et al., 2004).

O resíduo de triptofano é o mais utilizado para observar a supressão de fluorescência, devido à sua localização em uma região com características tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas. Excitando a amostra em 295 nm, ocorre a emissão de fluorescência em 340 nm, devido somente ao resíduo de triptofano, já quando a excitação ocorre em 280 nm, a fluorescência emitida em 340 nm é referente aos resíduos de tirosina e triptofano (PETERS, 1996; XIE et al., 2005).

Por ser a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, a albumina humana pode reagir com diversos íons. A seguir serão relatados os resultados obtidos sobre a interação da HSA com o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.

Todas as medidas de intensidade de fluorescência aqui reportadas, foram previamente corrigidas utilizando a Equação 1, apresentada no item 3.3.8.

Antes de começar o experimento de supressão de fluorescência, foi necessário verificar a estabilidade do complexo em solução aquosa, uma vez que este pode sofrer reação de aquação com liberação do NO. Realizou-se um experimento onde foram registrados os espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão de pH=7,4 à 30 °C variando-se o tempo de incubação, Figura 48.

Figura 48: Espectro de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução de tampão fosfato com pH=7,4 à 30 °C variando-se o tempo de incubação de 5 em 5 minutos.

Pela Figura 48, observa-se que ocorre o desaparecimento da banda em 452 nm e o início do surgimento da banda em 680 nm, indicando a perda parcial do ligante NO, com possível geração da espécie $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$. A partir do gráfico mostrado na Figura 48, foram gerados outros dois gráficos, fixando-se o comprimento de onda em 452 e 680 nm e fazendo um gráfico da absorbância pelo tempo de incubação, Figuras 49 e 50.

Observa-se que, em uma solução de tampão fosfato pH = 7,4, o complexo consegue manter-se íntegro em solução por um período de tempo inferior a 100 minutos.

Conhecendo-se esta informação, um novo experimento foi feito a fim de verificarmos a estabilidade do complexo nas mesmas condições, porém agora na presença de HSA. Para tanto foi realizado um teste com uma concentração fixa do complexo ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão (pH=7,4) de HSA (1×10^{-6} mol/L), e foram registrados espectros de absorção em função do tempo de incubação, à 30 °C, Figura 51.

Figura 49: Variação da absorbância em 452 nm em função da variação do tempo em minutos de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão pH=7,4, incubados à 30 °C.

Figura 50: Variação da absorbância em 680 nm em função da variação do tempo em minutos de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão pH=7,4, incubados à 30 °C.

Figura 51: Espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L) em diferentes tempos de incubação à 30 °C.

Observa-se pela Figura 51 que ocorre o desaparecimento da banda em 452 nm e o surgimento da banda em 680 nm, coerente com o comportamento anterior, uma vez que o ligante NO é parcialmente labilizado em água, e a espécie $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ é gerada. Ao construir o gráfico da variação da absorbância nos comprimentos de onda de 452 e 680 nm em função do tempo de incubação obtivemos as Figuras 52 e 53.

A partir das Figuras 52 e 53, foi possível observar que aparentemente o complexo demora mais tempo para sofrer aquação na presença de albumina, por volta de 200 minutos.

Figura 52: Variação da absorbância em 452 nm em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30 °C.

Figura 53: Variação da absorbância em 680 nm em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30 °C.

A partir dos experimentos apresentados acima, determinou-se o tempo de 200 minutos como tempo máximo *possível* para a incubação do complexo com a proteína a fim de permitir sua interação sem ocorrência significativa de aquação do

nitrosilo. Entretanto fez-se ainda um terceiro experimento, semelhante aos anteriores, porém utilizando-se a técnica de fluorescência.

Na literatura estão descritos vários experimentos de interação de complexos com a proteína HSA, em vários tempos de incubação. Para determinarmos o tempo necessário de incubação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ com a HSA para verificar as alterações de interesse na emissão da proteína, foi realizado um experimento com uma concentração fixa do complexo ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), registrando-se espectros de emissão de fluorescência em função do tempo de incubação à 30 °C, e foram construídos gráficos da intensidade de emissão de fluorescência pelo tempo em minutos, Figuras 54 e 55.

Figura 54: Variação da emissão de fluorescência em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30 °C, quando excitados em 280 nm.

Figura 55: Variação da emissão de fluorescência em função do tempo de uma solução do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($5,37 \times 10^{-6}$ mol/L) e HSA (1×10^{-6} mol/L), incubados à 30 °C, quando excitados em 295 nm.

Pelas Figura 54 e Figura 55 foi possível verificar que, em intervalos de tempo relativamente pequenos, já não se observa variação significativa na intensidade da banda de emissão da proteína.

De maneira qualitativa, portanto, conhecendo-se essa informação e o fato de que o complexo aparentemente mantém-se íntegro em solução tamponada na presença da proteína por até 200 minutos, determinou-se que 100 a 120 minutos são suficientes para que o complexo entre em equilíbrio com a proteína. Assim foi fixado um tempo de incubação de 120 minutos (2 horas) para os experimentos posteriores de investigação da supressão da emissão da HSA pelo nitrosilo.

Nas Figuras 56 à 61 encontram-se os espectros de emissão de fluorescência da HSA em tampão fosfato na ausência e presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ variando sua concentração, após incubação por 2 horas à 25, 30 e 35 °C, em dois comprimentos de onda de excitação (280 e 295 nm).

Figura 56: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1x10⁻⁶ mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(NO)]⁺ (2,2-13,2x10⁻⁶ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 25 °C) para $\lambda_{exc}=280$ nm.

Figura 57: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1x10⁻⁶ mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(NO)]⁺ (2,2-13,2x10⁻⁶ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 25 °C) para $\lambda_{exc}=295$ nm.

Figura 58: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 30 °C) para $\lambda_{exc}=280$ nm.

Figura 59: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 30 °C) para $\lambda_{exc}=295$ nm.

Figura 60: Espectro de emissão de fluorescência da HSA (1×10^{-6} mol/L) em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 35 °C) para $\lambda_{\text{exc}}=280$ nm.

Figura 61: Espectro de emissão de fluorescência da HSA em tampão fosfato (pH=7,4) na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) em diferentes razões molares após o período de incubação (2 horas à 35 °C) para $\lambda_{\text{exc}}=295$ nm.

Pelas Figuras 56 à 61 observamos que, conforme aumentamos a concentração do complexo, ocorre a diminuição da fluorescência, conforme esperado. O mesmo perfil de emissão de fluorescência foi observado para as três temperaturas de incubação. Para verificarmos se o supressor está se ligando a apenas uma região da HSA, foram construídos gráficos de F/F_0 versus $[\text{supressor}]/[\text{HSA}]$ para os dois comprimentos de onda de excitação utilizados, Figura 62 à Figura 64. Quando as retas se sobrepõem significa que o complexo está se ligando apenas à região do triptofano; já quando as retas não se sobrepõem, o supressor pode estar interagindo em outras regiões além daquela onde está situado o triptofano (GUO, X. et al., 2009).

Figura 62: Curvas da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar $[\text{supressor}]/[\text{HSA}]$ para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{\text{exc}}=280$ e 295 nm), na temperatura de incubação de 25 °C.

Figura 63: Curvas da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar $[\text{supressor}]/[\text{HSA}]$ para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{\text{exc}}=280$ e 295 nm), na temperatura de incubação de 30°C.

Pelas Figuras 62 e 63, observamos que as retas não se sobrepõem, assim podemos dizer que para as temperaturas de incubação de 25 e 30°C, o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ pode estar interagindo em outras regiões da HSA além daquela na qual esta localizado o resíduo de triptofano (GUO, X. et al., 2009).

Figura 64: Retas da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar $[\text{supressor}]/[\text{HSA}]$ para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{\text{exc}}=280$ e 295 nm), na temperatura de incubação de 35°C.

Pela Figura 64, observamos que há sobreposição das retas, deste modo podemos dizer que para a temperatura de incubação de 35°C, o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ deve estar interagindo somente na região do triptofano.

Processos de supressão de fluorescência podem ser classificados como dinâmico e estático. Quando ocorre a supressão dinâmica o supressor se difunde até o fluoróforo, durante o tempo de vida de seu estado excitado, e quando em contato com o fluoróforo, este volta ao estado fundamental sem a emissão de fóton. Quando a supressão é estática ocorre a formação de uma espécie intermediária no estado fundamental, antes do fluoróforo ser excitado (MIN et al., 2004).

A equação de Stern-Volmer descreve os processos estático e diâmico:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_s \tau_0 [S] = 1 + K_{SV} [S]$$

Equação 2

onde: F e F_0 = intensidade de fluorescência na presença e ausência do supressor respectivamente; $[S]$ = concentração do supressor; τ_0 = tempo de vida no estado excitado do fluoróforo; k_s = constante de velocidade de supressão bimolecular; K_{SV} = contante de Stern-Volmer, relacionada ao processo dinâmico (GORINSTEIN et al., 2000; HU et al., 2004).

A partir dos dados experimentais, foram construídos gráficos de F_0/F versus [supressor] para os dois comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ e 295 nm) e para as três temperaturas de incubação (25 , 30 e 35 °C), Figuras 65 e 66.

Figura 65: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ ($2,2-13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25 , 30 e 35 °C).

Figura 66: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) com $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C).

Pelas Figuras 65 e 66 pode-se observar que as retas se ajustam à equação de Stern-Volmer, indicando que pode estar ocorrendo tanto um mecanismo dinâmico quanto um mecanismo estático no processo de supressão de fluorescência da HSA.

Para o cálculo das constantes de velocidade de supressão bimolecular, levamos em consideração o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s)(DEWEY, 1991), Figuras 67 e 68.

Figura 67: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C), levando em consideração o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s).

Figura 68: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 30

e 35 °C), levando em consideração o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s).

Os valores das constantes de Stern-Volmer e de velocidade de supressão bimolecular encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante de velocidade de supressão bimolecular (k_s) para diferentes temperaturas de incubação

Temperatura (°C)	$K_{sv} (10^4)$		$k_s (10^8) (mol^{-1}Ls^{-1})$	
	280nm	295nm	280nm	295nm
25	6,77	6,54	2,02	1,95
30	7,57	6,91	2,26	2,06
35	7,71	7,27	2,29	2,17
Índice de correlação da equação (R)=0,998				

Pela Tabela 9, observamos que os valores das constantes de Stern-Volmer são bem próximos para os dois comprimentos de onda de excitação e para as três temperaturas de incubação, o que nos leva a acreditar que o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ esta interagindo preferencialmente na região que se encontra o triptofano na HSA.

Observamos que a constante de Stern-Volmer aumenta com o aumento da temperatura, o que sugere um mecanismo dinâmico de supressão de fluorescência. Esse aumento no valor das constantes pode ser explicado pela difusão do supressor quando este interage com a HSA em altas temperaturas (HOU et al., 2008).

Outro modo de verificarmos o tipo de mecanismo (dinâmico ou estático) envolvido no processo de supressão de fluorescência é compararmos a constante de velocidade de supressão bimolecular com a constante de difusão ($K_{dif} = 2 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$) que limita o processo bimolecular (WARE, 1962; MAURICE; CAMILLO, 1981; JIANG et al., 2002; LAKOWICZ, 2006; XIE et al., 2006).

Na literatura, estão descritos estudos de interação entre a albumina de soro humano e diferentes tipos de complexos metálicos (RAY et al., 2012; TABASSUM et al., 2012; LIU, YANYU et al., 2012; MAZURYK et al., 2012). Nestes estudos, as constantes de velocidade de supressão bimolecular apresentam valores maiores do que a constante de difusão, levando à conclusão que a supressão de fluorescência

da HSA ocorre por um mecanismo estático, com a formação de um aduto HSA-complexo no estado fundamental.

No sistema em estudo, podemos observar que o valor da constante de velocidade de supressão bimolecular (k_s) é menor que o valor da constante de difusão. Isso mostra que o processo dinâmico é predominante na supressão de fluorescência da HSA pelo complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.

Quando moléculas se ligam de forma independente a um conjunto de sítios equivalentes em uma macromolécula, o equilíbrio entre as moléculas livres e as moléculas ligadas é dado pela Equação 3.

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

Equação 3

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

A partir dos dados experimentais, construiu-se um gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ *versus* $\log[S]$, para cada comprimento de onda de excitação e temperatura de incubação, Figura 69 e 70.

Figura 69: Equação logarítmica (2) da supressão da fluorescência da HSA na presença do agente supressor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C).

Figura 70: Equação logarítmica (2) da supressão da fluorescência da HSA na presença do agente supressor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ ($2,2\text{-}13,2 \times 10^{-6}$ mol/L) para $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C).

A partir do coeficiente angular, foi possível obter o valor do número de sítios de ligação (n), e pelo coeficiente linear o valor da constante aparente de ligação (K_b), estes valores encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação do supressor (n), (coeficiente de correlação $R = 0,998$)

Temperatura	Kb (mol ⁻¹ L)		n	
	280nm	295nm	280nm	295nm
25 °C	1,74 x 10 ⁴	1,69 x 10 ⁴	0,868	1,27
30 °C	1,15 x 10 ⁴	1,38 x 10 ⁴	0,828	0,85
35 °C	0,616 x 10 ⁴	0,251 x 10 ⁴	0,778	0,69

Pela Tabela 10, podemos observar que os valores das constantes de ligação (K_b) diminuem com o aumento da temperatura, o que está de acordo com o modelo proposto por Stern-Volmer. Além disso, apresentaram praticamente, a mesma ordem de grandeza para os dois comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ e 295 nm), corroborando com a hipótese de que o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ está interagindo com a HSA preferencialmente em um único sítio.

Pelo número de sítios de ligação (próximos de 1) podemos concluir que o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ está se ligando com a HSA na proporção de 1:1. A Tabela 10 mostra que conforme a temperatura diminui, a constante de ligação (K_b) aumenta, isso indica que ocorre a formação de um complexo reversível entre $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+$ e HSA, isto quer dizer que a formação do complexo supressor-HSA pode ser considerado um processo dinâmico (HOU et al., 2008; GUO et al., 2009).

Basicamente quatro tipos de forças desempenham papel crítico na interação entre moléculas pequenas e macromoléculas, são elas: ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de van der Waals e forças hidrofóbicas (HOU et al., 2008; LIU, RONGHUA et al., 2011).

Os parâmetros termodinâmicos dependentes da temperatura, como a variação da energia livre (ΔG), variação da entalpia (ΔH) e variação da entropia (ΔS) são utilizados para caracterizar as forças ou tipos de ligação. ΔG está relacionado à espontaneidade da reação, enquanto ΔH e ΔS são as principais grandezas para avaliar a força da ligação (HU et al., 2009; XU et al., 2009). Do ponto de vista

termodinâmico ΔH e $\Delta S > 0$ sugerem forças hidrofóbicas; ΔH e $\Delta S < 0$ implicam em forças de van der Waals e ligações de hidrogênio; $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ refletem forças eletrostáticas (LIU, RONGHUA et al., 2011).

Se a temperatura não variar significativamente, os valores de ΔH podem ser considerados constantes, conseqüentemente, os valores de ΔH e ΔS podem ser calculados pela equação de van't Hoff, Equação 4 (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981; PAN et al., 2010).

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^\ominus}{RT} + \frac{\Delta S^\ominus}{R} \quad \text{Equação 4}$$

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

A variação de entalpia foi calculada pelo coeficiente angular a partir do gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$, Figura 71 e 72, e a variação de entropia pelo coeficiente linear dos mesmos gráficos. A variação de energia livre foi calculada de acordo com a Equação 5. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 11.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Equação 5}$$

Figura 71: Gráfico de van't Hoff para pH=7,4, HSA ($10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$.

Figura 72: Gráfico de van't Hoff para pH=7,4, HSA ($10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$.

Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos da interação entre o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ e HSA

		$\Delta H \text{ (kJmol}^{-1}\text{)}$		$\Delta S \text{ (Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}\text{)}$		$\Delta G \text{ (kJmol}^{-1}\text{)}$	
pH	Temperatura	280nm	295nm	280nm	295nm	280nm	295nm
7,4	25 °C					-24,20	-35,56
	30 °C	-79,06	-502,58	-183,68	-1570,13	-23,56	-24,03
	35 °C					-22,36	-20,06

Pela Tabela 11, observamos que todos os parâmetros termodinâmicos são menores que zero, mostrando que o processo de ligação é espontâneo ($\Delta G < 0$), e forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (ΔH e $\Delta S < 0$) estão envolvidas na ligação entre o supressor ($[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$) e HSA (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981; HU et al., 2004; RAY et al., 2012).

5. Considerações Finais

O principal objetivo do trabalho foi sintetizar o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ e caracterizá-lo utilizando varias técnicas espectroscópicas e voltamétricas, além de estudarmos a possível liberação de óxido nítrico através da fotólise e a interação do complexo com biomoléculas, no caso albumina humana.

Além do nitrosilo, também foram sintetizados e caracterizados os precursores $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, inéditos na literatura até o momento.

A síntese dos complexos precursores e do nitrosilo foram realizadas utilizando vias sintéticas previamente descritas na literatura. Observamos que após a síntese, os precursores $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]^+$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, apresentaram impurezas, ligantes livres ou o complexo precursor de cada um respectivamente. Optamos por realizar a purificação através de coluna cromatográfica de alumina neutra apenas do precursor direto do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$, afim de otimizarmos a síntese do mesmo e aumentarmos seu rendimento.

Seu espectro de massas mostrou o íon molecular intacto, confirmando o sucesso da obtenção do novo composto.

Os espectros de ^1H -RMN e de absorção na região do ultravioleta-visível mostraram que o complexo com o ligante 3-picolina aqui investigado apresenta um comportamento médio entre um complexo trinuclear reduzido e um complexo trinuclear oxidado. Esse fato reflete o aumento significativo da densidade eletrônica da unidade central $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, derivada da grande mistura orbital desta unidade com o ligante NO^0 e a conseqüente interação entre seus elétrons desemparelhados.

Já o espectro de infravermelho, o qual seria tipicamente influenciado pelo pK_a dos ligantes piridínicos, mostrou-se mais sensível à interação com o ligante NO^0 , corroborando o comportamento observado nas demais técnicas e a hipótese da grande interação entre o centro metálico e o óxido nítrico coordenado.

O perfil voltamétrico do novo complexo também é compatível com o observado para outros complexos trinucleares ligados à ligantes π -receptores como

CO, nitrilas e os demais nitrosilos desta classe. Portanto, até o presente momento os dados obtidos ratificam a estrutura proposta para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.

Pelos estudos de supressão de fluorescência foi possível observar que os valores da constante de Stern-Volmer obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza descrita na literatura para a interação de complexos de metais de transição com a HSA, sugerindo que o complexo está interagindo apenas da região em que se encontra o resíduo de triptofano, e que a interação ocorre na relação de 1:1. Pelos parâmetros termodinâmicos obtidos experimentalmente, podemos concluir que trata-se de um processo espontâneo, e forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio estão envolvidas na ligação complexo-HSA.

Em termos de uma possível aplicação deste complexo como liberador controlado de óxido nítrico, mostrou-se que a liberação fotoinduzida de NO ocorre em pH fisiológico. Portanto este complexo apresenta-se como uma alternativa promissora pois, apesar de ser parcialmente solúvel em água, apresenta liberação fotoinduzida de NO com comprimentos de onda na região do visível.

Referências

- ABE, M.; SASAKI, Y.; TADASHI, Y.; ITO, T. X-ray structure, ligand substitution, and properties of trinuclear ruthenium complex. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 65, p. 1585–1590, 1992.
- ABE, M.; SASAKI, Y.; YAMADA, Y. et al. Reversible Multistep and Multielectron Redox Behavior of an Oxo-Centered Trinuclear Diruthenium- Rhodium Derivatives. **Inorganic Chemistry**, v. 34, p. 4490–4498, 1995.
- ABE, M.; SASAKI, Y.; YAMADA, Y. et al. Oxo-Centered Mixed-Ligand Triruthenium Complexes Having Redox-Active N-Methyl-4 , 4 ' -bipyridinium Ions (mbpy +). Reversible Multistep Electrochemical Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 35, p. 6724–6734, 1996.
- AINSCOUGH, E. W.; BRODIE, A. M. Nitric-oxide - Some old and new perspectives. **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 8, p. 686–692, 1995.
- ALEXIOU, A.D.P.; DOVIDAUSKAS, S.; TOMA, H.E. Propriedades e aplicações de clusters trinucleares de carboxilatos de rutênio. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 785–793, 2000.
- ALEXIOU, ANAMARIA D P; TOMA, HENRIQUE E. NMR Spectroscopic Correlations for a Series of Triangular -Oxoruthenium Acetate Clusters containing Substituted Pyridine Ligands. **Journal of Chemistry Research (S)**, p. 338–339, 1997.
- ALEXIOU, ANAMARIA D. P. **Síntese, caracterização e reatividade de clusters trigonais de acetato de rutênio**, 1993. Universidade de São Paulo.
- ANG, W. H.; DYSON, P. J. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards chemotherapy. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 4003-4018, 2006.
- BARRETO, R. D. L.; CORREIA, R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046–1054, 2005.
- BAUMANN, J. A.; SALMON, D. J.; WILSON, S. T.; MEYER, T. J.; HATFIELD, W. E. Electronic Structure and Redox Properties of the Clusters $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_\text{L}_3]^{n+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 3342–3350, 1978.

BAUMANN, J. A.; WILSON, S. T.; SALMON, D. J.; HOOD, P. L.; MEYER, T. J. The Onset of Band-Like Properties in the Ligand-Bridged , Trimeric Cluster n. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 11, p. 2916–2920, 1979.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide , superoxide , and peroxynitrite : the good , the bad , and the ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1424–C1437, 1996.

BENTO, M. L.; TFOUNI, E. Spectra, reduction potenciales, and coordinates pyrazine basicities in the ruthenium (II) complexes. **Inorganic chemistry**, v. 27, p. 3410–3413, 1988.

BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 40, n. 31, p. 7817–23, 2011.

BERTINI, I.; LUCHINAT, C. Chapter 1 Introduction. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 150, p. 1–28, 1996.

BEZERRA, C. W. . .; SILVA, S. C. DA; GAMBARDELLA, M. T. P. et al. Water π -Donation in trans-Tetraammineruthenium (II): Effect on Coordinated-Water Properties Induced by a Trans NO Ligand. **Inorganic chemistry**, v. 38, p. 5660–5667, 1999.

BUCKINGHAM, D. A.; SARGESON, A. M. **Chelating agents and metal chelates**. New York: Academic Press, 1964.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in protein chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.

CHENG, Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 10, p. 9493–508, 2012.

COTTON, F. A.; NORMAN, J. G. Structural characterization of a basic trinuclear ruthenium acetate. **Inorganica Chimica Acta**, v. 6, n. 3, p. 411–419, 1972.

CURRY, S.; MANDELKOW, H.; BRICK, P.; FRANKS, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature structural biology**, v. 5, n. 9, p. 827–35, 1998.

DAVIS, S.; DRAGO, R. S. Synthesis , Characterization , and Oxidation Catalysis by a Novel (μ^3 -Oxo) triruthenium Carboxylate Complex. **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 4759–4760, 1988.

DEWEY, T. G. Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy. **Plenum Press**, p. 1–41, 1991. New York.

DOBSON, C. M. The structural basis of protein folding and its links with human disease. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 356, n. 1406, p. 133–45, 2001.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M. Revisão sobre óxido nítrico - Nitric oxide revision, 1980.

EFTINK, M. R. **Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Press, 1991.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W. The surprising life of nitric oxide. , 1993. C&EM.

FORNARI, E. C.; MARCHESI, M. S. P.; MACHADO, A. E. H.; NIKOLAOU, S. Exploring weak interactions to assemble a nitrosyl–ruthenium compound able to release NO under visible light irradiation. **Polyhedron**, v. 28, n. 6, p. 1121–1126, 2009.

GALANTINI, L.; LEGGIO, C.; KONAREV, P. V; PAVEL, N. V. Human serum albumin binding ibuprofen: a 3D description of the unfolding pathway in urea. **Biophysical chemistry**, v. 147, n. 3, p. 111–22, 2010.

GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)2**, v. 37, n. 7588-7598, 2009.

GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs & metal-based diagnostic agents - The use of metals in medicine**. John Wiley & Sons Ltd.: West Sussex, 2005.

GORINSTEIN, S.; GOSHEV, I.; MONCHEVA, S. et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. **Journal of protein chemistry**, v. 19, n. 8, p. 637–42, 2000.

GUO, X.; ZHANG, L.; SUN, X. et al. Spectroscopic studies on the interaction between sodium ozagrel and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 928, p. 114–120, 2009.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–15, 1992.

HOU, H.-N.; QI, Z.-D.; YANG, Y.-W. O. et al. Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, p. 134–139, 2008.

HU, Y.; XU, S.; ZHU, X.; GONG, A. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 74, n. 2, p. 526–31, 2009.

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

IGNARRO, L. J. Nitric oxide: biology and pathobiology. ,2000. California: Academic Press.

IGNARRO, LOUIS J.; CIRINO, G.; CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric Oxide as a Signaling Molecule in the Vascular System: An Overview. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, n. 6, p. 879–886, 1999.

JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPLER, B. K. Antitumor metal compounds: more than theme and variations. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 2, p. 183–194, 2008.

JIANG, C. Q.; GAO, M. X.; HE, J. X. Study of the interaction between terazosin and serum albumin: synchronous fluorescence determination of terazosin. **Analitica Chimica Acta**, v. 452, p. 185–189, 2002.

JONES, C. J.; THORNBAC, J. R. **Medicinal applications of coordination chemistry**. Cambridge: RCS Publishing, 2005.

KANDAGAL, P. B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 393–399, 2006.

KHAN, M. A.; MUZAMMIL, SALMAN; MUSARRAT, J. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. **International journal of biological macromolecules**, v. 30, n. 5, p. 243–9, 2002.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 6, p. 695–704, 2002.

KUDO, S.; BOURASSA, J. L.; BOGGS, S. E.; SATO, Y.; FORD, P. C. In situ nitric oxide (NO) measurement by modified electrodes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes. **Analytical biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 193–202, 1997.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York, 2006.

LIMA, R. G. DE; GAMA, M.; BONAVENTURA, D. et al. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 9, p. 2643–2650, 2005.

LIU, RONGHUA; YU, X.; GAO, W. et al. Study on the interaction between salivianic acid A sodium and bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 78, n. 5, p. 1535–9, 2011. Elsevier B.V.

LIU, YANYU; YU, Q.; WANG, C. et al. Ruthenium (II) complexes binding to human serum albumin and inducing apoptosis of tumor cells. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 24, p. 104–109, 2012.

LUNARDI, C. N.; SILVA, R S DA; BENDHACK, L M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 42, n. 1, p. 87–93, 2009.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231–12234, 1993.

MAURICE, R. E.; CAMILLO, A. G. Fluorescence quenching studies with proteins. **Analytical biochemistry**1, v. 114, p. 199–212, 1981.

MAZURYK, O.; KURPIEWSKA, K.; LEWIŃSKI, K.; STOCHEL, GRAŻYNA; BRINDELL, M. Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complexes NAMI-A and its reduced form. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 116, p. 11–8, 2012.

MIN, J.; MENG-XIA, X.; DONG, Z. et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 692, n. 1-3, p. 71–80, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**1, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standardisation by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. **The Analyst**, v. 125, n. 9, p. 1629–1632, 2000.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 5th ed. John Wiley & Sons INC., 1997.

NASCIMENTO, F. B. DO; POELHSITZ, G. VON; PAVAN, F. R. et al. Synthesis, characterization, X-ray structure and in vitro antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the “SpymMe₂” ligand, SpymMe₂=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 9, p. 1783–9, 2008.

NAZAROV, A. A.; GARDINI, D.; BAQUIÉ, M. et al. Organometallic anticancer agents that interfere with cellular energy processes: a subtle approach to inducing cancer cell death. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, 2012.

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

NIKOLAOU, S.; UEMI, M.; TOMA, HENRIQUE E. TOTAL ASSIGNMENT OF ^1H AND ^{13}C NMR SPECTRA OF A BRIDGED TRIRUTHENIUM CLUSTER-POLYPYRIDINE DIMER BASED ON 2D (COSY, HMQC, AND HMBC) TECHNIQUES. **Spectroscopy Letters**, v. 34, n. 3, p. 267–277, 2001.

NUNES, G. S. **Catálise oxidativa de clusters de rutênio e porfirinas supramoleculares**, 2005. Universidade de São Paulo.

OTA, K.; SASAKI, H.; MATSUI, T. et al. Syntheses and Properties of a Series of Oxo-Centered Triruthenium Complexes and Their Bridged Dimers with Isocyanide Ligands at Terminal and Bridging Positions. **Inorganic Chemistry**, v. 38, p. 4070–4078, 1999.

PAN, X.; LIU, RUTAO; QIN, P.; WANG, L.; ZHAO, X. Spectroscopic Studies on the Interaction of Acid Yellow With Bovine Serum Albumin. **Journal of Luminescence**, v. 130, n. 4, p. 611–617, 2010. Elsevier.

PAN, X.; QIN, P.; LIU, RUTAO; WANG, J. Characterizing the Interaction between tartrazine and two serum albumins by a hybrid spectroscopic approach. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6650–6, 2011.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V; BARBOSA, M. I. F. et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–107, 2011.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. VON; NASCIMENTO, F. B. DO; et al. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598–601, 2010.

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

POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J. **The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR**. 1st ed. Aldrich Chemical Company, 1993.

RAY, A.; SETH, B. K.; PAL, U.; BASU, S. Nickel(II)-Schiff base complex recognizing domain II of bovine and human serum albumin: spectroscopic and docking studies. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 92, p. 164–74, 2012.

REISNER, E.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K.; POMBEIRO, A. J. L. Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. **Inorganica Chimica Acta**, v. 361, p. 1569–1583, 2008.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. Metal Nitrosyls. ,1992. Oxford University Press.

RIJIT, S. H. VAN; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 1089–1097, 2009.

ROCHA, Z. N. DA; LIMA, R. G. DE; DORO, F. G.; TFOUNI, E.; SILVA, ROBERTO SANTANA DA. Photochemical production of nitric oxide from a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex by irradiation with light in the phototherapeutic window. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, n. 7, p. 737–740, 2008.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p. 1633–1648, 2007.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–102, 1981.

SALSMAN, J. C.; RONCO, S.; LONDERGAN, C. H.; KUBIAK, C. P. Tuning the electronic communication and rates of intramolecular electron transfer of dimers of trinuclear ruthenium clusters: bridging and ancillary ligand effects. **Inorganic chemistry**, v. 45, n. 2, p. 547–54, 2006.

SAMANTA, A.; PAUL, B. K.; GUCHHAIT, N. Spectroscopic probe analysis for exploring probe-protein interaction: a mapping of native, unfolding and refolding of protein bovine serum albumin by extrinsic fluorescence probe. **Biophysical chemistry**, v. 156, n. 2-3, p. 128–39, 2011.

SANTANA, D. C. A. S. DE; PUPO, T. T.; SAUAIA, MARÍLIA GAMA; SILVA, ROBERTO SANTANA DA; LOPEZ, R. F. V. Nitric oxide photorelease from hydrogels and from skin containing a nitro-ruthenium complex. **International journal of pharmaceutics**, v. 391, n. 1-2, p. 21–8, 2010.

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**, , n. li, 2013. Elsevier Ltd.

SAUAIA, MARÍLIA GAMA; OLIVEIRA, F. D. S.; LIMA, R. G. DE; et al. Syntheses, characterization and photochemical properties of new NO–ruthenium(II) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 8, n. 4, p. 347–349, 2005.

SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P. B.; ASHOKA, S. Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**², v. 786, n. 46-52, 2006.

SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P. B.; MANJUNATHA, D. H.; ASHOKA, S. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. **Dyes and Pigments**², v. 74, p. 665–671, 2007.

SHAW, A. K.; PAL, S. K. Spectroscopic studies on the effect of temperature on pH-induced folded states of human serum albumin. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 90, n. 1, p. 69–77, 2008.

SILVA, D. D. O. Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drugs as metallopharmaceuticals in cancer therapy. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 10, n. 4, p. 312–23, 2010.

SPENCER, A.; WILKINSON, G. μ -Oxo-triruthenium carboxylate complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 14, p. 1570, 1972.

SPENCER, ALWYN; WILKINSON, GEOFFREY. Reactions of μ_3 -oxo-triruthenium carboxylates with π -acid ligands. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 23, n. 8, p. 786, 1974.

STOCHEL, GRAYNA; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and metal complexes in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 171, p. 203–220, 1998.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular pharmacology**, v. 11, n. 6, p. 824–32, 1975.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.

SUN, H.; LI, H.; SADLER, P. J. Transferrin as a metal ion mediator. **Chemical reviews**, v. 99, p. 2817–2842, 1999.

TABASSUM, S.; AL-ASBAHY, W. M.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HSA): spectroscopic and molecular docking investigations. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 114, p. 132–9, 2012.

TAYYAB, S.; HAQ, S. K.; SABEEHA; et al. Effect of lysine modification on the conformation and indomethacin binding properties of human serum albumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 26, n. 2-3, p. 173–80, 1999.

TFOUNI, E.; FORD, PETER C. Thermal and Photochemical Properties of Some Trans-Disubstituted Tetraammineruthenium(II) Complexes of Aromatic Nitrogen Heterocycles, $[\text{trans-Ru}(\text{NH}_3)_4\text{LL}]^{n+}$. **Inorganic chemistry**, v. 18, p. 72–76, 1980.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1-2, p. 57–69, 2003.

THIEMENS, M. H.; TROGLER, W. C. Nylon production - An unknown source of atmospheric nitrous-oxide. **Science**, v. 251, n. 4996, p. 932–934, 1991.

THOMAS, G. **Medicinal chemistry**. 1 st ed. John Wiley & Sons INC., 2000.

TOMA, HENRIQUE E.; ALEXIOU, ANAMARIA D. P.; DOVIDAUSKAS, SERGIO. Extended Electronic Interactions in a Triangular μ -Oxotriruthenium Acetate Cluster Containing Nitric Oxide. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2002, n. 11, p. 3010–3017, 2002.

TOMA, HENRIQUE E.; ALEXIOU, ANAMARIA D.P. Dynamic electrochemical behaviour of a trinuclear μ -oxo ruthenium acetate cluster containing pyridine and dimethylsulphoxide ligands. **Electrochimica Acta**, v. 38, n. 7, p. 975–980, 1993.

TOMA, HENRIQUE E.; ALEXIOU, ANAMARIA D.P.; FORMIGA, A. L. B. et al. A nitric oxide releaser based on the μ -oxo-hexaacetate-bis(4-methylpyridine)triruthenium nitrosyl complex. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 10, p. 2891–2899, 2005.

TOMA, HENRIQUE E.; ARAKI, K.; ALEXIOU, A. D. P.; NIKOLAOU, S.; DOVIDAUSKAS, SERGIO. Monomeric and extended oxo-centered triruthenium clusters. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 221, p. 187–234, 2001.

TOMA, HENRIQUE E.; CIPRIANO, C. Spectroelectrochemistry and cyclic voltammetry of the trinuclear $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{pyrazine})_3]$ cluster. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 263, n. 2, p. 313–322, 1989.

TOMA, HENRIQUE E.; CUNHA, C. J.; CIPRIANO, C. Redox Potentials of Trinuclear μ -Oxo Ruthenium Acetate Clusters with Ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 154, p. 63–66, 1988.

WARE, W. R. Oxygen quenching of fluorescence in solution, an experimental study of the diffusion process. **Journal of Physical Chemistry**, v. 66, p. 455–458, 1962.

WESTCOTT, B. L.; ENEMARK, J. H. **Transition Metal Nitrosyls**. John Wiley & Sons INC., 1999.

XIE, M.-X.; LONG, M.; LIU, YUAN; QIN, C.; WANG, Y.-D. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1760, n. 8, p. 1184–91, 2006.

XIE, M.-X.; XU, X.-Y.; WANG, Y.-D. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1724, n. 1-2, p. 215–24, 2005.

XU, H.; LIU, Q.; ZUO, Y.; BI, Y.; GAO, S. Spectroscopic Studies on the Interaction of Vitamin C with Bovine Serum Albumin. **Journal of Solution Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 15–25, 2009.

YE, S.; ZHOU, W.; ABE, M. et al. Electrochemical control of CO/NO ligand exchange in a triruthenium cluster monolayer assembled on a gold electrode surface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 24, p. 7434–5, 2004.

ZHANG, YI; TONG, Y.; ABE, M. et al. Fabrication of photochemical pattern on a self-assembled monolayer (SAM) of a ruthenium cluster under electrochemical control. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 261, 2009.

ZHOU, W.; ZHANG, YI; ABE, M. et al. Surface coordination of nitric oxide to a self-assembled monolayer of a triruthenium cluster: an in situ infrared spectroscopic study. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 24, n. 15, p. 8027–35, 2008.