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

**“Complexos Trinucleares de Rutênio com ponte μ -oxo contendo ligantes
N-heterocíclicos e Monóxido de Carbono: Síntese, Caracterização e Estudo de
Interação com Biomoléculas”**

Mariete Barbosa Moreira

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química.**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

MARIETE BARBOSA MOREIRA

“Complexos Trinucleares de Rutênio com ponte μ -oxo contendo ligantes
N-heterocíclicos e Monóxido de Carbono: Síntese, Caracterização e Estudo de
Interação com Biomoléculas”

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

Área de Concentração: Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sofia Nikolaou

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto-SP

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Mariete Barbosa

Complexos Trinucleares de Rutênio com ponte μ -oxo contendo ligantes N-heterocíclicos e Monóxido de Carbono: Síntese, Caracterização e Estudo de Interação com Biomoléculas.

Ribeirão Preto, 2016.

134 p. : il. ; 30 cm

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sofia Nikolaou

1. Complexos Trinucleares de Rutênio. 2. Monóxido de Carbono. 3. Biomoléculas.

Folha de Aprovação

Mariete Barbosa Moreira

“Complexos Trinucleares de Rutênio com ponte μ -oxo contendo ligantes
N-heterocíclicos e Monóxido de Carbono: Síntese, Caracterização e Estudo de
Interação com Biomoléculas”

Aprovado em: Ribeirão Preto, 28 de julho de 2016.

Prof. Dr. Vagner Roberto de Souza

Instituição: Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Química.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de
Química, UNESP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Instituição: Universidade de São Paulo – Departamento de Química e Física, FCFRP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Maurício Almeida Caiut

Instituição: Universidade de São Paulo – Departamento de Química, FFCLRP.

Assinatura: _____

Prof. Dra. Sofia Nikolaou

Instituição: Universidade de São Paulo – Departamento de Química, FFCLRP.

Assinatura: _____

À Deus, pela sua fidelidade e amor incondicional.

À minha linda filha Maria Carolina, pelo carinho e compreensão.

À minha querida família por me assistir de todas as formas possíveis, pelo apoio, carinho e amor. Em especial à minha mãe, por me incentivar sempre e não medir forças para me ajudar.

*Aos meus três grandes mestres,
meus orientadores: Prof. Dr. Dionísio Borsato, Prof. Dr. Vagner Roberto de Souza e
Profª Dra. Sofia Nikolaou, todo o meu respeito, admiração e eterna gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Prof. Dra. Sofia Nikolaou pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela dedicação, atenção e pelos conhecimentos transmitidos. Sou e sempre serei grata por tudo que a professora me proporcionou neste tempo de aprendizado e amadurecimento científico.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, pela amizade, pela confiança, pela acolhida em seu laboratório, pelas discussões científicas, pelas contribuições realizadas no exame de qualificação e pelo uso dos reagentes e equipamentos.

Ao Prof. Gregoire Jean-François Demets, pelos conhecimentos transmitidos e pelas contribuições realizadas em meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Elia Tfouni, pelos conhecimentos e materiais de fotoquímica.

Ao Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon (IQ-USP - São Carlos), pela colaboração na obtenção dos resultados de difração de raios-X.

À Prof^a. Dra. Rogéria Rocha pela orientação no estágio PAE, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

À Prof^a. Dra. Rose Mary Z.G Naal e ao Prof. Zeki Naal pelas contribuições científicas, pela parceria em trabalhos e amizade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tonon (UNIFAL), pelos trabalhos em colaboração.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato (UEL), pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio constante, por acreditar em mim quando eu mais precisei, por ser meu grande amigo e meu pai.

Ao Prof. Vagner Roberto de Souza (UEM), pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio constante, pela confiança, pela amizade e por permitir e ajudar que outras portas se abrissem para mim.

À Prof^a Helena S. Nakatani (UEM), pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e amizade.

À Dra. Zumira Aparecida Carneiro, pela colaboração, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

À Dra. Lilian Pereira Franco, pela colaboração, pelos conhecimentos transmitidos, por ser minha amiga de todas as horas e por estar sempre disposta a me ajudar.

À doutoranda Josielle Abraão (IQ-Unicamp), pela colaboração nos experimentos de difração circular e por ser minha amiga querida de todas as horas.

Aos queridos técnicos: Dra. Ivana Borin, Me. Vinícius Pallareti, Mércia, Dra. Juliana Biazotto, Clóvis Junior, Murilo Pires e Maria Perpétua F. M. D. Lima pela prontidão em me assistir, pelas contribuições científicas, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do grupo da Prof^a. Dra. Sofia Nikolaou (em ordem alfabética) Bruna Possato, Camila F. N. da Silva, Felipe Reis, Luandra, Natacha Cacita e Ricardo. Registro aqui a minha gratidão a vocês, por participarem da minha vida em Ribeirão Preto, pela acolhida, amizade, por todas as contribuições científicas, pelas conversas, almoços, congressos, comemorações, enfim por tudo que fizeram por mim, sempre serei grata. Agradeço em especial a Bruna Possato (a parça dos clusters) que desde o meu primeiro dia em Ribeirão Preto mostrou-se muito solícita e afetiva, obrigada por tudo que você fez por mim. Agradeço também a Carolina Sarmiento e a Lilian Franco que não estão no grupo atualmente, mas que me proporcionaram bons momentos. Estendo a minha gratidão e carinho aos amigos do departamento de química da FFCLRP, Daniel, Camila Bussola, André Riul e Roberta Pugina.

Aos amigos do Grupo do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (em ordem alfabética) Aléxia, Ana Gaspari, Clóvis Júnior, Jaqueline, Jorge, Juliana Uzuelli, Juliana Biazotto, Laísa, Leandro, Loyanne, Renatinha e Tássia, Muito obrigada, a vocês e outros amigos e que fazem parte da FCFRP Perpétua, Laila, Pamela, Miqueias, David, Murilo e Marcia Franco, agradeço pelo apoio, pelas contribuições científicas, discussões, conversas, congressos, almoços, caronas, festas, comemorações, enfim muito obrigada de coração por terem me acolhido com tanto carinho e amizade.

Aos funcionários do Departamento que me ajudaram de alguma forma com o desenvolvimento do trabalho, em especial a Lâmia Antunes, sempre muito solícita.

Aos queridos amigos e ao Maestro Sérgio Alberto de Oliveira dos Corais Zênite e Madrigal Revives da USP, pelos momentos de qualidade, inspiração e beleza que passamos juntos, por tornar os meus dias mais belos e mais cheios de luz. Muito obrigada de coração.

À minha querida amiga de Maringá Ivânia Schuquel, pelo apoio constante, pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos de Londrina Hellen Caroline, Ana Pedro, Robson Pedrozo, Italo José Vitorino Netto, Janaína Vitorino, Silvia Borba, Kelly Spacino e Ivanira Moreira, por me incentivar sempre desde a graduação, muito obrigada pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Paulo Ricardo Franco Marcelino (Betty), pelo apoio constante, pelas contribuições científicas, pelas preocupações, por me amparar em todos os momentos, por ser mais que meu amigo, ser meu irmão de barriga separada. Muito obrigada.

À Adriana de Marques Freitas e Andréia Cristina Santana, por serem as irmãs que eu escolhi na graduação, pela amizade, apoio, incentivo e por serem meus anjos da guarda.

Aos meus irmãos queridos José Maria, Jú e Marta, por serem meu porto seguro, meu amparo em todos os momentos desde os meus primeiros passos, por acreditar em mim, pelo amor, carinho e apoio constante. Estendo a minha gratidão aos meus cunhados Sérgio Akira e Marili pelo apoio e carinho.

Aos meus amáveis sobrinhos Daniel e Leandro, por tornar meus dias mais coloridos.

Aos meus Pais, “pai e mãe ouro de mina”, pelo amor puro e incondicional. Não há palavras exatas para demonstrar a minha gratidão por tudo que fizeram por mim.

À minha filha Maria Carolina, por ser compreensiva, amorosa, leal e amiga em todos os momentos.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Número do Processo: 2012/22688-1) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a
sabedoria”*

Santo Agostinho

Sumário

Resumo	i
Abstract.....	ii
Estruturas Apresentadas Nesta Tese.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
Capítulo 1.....	1
<i>1.Introdução</i>	1
1.1.Os Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio.....	1
1.2. Complexos de Rutênio e o Monóxido de Carbono.	5
1.3. Albumina: Estrutura e função	9
1.4. DNA: Estrutura e função.....	12
1.5. Interações de Complexos Metálicos com a Albumina e com o DNA.	13
1.6. Atividade Biológica dos Complexos de Rutênio	15
<i>1.6.1. Os Complexos de Rutênio e o Câncer.....</i>	15
<i>1.6.2. Os complexos de Rutênio e a Doença de Chagas.....</i>	18
1.7. Objetivos:	23
Capítulo 2.....	24
<i>2. Procedimento Experimental.....</i>	24
2.1. Reagentes	24
2.2. Equipamentos	25
<i>2.2.1 Espectroscopia Eletrônica.....</i>	25
<i>2.2.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho.....</i>	26
<i>2.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	26
<i>2.2.4. Espectroscopia de Fluorescência.....</i>	26
<i>2.2.5. Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....</i>	26

2.2.6. Difração de Raio-X.....	27
2.2.7. Voltametria Cíclica.....	27
2.2.8. Análise Elementar.....	27
2.3. Métodos utilizados	28
2.3.1. Fotólises.....	28
2.3.2. Actinometria.....	28
2.3.3. Estudos de Interação com Albumina do Soro Humano (HSA).....	30
2.3.4. Estudos de Interação com o Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	31
2.3.5. Avaliação da Citotoxicidade in vitro dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio frente à Linhagem Celular B16F10	32
2.3.6. Avaliação da Atividade Tripanocida in Vitro dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio.....	32
2.4 . Sínteses.....	33
2.4.1. Síntese do Cluster Mãe $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$	33
2.4.2 . Síntese do Complexo Assimétrico $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(CO)]$	34
2.4.3 . Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(ampy)_2(CO)]$	35
2.4.4 . Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(dmap)_2(CO)]$	35
2.4.5. Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(adpy)_2(CO)]$	36
2.4.6 . Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(dmpz)_2(CO)]$	36
Capítulo 3.....	38
3.0. Resultados e Discussão	38
3.1. Sínteses e Purificação dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio de Fórmula Geral $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_2(CO)]$ onde (L= adpy, 4-ampy, dmap e dmpz)	38
3.2. Caracterização dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio de Fórmula Geral $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_2(CO)]$ onde (L= adpy, 4-ampy, dmap e dmpz)	41

3.2.1. Difração de Raios-X.....	41
3.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	47
3.2.3. Espectroscopia Eletrônica.....	59
3.2.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho.....	70
3.2.5. Voltametria Cíclica	79
3.3. Liberação Fotoinduzida de Monóxido de Carbono	844
Capítulo 4.....	90
4.0. Estudo da Interação entre Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio e a Biomoléculas alvo	90
4.1. Estudo da Interação entre Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio e a Albumina do Soro Humano (HSA).....	90
4.1.1. Supressão de Fluorescência da HSA.....	90
4.1.2. Determinação da Constante de Ligação entre o Complexo Trinuclear e a HSA.....	96
4.1.3. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos envolvidos na Interação entre a HSA e o Complexo Trinuclear.....	98
4.1.4. Análise Conformacional da HSA por Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	101
4.2. Estudo da Interação entre os Complexos Trinucleares e o Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	104
Capítulo 5.....	109
5.0. Avaliação do Potencial Biológico dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio	109
5.1. Avaliação da Citotoxicidade in Vitro dos Complexos Trinucleares de Rutênio frente à Linhagem de Células de Melanoma Murino (B16F10).....	109
5.2. Avaliação da Atividade Tripanocida in Vitro dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio.	112
6.0. Considerações Finais e Perspectivas	115
7.0. Referências	121

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura esquematizada do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{n}$	2
Figura 2: Estrutura do hexâmero ⁴⁴ $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{pz})(\text{CO})]_6$	4
Figura 3: Diagrama de orbitais moleculares da molécula de monóxido de carbono, foram omitidos os orbitais 1σ e $1\sigma^*$	5
Figura 4: Representação da ligação sinérgica entre CO e um centro metálico.	6
Figura 5: Catabolismo do grupo heme na presença das enzimas heme-oxigenases (HO-1 e HO-2). ⁵⁵	7
Figura 6: Estrutura dos compostos CO-RM2 (a), CO-RM3 (b) e CO-RMA1 (c). ⁵⁵	8
Figura 7: Representação da estrutura terciária da HSA, dividida em três sítios principais de ligação e subdomínios, adaptado da referência [68].	10
Figura 8: Representação da estrutura básica de um nucleotídeo.	12
Figura 9: Estrutura tridimensional das cadeias de DNA adaptado da referência [90]	13
Figura 10: Representação da estrutura dos complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{DMSO})\text{Cl}_4(\text{Im})]^-$, NAMI-A e $(\text{IndH})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})_2]$, KP1019.	17
Figura 11: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma Cruzi</i> , adaptado da referência 132	19
Figura 12: Estrutura dos compostos (a) Nifurtimox e (b) Benzonidazol.	20
Figura 13: Estrutura dos complexos trinucleares de acetato de rutênio.	22
Figura 14: Estrutura cristalográfica do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ mostrando a numeração dos átomos e as elipsóides de 50% de probabilidade.	41
Figura 15: Provável geometria da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ no complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$	44
Figura 16: Cella unitária do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$	45
Figura 17: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	49
Figura 18: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	49
Figura 19: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	50
Figura 20: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	50
Figura 21: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	51
Figura 22: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	51

Figura 23: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	52
Figura 24: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.....	52
Figura 25: Estruturas da série de complexos utilizada no estudo das correlações (1) 2,6-dimetilpirazina, (2) isonicotinamida, (3) 4-acetilpiridina ¹⁶² , (4) 3-metilpiridina ¹²⁷ , (5) 4-metilpiridina ¹⁶³ , (6) 4-terc-butilpirina ¹⁶² , (7) 4-dimetil(amino)piridina e (8) 4-aminopiridina.	54
Figura 26: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios das metilas das pontes acetato dos complexos em estudo e de outros sintetizados pelo grupo <i>vs</i> os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos (ampy, adpy, dmpz, dmap, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic).....	57
Figura 27: Sistemas de coordenadas usadas na construção do diagrama de orbitais moleculares da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^6$	59
Figura 28: Diagrama qualitativo de orbitais moleculares de clusters de acetato de rutênio (a) clusters simétricos e (b) adaptado para clusters assimétricos. ⁶	62
Figura 29: Espectros eletrônicos dos complexos em solução de acetonitrila (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{adpy})_2(\text{CO})]$, (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]$, (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$	63
Figura 30: Espectros eletrônicos dos complexos com carga formal zero $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})(\text{dmpz})_2]$ L= CO e CH_3OH	64
Figura 31: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos com os valores de energia dos λ_{max} das bandas TCCL (A) e dos λ_{max} das bandas IC (B)	66
Figura 32: Espectros vibracionais dos compostos (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]$, (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{adpy})_2(\text{CO})]$, (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$, (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$ na região do infravermelho obtidos a partir de pastilhas de KBr.....	70
Figura 33: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ em pastilhas de KBr.	72
Figura 34: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos e $\nu(\text{CO})$.para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L=adpy,ampy,dmap, dmpz, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic).	74
Figura 35: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos e $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ e de $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ $\nu(\text{CO})$.para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ sendo L=adpy, ampy, dmap, dmpz, acpy, 3-pic, 4-pic e tbpy	76
Figura 36: Modos normais vibração totalmente simétricos da molécula de pirazina. ¹⁵⁹	78
Figura 37: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / 0,1 M TBAPF ₆ , Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.....	80

Figura 39: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / 0,1 M TBAPF ₆ , Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.....	81
Figura 40: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / 0,1 M TBAPF ₆ , Ag/Ag ⁺) em acetonitrila.....	81
Figura 41: Gráfico de $E_{1/2}$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ versus pKa dos ligantes N-heterocíclicos (L= dmpz, adpy, acpy, 3-pic, 4-pic, tppy, dmap e ampy.	82
Figura 42: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.....	84
Figura 43: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.....	85
Figura 44: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.....	85
Figura 45: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.....	86
Figura 46: Dependência do rendimento quântico da liberação fotoinduzida do monóxido de carbono sob o valor de pKa dos ligantes terminais.	89
Figura 47: Representação da estrutura dos resíduos de aminoácidos (a) Fenilalanina, (b) Tirosina e (c) Triptofano.....	90
Figura 48: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença de (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ a 30 °C, $\lambda_{\text{Ex}}=280 \text{ nm}$; pH= 7,2; $[\text{HSA}]=1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Ru}] = 0,0; 1,1; 2,2; 3,2; 4,3; 5,3 \text{ e } 6,5$ ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), (a-g), respectivamente.....	93
Figura 49: Gráficos de Stern-Volmer da interação entre HSA e os complexos trinucleares de acetato de rutênio, em três diferentes temperaturas. (a) 35°C, (b) 30°C, e 25°C (c). F= Fluorescência na presença do supressor. F ₀ =Fluorescência na ausência do supressor. Solução tampão Tris-HCl pH=7,2. $\lambda_{\text{ex}}= 280 \text{ nm}$	94
Figura 50: Gráfico de $\log [(F_0-F)/F]$ versus $\log [\text{complexo}]$ em (a) 35°C, (b) 30°C e (c) 25°C, respectivamente, para o sistema HSA – complexo trinuclear de acetato de rutênio.	97
Figura 51: Gráfico de Van't Hoff referente à interação entre a HSA e complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ 100	100
Figura 52: Representação dos grupos da amida e suas ligações: Φ ($\text{RC}_\alpha\text{-NH}$) e Ψ ($\text{CO-C}_\alpha\text{R}$). 102	102
Figura 53: Espectros de CD da HSA na presença dos complexos trinucleares de acetato de rutênio (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ a 25 °C , $[\text{HSA}]= 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{Ru}]$ (0-5,3 $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).	103

Figura 54: Titulação dos complexos trinucleares (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$, (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ via espectroscopia eletrônica com adições de <i>ct</i> -DNA. 106	
Figura 55: Gráfico duplo-recíproco Benesi-Hildebrand em para os complexos trinucleares (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ 107	
Figura 56: Porcentagem de viabilidade celular (L929) dos complexos trinucleares de acetato de rutênio em diferentes concentrações ($5,25$ e $50 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em comparação com o controle. O número de células foi avaliado por MTT e os resultados são expressos como uma percentagem em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata. Valores em média $\pm$ SEM. Os tratamentos foram realizados com ANOVA-one way análises (* $p < 0,05$) utilizando o teste de Tukey. Complexos: (1) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ e (2) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$, (3) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, (4) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$, (5) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (6) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ 110	
Figura 57: Gráfico da viabilidade celular de células B16F10 incubadas com complexos trinucleares de acetato de rutênio em diferentes concentrações em comparação com o controle . Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores são a média $\pm$ SEM. Os tratamentos estatísticos foram realizados por ANOVA-one way (* $p < 0,05$) utilizando o teste de Tukey. Complexos: (1) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ e (2) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$, (3) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, (4) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$, (5) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (6) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ 111	
Figura 58: Atividade anti-Trypanosoma dos complexos trinucleares de acetato de rutênio e seus respectivos ligantes N-heterocíclicos livres. 113	

Índice de Tabelas

Tabela 1: Adaptações realizadas na rota sintética dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L= adpy, ampy, dmap e dmpz).....	39
Tabela 2: Dados do refinamento da estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$. ..	42
Tabela 3: Distâncias atômicas (Å) e principais ângulos de ligação (°)	43
Tabela 4: Comparação estrutural dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$	45
Tabela 5: Deslocamentos químicos δ de ^1H (ppm) dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy, adpy, dmap e dmpz em acetonitrila deuterada.....	48
Tabela 6: Deslocamentos químicos δ de ^1H (ppm) dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy, adpy, dmap, dmpz, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic em acetonitrila deuterada.....	56
Tabela 7: Valores de ϵ , λ_{max} e $\log \epsilon$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L=adpy, ampy, dmap e dmpz)	64
Tabela 8: Valores de pKa do ligantes terminais e λ_{max} das transições TCCL e IC dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L=adpy, ampy, dmap, dmpz, 3-pic, 4-pic, acpy e tbpy).	65
Tabela 9: Valores de frequência observados na região de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L=adpy, ampy, dmap e dmpz).	71
Tabela 10: Valores dos $\nu(\text{CO})$ e $\nu(\text{COO})$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L= adpy, ampy, dmap, dmpz, 3-pic, 4-pic, acpy e tbpy) e os respectivos valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos.	74
Tabela 11: Frequências calculadas para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{py})_2]$. ¹⁵⁹	77
Tabela 12: Valores de $E_{1/2}$ para os processos redox dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L = ampy, adpy, dmap, dmpz, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic	82
Tabela 13: Valores das bandas IC, da nova banda formada na região de 900 nm e dos pontos isobésticos formados durante a fotólise dos complexos em estudo.	86
Tabela 14: Valores de pKa e de rendimento quântico Φ da liberação fotoinduzida de CO a partir dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L = ampy, adpy, dmap, dmpz, 3-pic, acpy, tbpy e 4-pic.....	88
Tabela 15: Valores de K_{SV} e K_q para os complexos trinucleares de acetato de rutênio na presença de HSA em diferentes temperaturas.	95
Tabela 16: Constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) envolvidos na interação da HSA com o complexo trinuclear de acetato de rutênio.	97
Tabela 17: Parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre a HSA e o complexo trinuclear de acetato de rutênio	100

Tabela 18: Valores de IC ₅₀ (concentração mínima para causar a morte de 50% dos parasitas) e DL (atividade tóxica) dos complexos trinucleares de acetato de rutênio e seus respectivos ligantes N-heterocíclicos livres.	114
--	-----

M. B. Moreira, **Complexos Trinucleares de Rutênio com ponte μ -oxo contendo ligantes N-heterocíclicos e Monóxido de Carbono: Síntese, Caracterização e Estudo de Interação com Biomoléculas** [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2016, 134 p.

RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese e a caracterização de quatro complexos trinucleares de acetato de rutênio, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ nos quais L são ligantes N-heterocíclicos 4-aminopiridina, isonicotinamida, 4-(dimetil)aminopiridina e 2,6-dimetilpirazina com características π -aceptoras ou σ -doadoras. Os derivados de rutênio foram sintetizados de acordo com adaptações de rotas sintéticas já reportadas na literatura, e caracterizados por meio de técnicas de cunho espectroscópico, eletroquímico e outras, a saber: análise elementar, ^1H RMN, absorção UV-vis, infravermelho, voltametria cíclica e difração de raios-X. Foi investigada a liberação fotoinduzida de monóxido de carbono proveniente dos complexos trinucleares em acetonitrila, por meio de acompanhamento espectrofotométrico. O rendimento quântico envolvido na liberação do CO foi calculado por meio de actinometria química. Foi estudada a interação entre os complexos com as biomoléculas HSA e o DNA de timo de bezerro por meio das técnicas espectroscópicas de fluorescência, UV-vis e dicróismo circular. Além disso, foram realizados ensaios preliminares *in vitro* para avaliar a citotoxicidade dos complexos frente a uma linhagem de células de melanoma murinho (B16F10) e foi avaliada a atividade tripanocida dos complexos sobre a forma amastigota do parasita *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chaves: Complexos trinucleares de rutênio, Monóxido de carbono e Biomoléculas.

M. B. Moreira, **Trinuclear μ -oxo Ruthenium Complex containing N-heterocyclic ligands and Carbon Monoxide: Syntheses, Characterization and Studies on the Interaction with Biomolecules.** [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 2016, 134 p.

ABSTRACT

This work describes the synthesis and characterization of four ruthenium trinuclear complex of general formula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ where $\text{L} =$ 2,6-dimethylaminopyridine; isonicotinamide; 4-aminopyridine and 4-dimethylpyrazine (N-heterocyclic ligands with π -acceptor or σ -donor characteristics). The ruthenium derivatives were synthesized according to adaptations of synthetic routes already reported in literature and characterized by spectroscopic and electrochemical techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR), UV-vis, infrared, cyclic voltammetry, X-ray diffraction and elemental analysis. The photoinduced release of carbon monoxide in acetonitrile was investigated by means of spectrophotometric monitoring. The quantum yield involved in the CO release was calculated by chemical actinometry. It was studied the interaction between the complexes with the biomolecules HSA and calf thymus DNA by spectroscopic techniques of fluorescence, UV-vis and circular dichroism. In addition, preliminary tests were performed *in vitro* in order to evaluate the cytotoxicity of the complexes against a murine melanoma cell line (B16F10) and trypanocidal activity of the complexes over the amastigote form of the parasite *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: Ruthenium trinuclear complex, Carbon monoxide and Biomolecules.

Estruturas apresentadas nesta tese

Fórmula Molecular

Formula Estrutural

Cluster Mãe

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ampy	4-aminopiridina
Ac	acetato
ACN	acetonitrila
Adpy	4-isonicotinamida
CO	monóxido de carbono
COSY	correlated spectroscopy
DCM	diclorometano
dmap	4-dimetilaminopiridina
dmpz	2,6-dimetilpirazina
DNA	ácido desoxirribonucleico
$E_{1/2}$	potencial de meia onda (V)
E_{pa}	potencial de pico anódico
E_{pc}	potencial de pico catódico
Hb	hemoglobina
HO1	enzima heme-oxigenase 1
HO2	enzima heme-oxigenase 2
HOMO	orbital molecular ocupado de maior energia
HSA	albumina do soro humano
IC	transição intra cluster
LUMO	orbital molecular não ocupado de menor energia
MM	massa molar
RMN	ressonância nuclear magnética
TCCL	transição de transferência de carga cluster ligante

UV-vis	ultravioleta-visível
δ	frequência de deformação angular
ε	coeficiente de absortividade molar ($\text{mol. cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$)
λ	comprimento de onda (nm)
λ_{max}	comprimento de onda de máxima absorção
ν_{as}	frequência de estiramento assimétrico
ν_{s}	frequência de estiramento simétrico
$\nu(\text{CO})$	frequência de estiramento do monóxido de carbono
Φ	rendimento quântico

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Os Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio

O interesse pela química dos clusters trinucleares de acetato de rutênio, obtidos primeiramente por Mond em 1930, tem crescido bastante nos últimos anos.¹⁻⁵

Artigos de revisão reportam o desenvolvimento histórico desta importante classe de complexos.^{1,2} Contudo, como estes trabalhos foram publicados há mais de dez anos, neste texto serão abordados, além dos artigos clássicos, estudos e aplicações atualizadas sobre estes derivados de rutênio.

Em relação à obtenção dos clusters trinucleares de acetato de rutênio, geralmente as rotas sintéticas utilizadas são baseadas no método de síntese descrito por Spencer e Wilkinson. De acordo com este procedimento, ocorre uma reação de auto-organização, quando se faz reagir cloreto de rutênio III e uma mistura de acetato de sódio, ácido acético e etanol em aquecimento sob refluxo durante quatro horas.^{1,3} Sasaki e colaboradores sugeriram que durante esta reação ocorre a formação de um intermediário binuclear $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$, fato que explica a formação de clusters mistos do tipo $[\text{MRu}_2\text{O}(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^n$. Entretanto estudos sobre os possíveis mecanismos envolvidos nesta síntese ainda não foram publicados.^{1,6}

Os complexos trinucleares de acetato de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$ ($\text{L} = \text{CH}_3\text{OH}$, H_2O ou ligantes N-heterocíclicos, $n=+1$), apresentam três íons de rutênio organizados em um arranjo trigonal e mantidos por seis pontes laterais carboxilato ($\mu\text{-CH}_3\text{CO}_2$) e uma ponte central com um átomo de oxigênio ($\mu_3\text{-oxo}$).^{1,2,7} A esfera de coordenação de cada átomo de rutênio é completada por um ligante L que pode ser uma molécula de solvente (metanol) ou um ligante N-heterocíclico.⁶ A estrutura proposta para estes compostos é apresentada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura esquematizada do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$

De acordo com estudos de difração de raios-X realizados por Cotton e Norman, a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ possui estrutura planar e geometria de um triângulo equilátero. Neste arranjo o oxigênio ocupa a posição central e as ligações Ru-O-Ru formam ângulos de 120° . No caso de complexo onde um dos ligantes é o monóxido de carbono ou isocianeto a estrutura é descrita por um triângulo isósceles. Observou-se ainda, para complexos simétricos, que a distância entre os átomos de rutênio não varia com o estado de oxidação do metal, o que justifica a forte deslocalização eletrônica presente na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$.¹

O estudo da química dos clusters trinucleares de acetato de rutênio é fortemente motivado pelas suas interessantes propriedades eletroquímicas, a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ exibe até cinco processos redox reversíveis de 1,5V a 2,5V (vs EPH).^{8,9} O comportamento eletroquímico destes compostos pode ser oportunamente modulado por meio da substituição dos ligantes axiais L ^{8,10,11} ou por meio da troca de uma ou mais pontes de carboxilato.¹²⁻¹⁴

Estudos pioneiros de Toma e colaboradores mostraram a correlação entre os potenciais redox e os valores de pKa de ligantes N-heterocíclicos coordenados em clusters trinucleares de acetato de rutênio simétricos. Os potenciais redox destes compostos são influenciados pelo caráter π -aceptor ou σ -doador dos ligantes terminais. A natureza σ -doadora dos ligantes N-heterocíclicos estabiliza estados de oxidação mais elevados enquanto ligantes de caráter π -aceptor conduzem a estados de oxidação mais baixos.⁵ Recentemente Goeltz e colaboradores apresentaram um estudo sobre a influência da natureza π -aceptora e σ -doadora de ligantes piridínicos e azanaftalenos sobre a densidade eletrônica de complexos trinucleares de rutênio simétricos e

assimétricos.¹⁵

Em termos de modificações estruturais realizadas nestes complexos, vale ressaltar que a substituição das pontes de carboxilato é uma estratégia que está sendo muito utilizada para estudar a modulação dos processos redox e de transferência de elétrons. Trabalhos recentes demonstraram que a substituição total das seis pontes de carboxilato por pontes de dicloro acetato, causou um forte efeito indutivo na estrutura dos complexos, foi mostrado também que a substituição de uma das pontes carboxilato por pirazolildiazeno, ou 2,2-azobispiridina causou deslocamento positivo nos valores dos potenciais redox já conhecidos.^{12-14,16}

Os complexos trinucleares de acetato de rutênio constituem um importante grupo eletroativo.⁸ Esta interessante característica, aliada à facilidade de modulação dos processos redox, tem instigado o estudo da eletroquímica,^{7,8} espectroeletroquímica^{17,18} e da química de valência mista destes compostos.^{19,20}

Recentemente Kubiak apresentou um artigo descrevendo suas experiências no estudo da química e das propriedades espectroscópicas de dímeros de valência mista.²¹ Glover e colaboradores publicaram um trabalho de revisão apresentando estudos específicos sobre a transferência de elétrons inter e intra-molecular em clusters trinucleares de acetato de rutênio na forma de dímeros.⁴

Abe e seu grupo demonstraram a construção bem sucedida de nanoestruturas funcionais, constituídas por clusters trinucleares de acetato de rutênio em superfície de eletrodo de ouro. De acordo com esses estudos, é possível controlar eletroquimicamente com precisão o crescimento de camadas múltiplas de filmes destes complexos. Além disso, foi mostrado que a utilização destes complexos como blocos de montagem em estruturas nanométricas permite a modulação eletroquímica e a substituição fotoinduzida de ligantes, sendo possível o controle das propriedades de superfícies de filmes nano estruturados.²²⁻²⁶

Os clusters trinucleares de rutênio encontram outras aplicações importantes como em catálise,^{1,27,28} em dispositivos para conversão de energia²⁹ e em sensores colorimétricos.³⁰

Na Química Supramolecular, estes compostos são utilizados no desenvolvimento de estruturas estendidas, como unidades de montagem ('buildingblocks'),^{6,10} pois possuem um núcleo metálico triangular com valência deslocalizada e sítios de

coordenação axiais que quando combinados com ligantes em pontes, formam estruturas prolongadas²⁹ tais como dímeros,^{8,31-34} trímeros³² e tetrâmeros.²

O estudo destas estruturas polinucleares baseadas em clusters trinucleares de acetato de rutênio tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. Recentemente diversos autores apresentaram estudos sobre as propriedades químicas de dímeros sendo estudados os processos de transferência de elétrons^{33,35,36} e de valência mista,²⁰ além de propriedades eletroquímicas^{31,32,37} e espectroscópicas.³⁷

Além disso, foram investigadas também as propriedades de várias supermoléculas, tais como a eletroquímica e o eletrocromismo de metalopolímeros,^{29,38} a deslocalização eletrônica de dendrímeros,³⁹ o comportamento fotoquímico resultante da ligação entre complexos trinucleares de rutênio e porfirinas,^{40,41} e as reações de transferência de elétrons fotoinduzidas entre complexos de rutênio trinucleares ligados por ponte a complexo mononuclear polipirídínico.⁴²

Ainda nesta perspectiva, Nikolaou e Toma exploraram as propriedades eletrônicas e a versatilidade dos clusters trinucleares de acetato de rutênio na construção de estruturas supramoleculares estendidas como dendrímeros⁴³ e hexâmeros⁴⁴ (Figura 2). Outras estruturas e materiais híbridos também foram obtidos por meio da combinação de complexos trinucleares de rutênio com ciclodextrinas,⁴⁵ nanopartículas⁴⁶ e óxido de titânio em filmes.⁴⁷

Figura 2: Estrutura do hexâmero⁴⁴ $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{pz})(\text{CO})]_6$

Complexos trinucleares contendo monóxido de carbono (CO) coordenado, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ (L = ligantes piridínicos), têm encontrado aplicações apreciáveis, tais como na construção de nanoestruturas funcionais sobre eletrodos, como grupo protetor em rotas sintéticas, como sonda de reação em processos fotocatalíticos, no desenvolvimento de sensores colorimétricos, na construção de estruturas estendidas e de filmes metalopoliméricos e eletrocromicos.^{4,21-23,30,38,35,39,48,49} Além disso, estudos mostraram que complexos metálicos contendo CO coordenado constituem uma promissora classe de compostos a serem investigados, pois atualmente o CO tem sido reconhecido como uma molécula de sinalização no organismo humano, a qual participa de diversos processos fisiológicos, regulatórios e patogênicos.⁵⁰⁻⁵⁵

1.2. Complexos de Rutênio e o Monóxido de Carbono.

O monóxido de carbono é uma molécula diatômica, a qual apresenta configuração eletrônica $(1\sigma)^2, (2\sigma)^2, (1\pi)^4, (3\sigma)^2$. De acordo com a teoria dos orbitais moleculares, esta molécula apresenta caráter diamagnético e ordem de ligação igual a três.⁵⁶ O diagrama de orbitais moleculares do CO é apresentado na Figura 3.

Figura 3: Diagrama de orbitais moleculares da molécula de monóxido de carbono, foram omitidos os orbitais 1σ e $1\sigma^*$.

Segundo o diagrama de orbitais moleculares do CO, na combinação dos orbitais de fronteira, o HOMO (3σ) é totalmente preenchido e tem simetria σ , enquanto o LUMO ($1\pi^*$) é um par de orbitais π -antiligantes duplamente degenerados de simetria π , o qual participa de ligações com centros metálicos (M-CO) envolvendo retrodoação. Ocorre a doação de elétrons do orbital totalmente preenchido σ do CO para o orbital σ do metal, seguida de retrodoação dos orbitais t_{2g} cheios do metal para o orbital vazio π antiligante do CO. Como consequência desta ligação sinérgica, ocorre o fortalecimento da ligação entre o átomo de carbono e o metal e o enfraquecimento da ligação entre os átomos de carbono e oxigênio (Figura 4).⁵⁷

Figura 4: Representação da ligação sinérgica entre CO e um centro metálico.

O monóxido de carbono é um gás incolor, inodoro, pouco solúvel em água e apresenta densidade igual a $1,25 \text{ g L}^{-1}$. Este gás é produto da queima incompleta de matéria orgânica, a maior parte de sua emissão é proveniente da atividade industrial e de veículos automotores.⁵³

Durante décadas este gás foi conhecido apenas pelos seus efeitos tóxicos, pois o CO apresenta elevada afinidade pela hemoglobina (Hb), biomolécula responsável pela distribuição de oxigênio no organismo humano, a inalação de CO em elevadas concentrações por períodos prolongados conduz a hipóxia nos tecidos. Contudo atualmente é cada vez mais reconhecido que esta molécula simples desempenha um papel vital no organismo humano.⁵⁰⁻⁵⁵

Os efeitos fisiológicos do CO no corpo humano envolvendo a ligação CO-Hb foram descritos primeiramente por John Haldane nas primeiras décadas do século XX.⁵⁵ A produção endógena de monóxido de carbono em tecidos de mamíferos ocorre durante a degradação do grupo heme de uma ferroprotoporfirina. Esta reação é catalisada por meio das enzimas heme-oxigenase 1 (HO-1 - induzida) e pela

heme-oxigenase 2 (HO-2 - constitutiva). Durante este catabolismo são produzidos também íons ferro e biliverdina (Figura 5). No organismo humano a taxa de produção de CO é estimada entre 1 – 6 $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{dia}^{-1}$.^{50,55}

As enzimas heme-oxigenases estão presentes em todos os tecidos do organismo humano, são encontradas em elevada concentração no cérebro (HO-2), no fígado (HO-1 e HO-2), no baço (HO-1), nas células endoteliais vasculares e nos tecidos do musculo liso (HO-1 e HO-2).⁵²

Figura 5: Catabolismo do grupo heme na presença das enzimas heme-oxigenases (HO-1 e HO-2).⁵⁵

Nas últimas décadas diversos experimentos realizados em modelos *in vitro* e *in vivo*, confirmaram o potencial uso terapêutico do CO no tratamento de várias patologias. O monóxido de carbono liga-se ao grupo heme de proteínas e exerce efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, experimentos pré-clínicos mostraram que a administração de doses adequadas deste gás poderia aliviar processos inflamatórios e cardiovasculares.⁵²

A ação anti-inflamatória do CO foi apontada como a mais intrigante e potencialmente útil aplicação terapêutica para este gás, pois processos inflamatórios conduzem a uma variedade de patologias crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, cancro e obesidade. Estudos mostraram que o monóxido de carbono causou a redução de citocinas pró-inflamatórias, em diversos modelos *in vitro* de cultura de células.⁵²

No sistema vascular, as propriedades vasodilatadoras do CO são responsáveis

pela inibição da agregação plaquetária, pelo impedimento da apoptose de células endoteliais e controle da proliferação de células vasculares do músculo liso.⁵¹ Os efeitos benéficos do CO se estendem aos sistemas imunológico, respiratório, reprodutivo e gastrointestinal. Além disso, o monóxido de carbono atua como uma molécula sinalizadora no sistema neuronal, é responsável pela regulação de neurotransmissores e liberação de peptídios.⁵³

Ainda de acordo com a literatura, estudos *in vivo* mostraram que a molécula de CO atua sinergicamente com o óxido nítrico (NO) aumentando sua geração no endotélio.⁵⁵ Desta forma, os diversos benefícios do CO instigam seu uso terapêutico, porém do ponto de vista clínico, é importante que esta molécula seja liberada em tecidos e órgãos de interesse em pequenas concentrações sem oferecer toxicidade aos pulmões.⁵² Nesta perspectiva, complexos metálicos contendo CO coordenado são apontados como uma promissora alternativa para o desenvolvimento de fármacos liberadores de CO, pois estes compostos podem entregar CO de forma controlada e eficaz.^{52,54}

Estudos comprovaram o potencial promissor dos complexos carbonilos no design inovador de moléculas entregadoras de CO, o primeiro composto estudado foi o complexo dinuclear de rutênio lipossolúvel, tris(carbonil)diclororutênio(II) ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$) denominado CO-RM2 o qual exibiu vasodilatação *in vivo*. Foram investigados também os compostos $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl} \text{ glicinato}]$ (CO-RM3) e o $\text{Na}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ (CO-RMA1) solúveis em meio aquoso. Os três compostos (Figura 6) apresentaram diferentes cinéticas de liberação do CO.⁵⁵

Figura 6: Estrutura dos compostos CO-RM2 (a), CO-RM3 (b) e CO-RMA1 (c).⁵⁵

O potencial terapêutico de diversos complexos de rutênio contendo monóxido de carbono coordenado e a capacidade dos compostos de coordenação de atuarem como

provedores de monóxido de carbono tem despertado grande interesse no estudo de suas propriedades. Na etapa de racionalização de um novo fármaco é preciso entender como ocorre o transporte e a distribuição da substância pelo organismo para que seja avaliada a eficácia da nova substância, desta forma é fundamental investigar as interação entre compostos e biomoléculas relevantes como a albumina e o DNA.^{58,59}

1.3. Albumina: Estrutura e Função

As proteínas são biomoléculas fundamentais para a vida, constituem um dos principais alvos para muitas substâncias endógenas e exógenas no organismo humano. A albumina do soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo.⁶⁰⁻⁶² Nos mamíferos é sintetizada no fígado, apresenta tempo de vida de 19 dias e desempenha importantes funções fisiológicas tais como o controle da pressão osmótica, o sequestro de radicais livres de oxigênio e inativação de vários metabólitos tóxicos. Além disso, esta versátil macromolécula, realiza o transporte e a distribuição de ácidos graxos, drogas, hormônios, metais essenciais, terapêuticos e tóxicos no organismo humano.⁶³⁻⁶⁶

Em 1975 Behrens, Meloun e seus colaboradores divulgaram simultaneamente a sequência completa dos resíduos de aminoácidos que constituem a estrutura primária da HSA, a qual apresenta uma única cadeia peptídica composta por 585 resíduos de aminoácidos, estabilizados por 17 ligações dissulfeto, as quais são responsáveis pela grande estabilidade e longo tempo de vida que a proteína apresenta no plasma sanguíneo.⁶⁷⁻⁶⁹

A literatura reporta diversos trabalhos que apresentam aspectos estruturais e funcionais da HSA.^{63,64,67-69} Quanto à quantidade de resíduos de aminoácidos presentes na estrutura desta proteína, foi observada a presença de 17 grupos de tirosina (Tyr) e apenas um grupo triptofano (Trp-214) localizado no subdomínio IIA. A biomolécula possui também 35 resíduos de cisteína, sendo livre apenas o resíduo (Cys-34). Em geral, observou-se que os resíduos de Metionina (Met), glicina (Gli), e isoleucina (Ile) são poucos enquanto que os resíduos de cisteína (Cys), leucina (Leu), ácido glutâmico (Glu) e lisina (Lys) são abundantes. Em pH neutro a HSA apresenta uma carga líquida negativa.^{67,68,70}

Estudos cristalográficos revelaram que 67% da estrutura secundária da HSA é

constituída por α -hélice. Esta conformação é estabilizada por meio de ligações hidrogênio, entre os hidrogênios das carbonilas das ligações peptídicas e os nitrogênios das amidas dos quatro aminoácidos subsequentes.^{63,68,71}

A estrutura terciária da HSA tem sido alvo de muitos estudos. Dados de difração de raios-x mostraram que esta estrutura apresenta um formato semelhante a um coração, um triângulo equilátero de lados de aproximadamente 80 Å e com profundidade de 30 Å.^{63,67,72} A estrutura terciária desta biomolécula é organizada em três domínios estruturalmente semelhantes, denominados de I, II e III (domínio I: resíduos 1-195; domínio II: resíduos 196-383 e domínio III: resíduos 384-585), sendo que cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B como ilustrado na Figura 7.^{68,73,74}

Figura 7: Representação da estrutura terciária da HSA, dividida em três sítios principais de ligação e subdomínios, adaptado da referência [68].

Estudos cristalográficos mostraram também que a HSA apresenta locais específicos de ligações para diversas substâncias. Os dois principais sítios de ligação de fármacos na proteína são conhecidos como sítios I e II de Sudlow, e estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA respectivamente.^{67,68,70,75,76}

O sítio I de Sudlow localizado no domínio IIA é maior em tamanho quando comparado ao sítio II, é uma região não seletiva, pois tem a capacidade de abrigar diversas substâncias. Este sítio apresenta uma ampla região de ligação para ácidos dicarboxílicos e ligantes heterocíclicos e aromáticos. No interior da cavidade deste sítio são encontradas cadeias laterais dos resíduos de Tyr-150, His-242 e Arg-257 e na parte externa os resíduos de Lys-195, Lys-199, Arg-218 e Arg-222.⁶⁸

A estrutura cristalina da HSA revelou ainda que o sítio II de Sudlow, localizado

no domínio IIIA é basicamente uma cavidade hidrofóbica com aproximadamente 16 Å x 8 Å de profundidade, possui dois resíduos de natureza polar (Tyr-411 e Arg-410) e ácidos carboxílicos carregados negativamente. Fármacos como o diazepam, diflusinal e o ibuprofeno ligam-se preferencialmente à proteína neste sítio por meio de ligações de hidrogênio.⁶⁸ Além dos sítios de Sudlow, a HSA apresenta em sua estrutura regiões específicas para transporte e depósito de íons metálicos, tais como Mg (II), Al (III), Ca (II), Mn (II), Co (II), Ni (II), Cu (I) / (II), Zn (II), Cd (II), Pt (II), Au (I) / (II), Hg (II) e Tb (III). Estes sítios de ligação têm sido alvo de muitas investigações.^{76,77}

De acordo com a literatura a estrutura da HSA apresenta três sítios de ligação específicos para a coordenação de metais, os quais foram caracterizados por meio das técnicas de difração de raios-x, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e dicroísmo circular. Estas regiões são denominadas como sítio de ligação multimetálico ou sítio do Cádmio, sítio N-terminal e sítio de ligação da Cys-34,^{68,76,79,80}

O sítio de ligação multimetálico ou sítio do Cádmio é subdividido em duas partes A e B, neste sítio os íons metálicos de Cu (II), Ni (II), Zn (II) e Cd (II) ligam-se à proteína com elevada afinidade. Os íons metálicos de Cd (II) são os que apresentam o maior valor de constante de ligação (15×10^6 M). A HSA é o alvo principal para o transporte de Zn^{2+} no organismo, aproximadamente 98% dos íons de zinco encontram-se ligados à proteína. A coordenação do Zn^{2+} ocorre por meio do átomo de nitrogênio dos resíduos de His-67 e His-247 e também com o átomo de oxigênio dos resíduos de Asn-99 e Asp-247, sendo possíveis dois tipos de geometria uma bipirâmide trigonal ou um octaedro distorcido. A coordenação dos íons de Cu^{2+} neste sítio assume a geometria tetragonal.⁷⁸⁻⁸⁰

O sítio de ligação denominado N-terminal é uma região primariamente específica para os íons de Cu^{2+} e Ni^{2+} , os quais se ligam com elevada afinidade aos três resíduos terminais dos aminoácidos Asp-1, Ala-2 e His-3 assumindo uma geometria do tipo quadrado planar. Os íons de Co^{2+} se ligam a este ambiente por meio do grupo COO^- pertencente ao resíduo de Asp-1 e por meio do átomo de nitrogênio presente no resíduo Lys-4.⁷⁸

O terceiro sítio de ligação para metais da HSA é chamado de sítio da Cys-34. Este resíduo de aminoácido contém o único grupo tiol que não participa das pontes intermoleculares. O resíduo Cys-34 é responsável pelas propriedades antioxidantes da

biomolécula, é o resíduo mais sensível ao estress oxidativo, é reponsável pela captura de radicais livres e armazenamento de metais tóxicos, tais como o mercúrio Hg (II) que se liga preferencialmente a este sítio na forma de sal ou de complexo.^{68,77,80-82}

Estudos mostraram que íons metálicos (ácidos moles) como ouro (I) e seus complexos anti-artrite, Pt (II) e seus complexos anticancerígenos e íons de Ag^+ ligam-se à proteína com elevada especificidade por meio do átomo de enxofre (base mole) da Cys-34.^{68,78}

1.4. DNA: Estrutura e Função

Entre diversas biomoléculas presentes no meio biológico o ácido desoxirribonucleico (DNA) ocupa um lugar de destaque no desenvolvimento de novos medicamentos.⁸³⁻⁸⁵ O DNA é o principal alvo de muitos fármacos que estão em uso clínico ou em ensaios clínicos avançados. Esta importante macromolécula desempenha um papel fundamental nos processos biológicos, pois transporta os códigos de informação hereditária, ao quais são essenciais para as sínteses de proteínas e de enzimas e regula as funções da célula por meio da transcrição.⁸³⁻⁸⁷

A molécula de DNA é composta por uma cadeia linear longa contendo milhões de unidades básicas denominadas nucleotídeos, os quais são constituídos de um grupo fosfato, um açúcar pentose (a desoxirribose) e uma base nitrogenada, conforme ilustrado na Figura 8.^{88,89}

Figura 8: Representação da estrutura básica de um nucleotídeo.

As bases nitrogenadas envolvidas na formação dos nucleotídeos são a Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) e Citosina (C), por meio destas bases o DNA e o RNA,

codificam e armazenam todas as informações contidas no genoma de um indivíduo.^{88,89}

A estrutura do DNA é constituída por duas cadeias de nucleotídeos, unidas por meio de ligações de hidrogênio entre as bases complementares (Adenina e Timina; Citosina e Guanina), dispostas em hélice ao redor de um eixo imaginário (Figura 9).⁸⁸

Figura 9: Estrutura tridimensional das cadeias de DNA adaptado da referência [90]

1.5. Interações de Complexos Metálicos com a Albumina e com o DNA.

Atualmente a interação entre biomoléculas e compostos de coordenação tem atraído o interesse de muitos pesquisadores.^{60,61,70,79,91-94} O metabolismo, a distribuição e a eficácia de fármacos no organismo estão correlacionados com as afinidades destes compostos com a albumina do soro humano.⁹⁵⁻⁹⁷

Estudos sobre a interação entre possíveis metalofármacos de rutênio e biomoléculas são essenciais para o entendimento da atividade biológica destes complexos, pois 90% do rutênio presente no plasma sanguíneo encontra-se ligado à HSA e apenas uma pequena quantidade é ligada à transferrina.⁵⁹ Segundo a literatura os complexos de rutênio ligam-se à albumina espontaneamente por meio de ligações de caráter hidrofóbico, eletrostático ou por meio de ligações de hidrogênio com valores das constantes de ligação (K_b , $T = 30^\circ\text{C}$) variam entre 10^3 L mol^{-1} e 10^4 L mol^{-1} .^{60,61,70}

A HSA apresenta um sítio preferencial para a ligação dos complexos de rutênio localizado próximo ao resíduo de Trp-214 no subdomínio IIA, onde o íon de rutênio liga-se ao átomo de nitrogênio do anel imidazólico do resíduo de aminoácido de histidina. Esta ligação não induz alterações significativas na estrutura secundária da

proteína.⁷²

O estudo da interação entre o DNA e complexos metálicos, é de grande importância para a compreensão do mecanismo de ação de metalofármacos no organismo, a ligação de uma molécula ao DNA pode inibir a função da biomolécula por meio dos danos causados na sua estrutura. Desta forma, é possível a cura ou o controle de uma doença, como por exemplo, o câncer, uma vez que a replicação do DNA é inibida, a divisão celular das células cancerígenas é bloqueada resultando a apoptose celular.^{83,85}

Diversas técnicas espectroscópicas, a saber, eletrônica na região UV-visível, fluorescência, dicroísmo circular, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e outras técnicas como voltametria cíclica, eletroforese em gel e viscosidade têm sido bastante utilizadas no estudo da interação entre o DNA e complexos metálicos para determinar o modo de ligação dos complexos metálicos na estrutura do DNA.⁸³

De forma geral, existem dois possíveis modos de ligação entre o DNA e um composto de coordenação, o modo de ligação covalente e não covalente. Quando é estabelecida uma ligação covalente entre o DNA e um composto a ligação é irreversível e, em alguns casos, causa a inibição total das funções do DNA. Diversos medicamentos utilizados na terapia do câncer realizam ligação covalente com o DNA por meio de alquilação ou por ligações inter e intra cadeias da estrutura da macromolécula.⁸³

Quando é formada uma ligação entre um complexo metálico e o DNA, o derivado metálico pode ligar-se à estrutura da macromolécula por meio de três modos: intercalação, através das cavidades (sulcos) presentes na estrutura da biomolécula ou por atração eletrostática. Na ligação via intercalação o complexo metálico se encaixa entre as bases nitrogenadas da estrutura do DNA sem romper as ligações de hidrogênio presentes entre as bases, sendo estabilizado por meio de forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interação π - π stacking.^{83,98}

A estrutura do DNA apresenta dois tipos de cavidades entre as suas cadeias, uma região onde as duas fitas estão mais próximas, chamada de cavidade menor, e outra região onde as fitas da biomolécula estão mais distantes uma da outra, denominada cavidade maior. Estas regiões do DNA são sítios de ligação onde complexos de metal de transição podem ligar-se através do átomo de nitrogênio da adenina ou pelo átomo de oxigênio da timina, estabilizando-se por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van

der Waals.⁸³ Outra possível forma de ligação nentre um complexo metálico e o DNA é a ligação de natureza eletrostática. Nesta ligação é formada uma interação entre os grupos fosfatos da estrutura do DNA, os quais são carregados negativamente e complexos de esfera catiônica.⁸³

1.6. Atividade Biológica dos Complexos de Rutênio

1.6.1. Os Complexos de Rutênio e o Câncer

O câncer é uma das doenças mais preocupantes e temidas em todo o mundo.⁹⁹ De acordo com as estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), esta doença é a segunda maior causa de mortes em todo o mundo, foi responsável por 84 milhões de óbitos entre 2005-2015.¹⁰⁰

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2016) estima cerca de 600 mil novos casos de câncer para os anos de 2016 e 2017 no Brasil.¹⁰¹ O câncer, definido como neoplasia, é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas, o qual gera a formação de novos vasos sanguíneos para a nutrição das células, este processo é denominado angiogênese. O acúmulo de células cancerígenas forma tumores malignos. As células cancerígenas têm a capacidade de se desprenderem de tumores e migrarem para tecidos vizinhos e também para órgãos distantes do local em que o tumor teve início, formando assim as metástases.⁹⁹ O câncer pode ser adquirido por meio de fatores hereditários ou por ação de fatores de risco encontrados no meio ambiente.⁹⁹

Os principais tratamentos disponíveis para a terapia do câncer são cirurgia, radioterapia e a quimioterapia.⁹⁹ O câncer é considerado uma doença de saúde pública mundial, muitos esforços têm sido realizados na busca pela cura desta doença, tais como campanhas para estimular o diagnóstico precoce da doença (câncer de mama e câncer de próstata), campanhas e leis anti-tabagismo (câncer de pulmão), vacinação contra o vírus do papiloma humano (HPV, câncer de colo de útero) e pesquisas acadêmicas que buscam o desenvolvimento de fármacos eficazes.

A química inorgânica medicinal tem desempenhado um importante papel na busca por substâncias para o tratamento do câncer. O complexo *cis*-(diaminodicloro) Platina (II) conhecido como cisplatina, foi o primeiro

metalofármaco utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o de testículo, ovário, cabeça, pulmão, estômago e esôfago.¹⁰² Entretanto embora este composto tenha sido um agente anti-cancerígeno eficiente, o uso da cisplatina no tratamento de tumores sólidos tem sido limitado devido a efeitos tóxicos indesejados, tais como resistência adquirida a células cancerígenas, toxicidade renal, baixa solubilidade em água.¹⁰³ e severos efeitos colaterais manifestados por meio de náuseas e vômitos intensos. Tais efeitos adversos são consequência do acúmulo da cisplatina no organismo, devido à forte ligação que este complexo realiza com proteínas e peptídeos.¹⁰⁴

Entre as diversas classes de complexos metálicos estudados, merece destaque os derivados de rutênio. Estes compostos têm sido projetados atualmente como metalofármacos promissores, pois apresentam atividade anti-metastática superior à platina, em muitos casos são solúveis em água, eficientes na intercalação com o DNA e apresentam potenciais de oxidação/redução acessíveis em meio biológico.¹⁰⁵⁻¹¹⁰

A investigação sistemática de complexos de rutênio para aplicação na área biológica teve início em 1980, impulsionada pela descoberta da atividade antitumoral do corante vermelho de rutênio em 1970. Clarke e colaboradores apresentaram a atividade antitumoral dos cloroamino complexos de rutênio (II) $\text{fac-[RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]\text{Cl}$ e $\text{cis-[RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$, os quais foram inspirados na cisplatina.^{59,105} Desde então o interesse na aplicação dos complexos de rutênio para fins terapêuticos tem crescido a cada ano.^{106,111,112}

As grandes expectativas depositadas nesta classe de compostos são justificadas por meio das suas propriedades, tais como a geometria octaédrica, a qual permite várias possibilidades de ligação com o DNA, à formação de complexos previsíveis e estáveis de estado de oxidação II, III e IV em meio fisiológico, a facilidade na troca de ligantes e semelhança com a química do ferro, além disso, os complexos de rutênio penetram com relativa facilidade em tumores, apresentam citotoxicidade seletiva para células cancerígenas e são interessantes agentes anti-metásticos e anti-angiogênicos.^{111,107, 113-115}

O derivados $[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]^-$, sendo Im = imidazol, denominado NAMI-A e o (IndH) $[\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})_2]$ sendo Ind= indazol chamado KP1019, ilustrados na Figura 10, foram os primeiros compostos de rutênio submetidos a ensaios clínicos.

Figura 10: Representação da estrutura dos complexos $\text{trans-[Ru(DMSO)Cl}_4\text{(Im)]}^-$, NAMI-A e (IndH) $[\text{trans-RuCl}_4\text{(Im)}_2]$, KP1019.

O comportamento destes complexos tem mostrado que são promissores candidatos a metalo-fármacos para uso na terapia do câncer, pois na segunda fase de testes clínicos o NAMI-A demonstrou ser muito eficiente contra a metástase de tumores experimentais, enquanto o KP1019 exibiu atividade contra vários tumores humanos e várias linhagens de câncer, os quais são resistentes à cisplatina, além disso, foi absorvido mais facilmente pelas células que o NAMI-A.^{59,116-118}

Recentemente o potencial anticancerígeno *in vitro* de diversos complexos de rutênio e as suas interações com biomoléculas alvo, como o DNA e a HSA têm sido investigados extensivamente. Entre os compostos estudados estão complexos mononucleares organometálicos, complexos de rutênio (II) contendo como ligantes tiourea, fosfinas e bipyridina, complexos mononucleares contendo antibióticos coordenados, complexos binucleares contendo antiinflamatórios não estereoidais como ligantes, e complexos trinucleares de acetato de rutênio, contendo ligantes piridínicos e óxido nítrico coordenado. Além disso, complexos rutênio-ftalocianinas têm sido apontados como promissores fotosensibilizadores para utilização na Terapia fotodinâmica (TFD).^{76, 119-121}

O DNA é um dos principais alvos biológicos dos complexos de rutênio. De acordo com a literatura, complexos de rutênio com relevante atividade antitumoral ligam-se, preferencialmente às bases nitrogenadas do DNA por meio do átomo de nitrogênio da guanina, modificando a conformação da biomolécula. A atividade anticancerígena de muitos derivados de rutênio é consequência da ligação e de danos

que estes compostos causam na estrutura da macromolécula.^{122,123}

1.6.2. Os complexos de Rutênio e a Doença de Chagas

A atuação dos complexos de rutênio na área bioinorgânica não se restringe a agentes anticancerígenos. A investigação da atividade biológica dos derivados de rutênio se estende para a aplicação destes compostos na terapia de diversas doenças.^{120,124} Recentemente foi demonstrado o potencial antialérgico dos complexos binucleares de acetato de rutênio contendo antiinflamatórios não estereoidais frente à degranulação mastocitária.¹²⁵ Além disso, as características fotoquímicas e eletroquímicas dos derivados de rutênio mono e trinuclear instigam o desenvolvimento de compostos que possam atuar como agentes liberadores ou sequestradores de moléculas endógenas importantes como o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) *in vivo*.^{52,126-128} Resultados *in vitro* mostraram que os compostos de rutênio são apontados como promissores fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas tais como a malária, a leishmaniose e a doença de chagas.^{120,129,130}

A doença de chagas é uma infecção crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma Cruzi* (*T. Cruzi*)¹²⁹⁻¹³¹ Esta doença parasitária é transmitida ao homem por meio da picada do hematófago triatomídeo (conhecido como bicho barbeiro); o protozoário presente nas fezes do vetor é inoculado no mamífero, outras formas de transmissão são pela transfusão sanguínea e por meio da ingestão de alimentos contaminados. Os sintomas agudos mais frequentes da doença são febre, conjuntivite, lesões cutâneas e inchaço dos gânglios linfáticos e tecidos.¹³²⁻¹³⁴ A infecção crônica apresenta uma fase assintomática que pode se estender até por trinta anos, causando insuficiência cardíaca, problemas no trato digestivo e morte súbita.¹³²

De acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a doença de chagas é classificada como uma doença negligenciada endêmica na América Latina. Esta doença é prevalente em países pobres, onde afeta a vida de 10-12 milhões de pessoas, sendo responsável por mais de 15.000 mortes por ano.^{132,133,135,136} Atualmente esta doença negligenciada é considerada um importante problema de saúde pública, pois além de afligir a população de países subdesenvolvidos, tem sido disseminada na América do

Norte e na Europa devido a globalização¹³⁶⁻¹³⁸

Em 1909 estudos realizados pelo médico brasileiro Carlos Chagas identificaram o protozoário *T. Cruzi* e posteriormente foi determinado pelo pesquisador a manifestação clínica, a epidemiologia e o ciclo de vida completo do parasita em vetores e em hospedeiros humanos.¹³² (Figura 12)

O ciclo de vida do *T. Cruzi* envolve dois tipos de hospedeiros vertebrado e invertebrado (Figura 11). Além disso, são observadas três formas distintas para o protozoário: epimastigota (presente no vetor), tripomastigota (presente no sangue, forma infectante) e amastigota (forma de replicação celular). A doença de chagas apresenta duas fases: A fase aguda caracterizada por inflamação do miocárdio, a qual dura em média dois meses e a fase crônica que pode se estender por toda a vida do hospedeiro.^{131,139}

Figura 11: Ciclo de vida do *Trypanosoma Cruzi*, adaptado da referência 132

No início da década de 1970 surgiram dois compostos para uso no tratamento da doença de chagas o nifurtimox (3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) e o benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida), estes medicamentos são até o presente momento a única opção de tratamento para a doença de chagas. Estes fármacos têm eficácia considerável na fase aguda da doença, quando administrados na fase crônica a eficácia é reduzida.^{139,140} O

nifurtimox e o benzonidazol apresentam muitos efeitos colaterais graves, elevada toxicidade e resistência, desta forma já não estão sendo mais prescritos por médicos.^{132,134-136,141} (Figura 12).

Figura 12: Estrutura dos compostos (a) Nifurtimox e (b) Benzonidazol.

A doença de chagas tem se agravado devido à falta de investimentos em programas de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, pois os esforços para a busca de medicamentos para o tratamento desta doença negligenciada são realizados apenas por meio da pesquisa acadêmica, uma vez que a indústria farmacêutica não tem interesse no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças de países pobres.^{132,135,138} Desta forma, se faz necessária a prospecção por novas substâncias alternativas ao nifurtimox e o benzonidazol.

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos apresenta caráter multidisciplinar, pois integra áreas como a medicina, bioquímica, farmácia e química.¹³⁹ A introdução de derivados metálicos em sistemas biológicos para fins terapêuticos é a principal estratégia da química inorgânica medicinal, a aplicação de vários compostos metálicos no tratamento de muitas doenças tem demonstrado o sucesso desta abordagem.^{59,129,142,143}

De acordo com a literatura os primeiros compostos de metais de transição aplicados na terapia da doença de chagas foram sais de ouro, cobre e zinco.¹³⁹ A atividade antitrypanossoma de muitos compostos de coordenação, tais como complexos de cobalto, cobre, manganês, ferro, paládio, platina, níquel, vanádio, ródio, irídio e ósmio foi avaliada, merecendo destaque os complexos de rutênio.^{136,141,144-149}

Na década de 1980 foi investigada a atividade antitrypanossoma de diversos complexos de metais de transição com atividade antitumoral devido às semelhanças metabólicas e os sistemas de proteção de tripanosomatídeos e algumas células

cancerígenas.¹³⁹ Nos anos seguintes foram publicados trabalhos apresentando uma possível correlação entre a atividade antitumoral e a atividade antitrypanossoma de complexos de platina e de rutênio. Foi demonstrada a atividade antitrypanossoma de uma série de complexos amino e dimetilssulfóxido de rutênio como $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4]\text{Cl}_2$ e $[\text{Ru}(\text{DMSO})_2\text{en}]$, os quais se mostraram promissores.¹³⁹

Uma das estratégias utilizadas no desenvolvimento de substâncias antiparasitárias é a coordenação de inibidores da biossíntese de esteróis como o cetoconazol, trabalhos mostraram que após a coordenação de cetoconazol a centro metálico de Ru (II) e (III) a atividade antitrypanossoma foi aumentada em dez vezes.¹³⁹ Complexos de rutênio de fórmula geral $[\text{RuCl}_n\text{L}]$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_n\text{L}]$ e $[\text{Ru}(\text{DMSO})\text{L}_n]$ demonstraram ser mais ativos e menos citotóxicos que complexos de análogos de rênio, ouro, platina e cobre.¹³⁹

Atualmente complexos de rutênio (II) foram estudados em associação com benzonidazol, apresentando resultados interessantes.¹⁵⁰ Os complexos trinucleares de acetato de rutênio constituem uma importante classe de complexos metálicos, a qual há algum tempo tem despertado o interesse de muitos pesquisadores.¹⁻³ Contudo, apesar da grande quantidade de estudos e aplicações apresentadas para estes compostos, atualmente a literatura ainda não apresenta a aplicação dos complexos trinucleares de acetato de rutênio contendo CO coordenado na área biológica.

Na última década, alguns trabalhos focaram uma potencial aplicação em bioinorgânica apenas para estes derivados de rutênio contendo NO coordenado e para complexos trinucleares simétricos, porém esta investigação ainda não foi estendida aos complexos trinucleares carbonilos.^{119,127,151-153} Até o presente momento os estudos reportados na literatura para complexos trinucleares de acetato de rutênio contendo CO coordenado não abordam aplicações biológicas.^{4,20-22,29,35,38,48,49}

Recentemente o grupo de pesquisa da Prof^a. Dra. Sofia Nikolaou apresentou um trabalho reportando a atividade citotóxica de um complexo nitrosil trinuclear de acetato de rutênio frente a células de melanoma murino e um outro trabalho no qual foi investigada a interação entre um complexo nitrosil trinuclear de acetato de rutênio e a HSA.^{60,119}

Desta forma, pretende-se ampliar a contribuição na área de química bioinorgânica por meio dos resultados obtidos neste trabalho, no qual é reportada a síntese, a caracterização e a liberação fotoinduzida de monóxido de carbono proveniente de complexos trinucleares de acetato de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ ($\text{L} =$ 2,6-dimetilpirazina (dmpz), 4-dimetilaminopiridina (dmap), 4-aminopiridina (ampy) e isonicotinamida (adpy)). (Figura 13) É apresentada também a interação entre estes complexos e as biomoléculas HSA e o DNA e estudos *in vitro* visando avaliar a atividade tripanocida dos complexos trinucleares e a sua citotoxicidade frente a células de melanoma murino (B16F10).

Figura 13: Estrutura dos complexos trinucleares de acetato de rutênio.

1.7. Objetivos:

Este trabalho tem como objetivo a síntese, a caracterização de uma série de quatro complexos trinucleares de acetato de rutênio, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L= 2,6 dimetilpirazina (dmpz), 4-dimetilaminopiridina (dmap), 4-aminopiridina (ampy) e isonicotinamida (adpy) e o entendimento da influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais (L) sobre a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$. Outro alvo deste trabalho é avaliar o potencial dos complexos trinucleares de acetato de rutênio para aplicação na área biológica. Desta forma, foi investigada a liberação fotoinduzida de CO proveniente dos complexos trinucleares e a interação entre estes derivados de rutênio com alvos biológicos importantes, como a albumina do soro humano e o *ct*-DNA. Estudos *in vitro* avaliaram a citotoxicidade dos complexos frente a uma linhagem de células de melanoma murino (B16F10) e também a atividade tripanocida dos complexos sobre a forma amastigota do parasita *Trypanosoma cruzi*.

Capítulo 2

2. Procedimento Experimental

2.1. Reagentes

Os reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

Reagentes	Procedência
Solventes	
acetona	Neon
acetonitrila	J.T.Baker
diclorometano	Neon
dicloroetano	Neon
Etanol	Synth
éter etílico	Synth
metanol	Synth
Ligantes	
4-aminopiridina	Sigma Aldrich
4-dimetilaminopiridina	Sigma Aldrich
2,6-dimetilpirazina	Sigma Aldrich
Isonicotinamida	Sigma Aldrich
Outros	
albumina do soro humano	Sigma Aldrich
ácido acético glacial	Neon
ácido fórmico	Neon
ácido sulfúrico	Neon
acetato de sódio trihidratado	Sigma Aldrich
alumina neutra	Sigma Aldrich
alumina em placa (TCL)	Sigma Aldrich
brometo de potássio	Sigma Aldrich
benzonidazol	Sigma Aldrich
cloreto de ferro (III)	Sigma Aldrich
cloreto de mercúrio	Sigma Aldrich
cloreto de amônio	Sigma Aldrich

<i>ct</i> -DNA	Sigma Aldrich
hexafluorofostato de tetrabutilamônio	Sigma Aldrich
oxalato de potássio	Sigma Aldrich
$\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich
RPMI 1640	Sigma Aldrich
sílica	Sigma Aldrich
sílica em placa (TLC)	Sigma Aldrich
soro bovino fetal	Sigma Aldrich
triptofano	Sigma Aldrich
trizma-HCl	Sigma Aldrich
1,10-fenantrolina	Sigma Aldrich
kit Galactosidase (quantitativo)	Life Technologies

2.2. Equipamentos

2.2.1 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos foram registrados em um espectrofotômetro Agilent 8453, na região de 190 a 1100 nm, foram empregadas cubetas de quartzo quadradas de caminho óptico igual a 1 cm. Os valores dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) dos complexos foram calculados de acordo com a Lei de Lambert-Beer, a partir de medidas de absorbância em um determinado comprimento de onda para várias soluções de diferentes concentrações. Por meio dos espectros de absorção foram construídos gráficos relacionando os valores de absorbância contra os valores de concentração correspondentes, através de regressão linear foi obtida uma reta, onde seu coeficiente angular corresponde ao ϵ . As soluções estoque foram preparadas em acetonitrila com concentração da ordem de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e por meio de diluições adequadas foram obtidas as demais concentrações.

2.2.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro FTIR da Shimadzu, modelo IR Prestige, na região 400 a 4000 cm^{-1} . Amostras de aproximadamente 3 mg foram dispersas em aproximadamente 200 mg de KBr. Foi realizada uma média de 25 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

2.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ^1H e de COSY foram registrados em um equipamento Bruker Avance, modelo DRX 500 (500 MHz) pertencente a Central Analítica do Departamento de Química da FFCLRP-USP. As amostras foram preparadas em acetonitrila deuterada em concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

2.2.4. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão dos resíduos de Trp da HSA foram registrados usando cubetas de quartzo de 1 cm caminho ótico, em um espectrofluorímetro da marca Shimadzu modelo RF-5301PC. (largura das fendas de excitação e de emissão: 5 nm). As amostras, em concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, foram excitadas em 280 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa entre 300 e 550 nm após 5 minutos. Os espectros de emissão foram obtidos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.

2.2.5. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular da HSA na presença dos complexos de rutênio foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco, modelo J 810, na região de 195 -260 nm, com velocidade de varredura de 100 nm/min. Foram empregadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm. As medidas de CD foram realizadas no

Laboratório do Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Cramos no Instituto de Química da Universidade de Campinas.

2.2.6. Difração de Raio-X

Os cristais foram obtidos por meio da evaporação lenta de uma mistura de acetonitrila e diclorometano. A medida de difração de raio-X foi realizada em um difratômetro Bruker, modelo APEX II Duo, com duas micro fontes de radiação de cobre e de molibdênio, em temperatura de 20°C. A estrutura foi resolvida no Instituto de Química de São Carlos, pelo Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon.

2.2.7. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram registrados em um sistema composto por um modulador, um potenciostato da Autolab modelo PG Stat 30 acoplado a um computador. Foi utilizada uma cela eletroquímica convencional composta por um arranjo de três eletrodos: um eletrodo de trabalho (disco de platina), um eletrodo auxiliar (fio de platina) e um eletrodo de referência (Ag/AgCl). Foi empregado como eletrólito suporte uma solução de hexafluorofosfato de tetrabutylamônio (TBAPF₆) 0,1 mol L⁻¹ em acetonitrila. A solução dos complexos foi preparada em concentração de 1.10⁻³ mol L⁻¹. O intervalo da janela de trabalho, assim como o início da varredura foram definidos de acordo com cada complexo. Os valores de E_{1/2} foram calculados por meio da relação $E_{pa} + E_{pc} / 2$.

2.2.8. Análise Elementar

A determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos complexos trinucleares de acetato de rutênio foi realizada, utilizando um analisador CHN modelo 2400 Séries ii da Perkin Elmer da Central Analítica do Instituto de Química da USP.

2.3. Métodos utilizados

2.3.1. Fotólises

As medidas da liberação fotoinduzida do monóxido de carbono foram realizadas utilizando concentração de complexo igual a 10^{-5} mol L⁻¹ em acetonitrila. Os espectros eletrônicos foram registrados em intervalos de 5 minutos, o tempo total de irradiação, com laser em 377 nm, de 80 minutos. O cálculo do rendimento quântico foi realizado utilizando actinometria química. Os equipamentos utilizados foram um laser de diodo marca Colibri da Quantum Tech, com quatro linhas de laser, a saber 377 nm, 447 nm, 532 nm e 660 nm e um espectrofotômetro Agilent 8453, com região de 190 a 1100 nm.

2.3.2. Actinometria

As amostras foram irradiadas utilizando um laser de diodo marca Colibri da Quantum Tech, com linha de laser em 377 nm. Nos experimentos para o cálculo do rendimento quântico foi utilizado o actinômetro $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$ para medir a intensidade da luz.¹⁵⁴ Foi utilizada uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico e 3 mL de volume. A intensidade da luz foi calculada por meio da seguinte relação:

$$I = \frac{n_{Fe}}{\Phi_{Fe} \times t \times (1-10^{-A})}$$

Φ_{Fe} = rendimento quântico de formação de Fe^{2+}

t = tempo de irradiação (5 minutos);

A = absorvância da solução controle no comprimento de onda da excitação;

n_{Fe} = número de íons de Fe^{2+} formados na solução do actinômetro. Este valor foi obtido por meio da seguinte equação:

$$n_{\text{Fe}} = \frac{6,02 \times 10^{23} \times A_{510} \times V_1 \times V_3}{V_2 \times 1 \times \epsilon}$$

A_{510} = absorvância da solução irradiada em 510 nm

V_1 = volume da solução irradiada (3 mL)

V_2 = volume da amostra (2 mL)

V_3 = volume final no qual a amostra foi diluída (1 mL)

l = caminho óptico da cubeta utilizada

ϵ = valor do coeficiente de absorvidade molar do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ em 510 nm ($1,11 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

O rendimento quântico envolvido na liberação fotoinduzida do monóxido de carbono foi calculado por meio da seguinte relação:

$$\Phi_{\text{CO}} = \frac{nL}{I \times t \times (1 - 10^{-A})}$$

nL = quantidade de monóxido de carbono liberado;

I = intensidade da luz incidente;

t = tempo de fotólise;

$1 - 10^{-A}$ = quantidade de luz absorvida pela amostra (A é o valor da absorvância da amostra no comprimento de onda da irradiação).

No experimento de actinometria química foi utilizada uma cubeta de quartzo com volume de 3 mL e caminho ótico de 1 cm. Nesta foram adicionados primeiramente 3 mL de uma solução de ferrioxalato de potássio $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, a qual foi irradiada por cinco minutos com laser no comprimento de onda de 377 nm. Em um balão volumétrico foram adicionados 2 mL desta solução irradiada, 2,5 mL de uma solução composta pela mistura de uma solução de acetato de sódio 1 mol L^{-1} e uma solução de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} e 1 mL de uma solução 1% (m/v) de 1,10-fenantrolina (phen). Em seguida o volume do balão foi completado para 10 mL com água destilada e esta amostra

permaneceu em repouso e abrigo da luz durante 1 hora.

Após o tempo em repouso, foram registrados espectros eletrônicos das amostras preparadas e observado o espectro característico do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, o qual apresenta uma banda intensa em aproximadamente 510 nm e valor de $\varepsilon = 1,11 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este complexo é formado quando o actinômetro é irradiado na faixa de 250-500 nm e neste meio é adicionado seletivamente a 1,10-fenantrolina, ocorrem as seguintes reações:

Desta forma é possível determinar espectrofotometricamente a quantidade de íons Fe^{2+} , pois ocorre a formação do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ de cor laranja. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3.3. Estudos de Interação com Albumina do Soro Humano (HSA)

Foi preparada uma solução de albumina do soro humano em solução tampão de Tris-HCl (pH = 7,2) na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente esta mesma solução foi diluída para obter concentração final de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Foram preparadas soluções dos complexos em estudo em acetonitrila na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Em uma cubeta contendo 3 mL da solução da proteína, foram adicionadas alíquotas da solução do complexo em estudo, em uma faixa de concentração inicial estequiométrica até o excesso do complexo. A porcentagem de co-solvente utilizado não ultrapassou 2%, sendo mantida a integridade da proteína.

Inicialmente foi registrado um espectro da albumina livre e em seguida foram registrados espectros das misturas de complexos e proteína em intervalos de cinco minutos. Este procedimento foi empregado nos experimentos de luminescência e de dicroísmo circular. Na aquisição dos espectros de emissão de fluorescência da proteína foi utilizado comprimento de onda de excitação de 280 nm, as leituras foram realizadas

na faixa entre 300 e 550 nm e os espectros de emissão foram obtidos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. As medidas da intensidade de fluorescência foram corrigidas de acordo com a seguinte equação:

$$F_{corrigida} = F_{Obs} e^{\frac{A_{emissão} + A_{excitação}}{2}}$$

Sendo F_{Obs} a intensidade de fluorescência medida experimentalmente, $A_{emissão}$ a absorvância no comprimento de onda do máximo de fluorescência e a $A_{excitação}$ é a absorvância para o comprimento de onda de excitação.

2.3.4. Estudos de Interação com o Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Foi preparada uma solução estoque de *ct*-DNA (calf thymus DNA ou DNA de timo de bezerro) pela adição de 5.0×10^{-3} g de *ct*-DNA à 5,0 mL de tampão Tris-HCl (pH = 7.2). Esta solução foi mantida sob agitação magnética por uma noite em temperatura controlada de 2-8 °C em uma câmara fria. A pureza do *ct*-DNA foi verificada por medidas de UV-vis através da razão das absorvâncias de 260 nm e 280 nm (A_{260nm}/A_{280nm}), a qual foi observada próximo ao valor descrito na literatura de 1,89, o que indicou que o DNA está livre de proteína. A partir desta razão encontrada, usando $\epsilon_{260nm} = 6600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ foi determinado espectrofotometricamente a concentração da solução estoque que apresentou ordem de grandeza de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os complexos, em concentração de $3,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, foram titulados com alíquotas da solução estoque de *ct*-DNA em uma faixa de concentração de 3,57 – 25,0 ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionadas alíquotas de 30 µL. A porcentagem de co-solvente acetonitrila/solução tampão Tris-HCl foi inferior a 2%.

2.3.5. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio frente à Linhagem Celular B16F10

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. No Laboratório de Química Bioinorgânica e Análítica com a colaboração da Dra. Lilian Pereira Franco e do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva.

A citotoxicidade dos complexos trinucleares foi avaliada contra duas linhagens celulares distintas B16F10 de melanoma murino e L929, de fibroblastos de murino como uma linha de células não tumorigênicas. Foram utilizados dois meios diferentes, para a linhagem L929 o meio DMEM e para B16F10 o meio RPMI, ambos enriquecidos com 3% de FBS (soro bovino fetal).

As células foram cultivadas e plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1.5×10^4 células / cm^2 . Diferentes concentrações dos compostos (5×10^{-6} a 50×10^{-6} mol L^{-1}) foram adicionadas às placas de ensaio, em seguida, incubadas durante 24 h na ausência de luz. As soluções foram obtidas por diluição da solução stock em acetonitrila (5×10^{-3} mol L^{-1}). A concentração final de acetonitrila foi mantida em 1,0%. A percentagem de viabilidade celular foi determinada após o período de incubação, utilizando o método colorimétrico, MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-ditetrazolium) absorvância foi registrada em 490 nm. Poços sem composto foram usados como o controle.

2.3.6. Avaliação da Atividade Tripanocida *in vitro* dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. No Laboratório de Parasitologia sob a colaboração da Dra. Zumira Aparecida Carneiro e do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque.

A atividade tripanocida dos complexos trinucleares foi realizada em cepas da forma amastigota (formas intracelulares) CL Brener, que expressam constitutivamente β -galactosidase derivado de *Escherichia Coli* de *T. Cruzi*. O ensaio foi realizado utilizando um kit Fluo Reporter lacZ / Galactosidase quantitativa. Resumidamente, as

células LLCMK₂ foram cultivadas em placas de 96 poços (10⁴ células / mL). Após 3 horas, adicionou-se as cepas CL Brener (10⁵ células / mL) e incubou-se durante mais 6 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS para remover os parasitas extracelulares e os compostos testados foram adicionados (500 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ - 0,48 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹ em diluição em série). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de CO₂ durante 72 horas. Posteriormente foram adicionados 10 µL de galactosidase (Kit Fluo Reporter lacz) e após 30 minutos a reação foi lida em um leitor de fluorescência. Os ensaios foram realizados em triplicata, e a viabilidade celular foi expressa como a percentagem dos valores de emissão de células tratadas em comparação com células não tratadas (controle). Determinou-se o IC₅₀ (concentração inibidora de 50% para as formas amastigotas). O benzonidazol foi utilizado como controle positivo e os meios de cultura como controle negativo.

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em células do baço isoladas a partir de ratos C57BL / 6, os baços foram macerados em meio RPMI 1640 e incubados durante 5 min com tampão de lise de glóbulos vermelhos (em 1:9 de 0,17 mol. L⁻¹ de Tris-HCl e cloreto de amônio 0,16 mol.L⁻¹). As células isoladas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min e ressuspensas em meio RPMI contendo 5% de soro fetal de bovino e antibióticos. As células de baço foram inoculadas em placas de 96 poços de fundo plano a 6,5x10⁶ / mL células por cavidade com concentrações diferentes dos compostos sintetizados, a 37 °C durante 24 h. Tween 20 a 1% foi utilizado como controle positivo (morte celular) e benzonidazol foi utilizado como um fármaco de referência. Após 24 horas as células foram incubadas com iodeto de propídio 10 x 10⁻⁶ g / mL. A análise dos dados foi realizada utilizando software FlowJo (Ashland, Oregon, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4 . Sínteses

2.4.1. Síntese do Cluster Mãe [Ru₃O(CH₃COO)₆(CH₃OH)₃]CH₃COO

Em um balão de 500 mL foram dissolvidos 5,00 g (6,04 mmol) de RuCl₃.nH₂O e 10,00 g (73,5 mmol) de Na(CH₃COO).3H₂O em uma mistura de 125 mL de etanol e 125 mL de ácido acético glacial. O meio reacional foi colocado sob refluxo por

4 horas à 80°C. A solução resultante permaneceu em repouso e sob refrigeração durante uma noite para a decantação do excesso de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. O resíduo sólido foi separado por filtração e a fração líquida foi rotaevaporada até a formação de um óleo, o qual foi ressuspenso em 100 mL de metanol e rotaevaporado até a secagem. Após repetir este procedimento por três vezes, foram adicionados 200 mL de acetona para a precipitação do complexo de cor verde, o qual foi isolado por filtração, lavado com éter etílico e seco até massa constante sob vácuo em dessecador contendo sílica gel. Este complexo foi purificado por meio de cromatografia de adsorção em coluna, foi utilizada alumina neutra com poros de 58 Å como fase estacionária e etanol como fase móvel. Foram obtidos 2,34 g do complexo. (MM = 828 g/mol).

2.4.2 . Síntese do Complexo Assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2(\text{CO})]$

Em um balão de 100 mL foram dissolvidos 0,80 g (1,05 mmol) do cluster precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ em 80 mL de metanol (previamente seco em peneira molecular). Esta solução foi mantida sob agitação constante e desaerada por 20 minutos com $\text{Ar}_{(\text{g})}$. Em seguida foi resfriada com um banho de gelo, protegida da luz e saturada durante 20 minutos com monóxido de carbono ($\text{CO}_{(\text{g})}$, gerado pelo gotejamento de ácido fórmico (HCOOH) sobre ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) acoplado ao sistema reacional). Sob agitação vigorosa, foram adicionadas ao sistema 6 pastilhas de amálgama de zinco recém preparadas. Após alguns minutos a cor mudou do verde original para o violeta. A solução resultante foi mantida sob fluxo de $\text{CO}_{(\text{g})}$, resfriamento e ao abrigo da luz durante 5 horas. Em seguida, o meio reacional foi rotaevaporado até secagem e o sólido obtido foi seco até massa constante sob vácuo em dessecador contendo sílica gel. A purificação deste composto foi realizada por meio de cromatografia de adsorção em coluna. Foi utilizada alumina neutra com poros de 58 Å como fase estacionária e metanol como fase móvel. Foram obtidos 0,54 g do complexo e $\eta = 68\%$ MM = 765 g/mol.

2.4.3 . Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(ampy)_2(CO)]$

Em um balão de duas bocas de 100 mL foram adicionadas 1,11 g (1,25 mmol) do cluster $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(CH_3OH)_2]$ e 0,39 g (4,15 mmol) de 4-aminopiridina em 90 mL de metanol, previamente seco em peneira molecular. A solução resultante foi desaerada por 1 hora com $Ar_{(g)}$ e mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente e agitação constante durante 6 horas. A cor do composto mudou do violeta original para o azul. Em seguida a solução foi rotaevaporada e seca até massa constante, sob vácuo em dessecador contendo sílica gel. Este complexo foi purificado por meio de cromatografia de adsorção em coluna, foi utilizada alumina neutra com poros de 58 Å como fase estacionária e uma mistura composta de 3:7 de acetonitrila e diclorometano como fase móvel. Foram obtidos 0,87 g do complexo e $\eta = 68\%$ MM = 889 g/mol. Os resultados de análise elementar são dados a seguir (os valores calculados são dados entre parênteses) % C: 30,9 (30,9); % H: 3,7 (3,4); % N: 6,1 (6,3).

2.4.4 . Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(dmap)_2(CO)].H_2O$

Em um balão de duas bocas de 100 mL foram adicionadas 1,08g (1,14 mmol) do cluster. $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(CH_3OH)_2]$ e 0,33 g (2,70 mmol) de 4-dimetilaminopiridina em 80 mL metanol, previamente seco em peneira molecular. A solução resultante foi desaerada por 1 hora com $Ar_{(g)}$ e mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente e agitação constante durante 6 horas. A cor do composto mudou do violeta original para o azul. O balão foi levado a banho de gelo, ocorreu precipitação e o sólido foi isolado por meio de filtração com bomba de vácuo. Foram obtidos 0,98 g do complexo e $\eta = 76\%$ MM = 945 g/mol. Os resultados de análise elementar são dados a seguir (os valores calculados são dados entre parênteses) % C: 33,5 (33,5); % H: 4,1 (4,2); % N: 5,7 (5,8).

2.4.5. Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(adpy)_2(CO)] \cdot CH_3OH$

Em um balão de duas bocas de 100 mL foram adicionadas 1,02 g (1,08 mmol) do cluster $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(CH_3OH)_2]$ e 0,31 g (2,54 mmol) de isonicotinamida em 80 mL metanol, previamente seco em peneira molecular. A solução resultante foi desaerada por 1 hora com $Ar_{(g)}$ e mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente e agitação constante durante 10 horas. A cor do composto mudou do violeta original para o azul. Em seguida a solução foi rotaevaporada até secagem e o sólido assim obtido foi seco até massa constante, sob vácuo em dessecador contendo sílica gel. Este complexo foi purificado por meio de cromatografia de adsorção em coluna. Foi utilizada como fase estacionária sílica com poros de 60 Å e uma mistura composta de 1:1 de acetonitrila e diclorometano como fase móvel. Foram obtidos 0,67 g do complexo e $\eta = 53\%$ MM = 945 g/mol. Os resultados de análise elementar são dados a seguir (os valores calculados são dados entre parênteses) % C: 32,1 (31,8); % H: 3,9 (3,5); % N: 5,7 (5,7).

2.4.6 . Síntese do Complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(dmpz)_2(CO)] \cdot C_2H_4Cl_2$

Em um balão de duas bocas de 100 mL foram adicionadas 1,01 g (1,10 mmol) do cluster $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(CO)]$ e 0,28 g (2,59 mmol) de 2,6-dimetilpirazina em 80 mL metanol, previamente seco em peneira molecular. A solução resultante foi desaerada por 1 hora com $Ar_{(g)}$ e mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente e agitação constante durante 6 horas. A cor do composto mudou do violeta original para o azul. Em seguida a solução foi rotaevaporada até secagem e o sólido assim obtido foi seco até massa constante, sob vácuo em dessecador contendo sílica gel.

Foram realizados diversos estudos em cromatografia de camada delgada (em placas de sílica e de alumina neutra) com o objetivo de obter a melhor fase móvel para a purificação deste composto, foram testadas várias proporções de diferentes solventes, incluindo acetonitrila, metanol, etanol, hexano, diclorometano e dicloreto. Contudo mesmo que aparentemente a coluna cromatográfica mostrava-se eficiente, após medidas

de voltametria cíclica e RMN o composto ainda apresentava-se impuro. Desta forma, foi necessária a busca por um novo método de purificação, utilizamos então a cromatografia em coluna de sílica seguida de cromatografia em placa preparativa, esta estratégia mostrou-se adequada para a purificação deste composto. Foram utilizadas placas de sílica com poros de 60 Å e mesh 230-400 como fase estacionária e uma mistura composta de 1:2:8 de metanol, acetonitrila e dicloroetano. Na etapa final de purificação realizada em placa preparativa de sílica foi utilizada também uma mistura de 2:8 de acetonitrila e diclorometano como fase móvel. Foram obtidos 0,47 g do complexo e $\eta=39\%$ MM = 917 g/mol. Os resultados de análise elementar são dados a seguir (os valores calculados são dados entre parênteses) % C: 31,6 (31,8); % H: 3,9 (3,8); % N: 5,8 (5,5).

Capítulo 3

3.0. Resultados e Discussão

As sínteses dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ foram realizadas segundo o procedimento descrito por Nikolaou, 2002⁶ e por Meyer e colaboradores¹⁵⁵ com algumas adaptações. As sínteses dos complexos precursores foram realizadas de acordo com o procedimento reportado na literatura.^{1,3,6} A rota sintética de obtenção dos complexos de interesse consiste em três etapas: A primeira envolve a síntese do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ denominado cluster mãe. Na segunda etapa o cluster mãe é reduzido com amálgama de zinco, e uma molécula de monóxido de carbono (CO) é coordenada ao centro metálico sob fluxo constante deste gás. Na terceira etapa é realizada uma reação de substituição do ligante, onde duas moléculas do solvente são substituídas por duas moléculas de ligantes N-heterocíclicos.

3.1. Sínteses e Purificação dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio de Fórmula Geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ onde (L= adpy, 4-ampy, dmap e dmpz)

A última etapa da obtenção dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L= adpy, ampy, dmap e dmpz) envolve uma reação de substituição de ligantes terminais, a qual é favorecida pela labilidade das moléculas de solvente coordenadas aos íons metálicos. Neste trabalho foram escolhidos ligantes terminais N-heterocíclicos de natureza π -receptora e σ -doadora (considerando como referência o pka da piridina), pois um dos interesses deste trabalho é investigar a influência da natureza π -receptora ou σ -doadora dos ligantes terminais sobre a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$.

No primeiro momento, as sínteses dos quatro compostos obtidos foram realizadas sob as mesmas condições experimentais, entretanto devido à presença de subprodutos indesejados foram necessárias algumas alterações na rota sintética proposta. Na primeira síntese dos complexos foi utilizado um excesso de ligante em estequiometria de 1:6 (complexo precursor/ligante) e o meio reacional foi mantido e agitação durante 24 horas ao abrigo da luz. Após a primeira hora de reação foi

observada a formação do composto de interesse, a cor do complexo mudou do violeta original para o azul, porém ao término da reação o composto desejado foi oxidado em contato com o ar e a sua cor passou de azul para verde. Assim, foi necessária a realização das primeiras adaptações nesta rota sintética, o tempo de reação foi reduzido para seis horas, à solução foi desaerada durante 1 hora com $\text{Ar}_{(\text{g})}$ e a estequiometria da reação foi ajustada para 1:3 a fim de obter menor quantidade de ligante livre em solução.

Diante das observações expostas acredita-se que o excesso de ligante utilizado nestas sínteses é responsável pela formação de clusters simétricos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$ sendo que a presença destes compostos indesejados foi observada por meio das técnicas de voltametria cíclica e RMN. Mesmo após a realização de adaptações na rota sintética dos complexos em estudo, foi observada ainda a presença de impurezas, tal fato evidenciou a necessidade de realizar ainda novas alterações nas sínteses, então a estequiometria das reações foi ajustada novamente, desta vez para 1:2 (complexo precursor/ligante) para três dos quatro compostos obtidos.

O tempo de reação foi alterado para 10 horas para apenas um dos complexos de interesse. Além disso, foi realizada a purificação dos complexos precursores. Estas novas adaptações favoreceram a precipitação de um dos compostos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$, entretanto foi necessária ainda uma etapa de purificação em coluna cromatográfica para os demais complexos de interesse. As adaptações realizadas nesta etapa do projeto são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Adaptações realizadas na rota sintética dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L= adpy, ampy, dmap e dmpz).

	Precursor/ligante	Precursor puro	Tempo de reação
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(4\text{ampy})_2]$	1:3	Não	6h
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$	1:2	Não	6h
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$	1:2	Sim	6h
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$	1:2	Sim	10h

A purificação dos compostos em estudo foi uma etapa imprescindível para o sucesso deste trabalho, mesmo após várias adaptações na rota sintética dos complexos de interesse, três dos quatros compostos não precipitaram, sendo necessários procedimentos de purificação para estes compostos e para os seus precursores.

Foram utilizadas as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e posteriormente cromatografia de adsorção em coluna. Para um dos compostos foi necessária ainda o uso de cromatografia em placa preparativa. A CCD foi utilizada inicialmente para obtenção das fases móveis que proporcionaram os melhores fatores de retardamento (R_f). Em seguida os compostos foram purificados por meio de colunas de adsorção utilizando diferentes proporções de solventes para cada composto, tais como diclorometano, dicloroetano, acetonitrila e metanol. Foram utilizadas como fases estacionárias alumina neutra com poros de 58 Å e sílica com poros de 60 Å e mesh 230-400.

3.2. Caracterização dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio de Fórmula Geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ onde ($\text{L} = \text{adpy}$, ampy , dmap e dmpz)

3.2.1. Difração de Raios-X

A difração de raios-X é uma poderosa ferramenta utilizada na elucidação estrutural dos complexos trinucleares de acetato de rutênio. Esta técnica importante tem fornecido valiosas informações sobre a estrutura desta classe de compostos.¹

Estudos cristalográficos realizados por Cotton e Norman, mostraram que em complexos trinucleares simétricos do tipo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$, a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ apresenta estrutura planar e geometria de um triângulo equilátero. Observou-se também que a distância entre os átomos de rutênio não varia com o estado de oxidação do metal, evidenciando a deslocalização eletrônica presente na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$.^{1,6}

No caso de complexos onde um dos ligantes é o monóxido de carbono ou isocianeto a estrutura da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ é descrita por um triângulo isósceles.^{1,156-158}

O cristal do composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ foi obtido por meio de evaporação lenta do solvente (acetonitrila e diclorometano) em temperatura ambiente. A estrutura ORTEP do complexo é apresentada na Figura 14, os dados cristalográficos referentes ao refinamento da estrutura do complexo são reunidos na Tabela 2 e os valores dos principais ângulos de ligação e as distâncias atômicas são apresentados na Tabela 3.

Figura 14: Estrutura cristalográfica do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ mostrando a numeração dos átomos e as elipsóides de 50% de probabilidade.

Tabela 2: Dados do refinamento da estrutura do complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(ampy)₂].

[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CO)(ampy) ₂]	
Fórmula empírica	C ₂₃ H ₃₀ N ₄ O ₁₄ Ru ₃
Peso molecular	889.72
Temperatura	23°C
Comprimento de Onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	Pnma
Dimensões da cela unitária	a = 19.2404(4) Å α = 90°.
	b = 19.8237(4) Å β = 90°.
	c = 8.2389(2) Å γ = 90°.
Volume	3142.45(12) Å ³
Z	4
Densidade calculada	1.881 Mg/m ³
Coefficiente de absorção	1.494 mm ⁻¹
F(000)	1760
Tamanho do cristal	0.14 x 0.06 x 0.03 mm ³
Intervalo de teta para a coleta de dados	2.35 para 25.05°.
Intervalos de índices	-16 ≤ h ≤ 22, -16 ≤ k ≤ 23, -7 ≤ l ≤ 5
Reflexões coletadas	5964
Reflexões independentes	2221 [R(int) = 0.0425]
Integralidade de teta ACTA 50°	ACTA 50 %
Correção de absorção	Semi-empírica de equivalentes
Transmissão máx e mín	0.7452 e 0.6797
Método de refinamento	Matriz completa de mínimos quadrados em F ²
Dados/ restrições/ parâmetros	2221 / 4 / 227
Goodness-of-fit on F ²	1.025
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0316, wR2 = 0.0644
Índices R	R1 = 0.0490, wR2 = 0.0724
Máx e min residual	0.680 e- 0.368 e.Å ⁻³

Tabela 3: Distâncias atômicas (Å) e principais ângulos de ligação (°)

Ru(1)-C(9)	1,812 (8)	C(9)-Ru(1)-O(8)	179,6 (3)	O(4)#1-Ru(2)O(7)	170,67 (15)
Ru(1)-O(8)	2,058 (4)	C(9)-Ru(1)-O(1)	87,0 (2)	O(5)-Ru(2)-O(7)	88,78 (19)
Ru(1)-O(1)	2,067 (4)	O(8)-Ru(1)-O(1)	92,72 (15)	O(8)-Ru(2)-O(2)	96,17 (15)
Ru(1)-O(1)#1	2,067 (4)	C(9)-Ru(1)-O(1)#1	87,0 (2)	O(4)#1-Ru(2)O(2)	92,34 (19)
Ru(1)-O(3)	2,068 (4)	O(8)-Ru(1)-O(1)#1	92,72 (15)	O(5)-Ru(2)-O(2)	168,56 (15)
Ru(1)-O(3)#1	2,068 (4)	O(1)-Ru(1)-O(1)#1	86,0 (3)	O(7)-Ru(2)-O(2)	88,94 (18)
Ru(2)-O(8)	1,901 (2)	C(9)-Ru(1)-O(3)	89,0 (2)	O(8)-Ru(2)-N(1)	179,3 (2)
Ru(2)-O(4)#1	2,029 (5)	O(8)-Ru(1)-O(3)	91,29 (14)	O(4)#1-Ru(2)N(1)	84,71 (17)
Ru(2)-O(5)	2,040 (3)	O(1)-Ru(1)-O(3)	175,83 (14)	O(5)-Ru(2)-N(1)	84,69 (14)
Ru(2)-O(7)	2,040 (5)	O(1)#1-Ru(1)-O(3)	92,62 (18)	O(7)-Ru(2)-N(1)	86,23 (16)
Ru(2)-O(2)	2,042 (3)	C(9)-Ru(1)-O(3)#1	89,0 (3)	O(2)-Ru(2)-N(1)	83,98 (15)
Ru(2)-N(1)	2,128 (4)	O(8)-Ru(1)-O(3)#1	91,29(14)	C(1)-O(1)-Ru(1)	132,6 (3)
O(8)-Ru(2)#1	1,901 (2)	O(1)-Ru(1)-O(3)#1	92,62 (18)	C(1)-O(2)-Ru(2)	133,7 (4)
O(4)-Ru(2)#1	2,029 (5)	O(1)#1-Ru(1)-O(3)#1	175,83 (1)	Ru(2)-O(8)Ru(2)#1	121,5 (2)
C(7)-O(7)- Ru(2)	133,0 (6)	O(3)-Ru(1)-O(3)#1	88,4 (3)	Ru(2)-O(8)-Ru(1)	119,21 (12)
C(10)-N(1)- Ru(2)	122,1 (3)	O(8)-Ru(2)-O(4)#1	94,57 (18)	Ru(2)#1-O(8)Ru(1)	119,21(12)
C(14)-N(1)- Ru(2)	121,7 (3)	O(8)-Ru(2)-O(5)	95,18 (15)	C(5)-O(5)-Ru(2)	132,5(4)
O(6)-C(9)- Ru(1)	179,4 (9)	O(4)#1-Ru(2)-O(5)	88,14 (18)	C(3)-O(4)Ru(2)#1	132,0(4)
		O(8)-Ru(2)-O(7)	94,49 (18)	C(3)-O(3)-Ru(1)	134,3(4)

O complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ neutro apresenta valência localizada sobre o íon rutênio ligado ao CO, com estado formal de oxidação $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO})]$. Observa-se na Tabela 3 que os ângulos de ligação presentes na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são $\text{Ru}(2)\text{—O}(8)\text{—Ru}(2)\#1$ ($121,5^\circ$) e $\text{Ru}(2)\text{—O}(8)\text{—Ru}(1)$, $\text{Ru}(2)\#1\text{—O}(8)\text{—}(1)$ ambos de $119,21^\circ$. O comprimento das ligações $\text{Ru}(2)\text{—O}(8)$ e $\text{Ru}(2)\#1\text{—O}(8)$ ($1,901 \text{ \AA}$) é menor que o comprimento de ligação $\text{Ru}(1)\text{—O}(8)$ ($2,058 \text{ \AA}$). Estas características estruturais são observadas devido as diferentes interações entre os íons de rutênio e o átomo de oxigênio central, o ligante CO esta coordenado ao átomo de $\text{Ru}(1)$ assim a maior distância encontrada para $\text{Ru}(1)\text{—O}(8)$ é atribuída ao efeito trans exercido por este ligante π -receptor, como consequência a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ apresenta geometria aproximada de um triângulo isóceles, conforme descrito na literatura.^{15,156} (Figura 15)

Figura 15: Provável geometria da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ no complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$

As distâncias de ligação $\text{Ru}\text{—O}$ (acetato) (Tabela 3) estão em concordância com a literatura.¹⁵ A distância de ligação $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO}$ $\text{Ru}(1)\text{—C}(9)$ ($1,812 \text{ \AA}$) é menor que a distância de ligação entre os átomos de $\text{Ru}^{\text{III}}\text{-N-ampy}$ $\text{Ru}(2)\text{—N}(1)$ ($2,042 \text{ \AA}$), esse comportamento é justificado pela retrodoação envolvida na interação entre o átomo de rutênio (Ru^{II}) e o ligante CO .¹⁵ A Tabela 4 apresenta os valores encontrados para as distâncias de ligação entre Ru^{II} e a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e entre os íons de Ru^{III} e a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ e de

outros complexos análogos reportados na literatura.¹⁵

Tabela 4: Comparação estrutural dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$

Complexos	Átomo em L	Distância de ligação (Å)	
		$\text{Ru}^{\text{II}}-\mu_3\text{O}$	$\text{Ru}^{\text{III}}-\mu_3\text{O}$
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$	N	2,058 (4)	1,901 (2)
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{mbpy}^+)_2](\text{ClO}_4)\text{DMF}^*$	N	2,039 (11)	1,885 (8)
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{abco})_2]2\text{CH}_2\text{Cl}_2^*$	N	2,065 (3)	1,888 (3)
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{THF})_2]^*$	O	2,067 (7)	1,885 (8)

*Dados da literatura referência 156.

Observa-se na Tabela 4 que os valores da distância de ligação entre os íons de Ru^{II} e Ru^{III} e a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ obtidos para o complexo em estudo são bastante próximos aos valores reportados na literatura para os compostos análogos.

O composto apresenta sistema cristalino ortorrômbico, sua cela unitária é definida por três eixos binários perpendiculares e /ou planos de reflexão (a; b; c) com dimensões de $a = 19.2404(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $b = 19.8237(4) \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$. e $c = 8.2389(2) \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$, ocupando um volume de $3142.45(12) \text{ \AA}^3$, conforme mostrado na Figura 16.

Figura 16: Cella unitária do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$

Na Figura 16 observa-se a cela unitária do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, nota-se que quatro moléculas do complexo encontram-se no interior da cela unitária e que estas são unidas por meio de ligações de hidrogênio formadas entre os átomos de hidrogênio do grupo amida presentes no ligante terminal ampy e átomos de oxigênio das pontes carboxilato, átomo de oxigênio da molécula de monóxido de carbono também participa destas ligações.

3.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma valiosa ferramenta utilizada na determinação estrutural dos complexos trinucleares de acetato de rutênio. A literatura reporta diversos dados para todos os tipos de complexos desta classe, sendo simétricos, assimétricos, mistos e de valência mista. Na ausência de dados de difração de raios-X, espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e de correlação tais como COSY, HMQC e HMBC, permitem determinar com segurança a estrutura de complexos trinucleares simétricos e assimétricos.^{1,6}

Os sinais dos ligantes coordenados a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são sensíveis ao estado de oxidação dos íons de rutênio.² Os complexos trinucleares simétricos do tipo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^{1+}$ apresentam estado de oxidação formal $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$ e são paramagnéticos, seus espectros de ^1H e ^{13}C apresentam um padrão bastante característico, com sinais dos ligantes coordenados deslocados em relação aos dos ligantes livres, devido à anisotropia paramagnética. Desta forma, é possível realizar a identificação precisa destes compostos. Enquanto no caso dos complexos assimétricos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$, os sinais dos ligantes coordenados são encontrados em valores próximos aos dos ligantes livres, pois estes derivados de rutênio são diamagnéticos, apresentam estado de oxidação formal $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}$.^{2,6}

A atribuição dos sinais de ^1H RMN observados para os complexos em estudo foi realizada por meio de comparação com os deslocamentos químicos dos ligantes livres e de complexos análogos reportados na literatura. As figuras 17-24 apresentam os espectros de ^1H RMN e de COSY obtidos para os complexos em estudo. As atribuições são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Deslocamentos químicos δ de ^1H (ppm) dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$
L= ampy, adpy, dmap e dmpz em acetonitrila deuterada.

	CH ₃ Ac (a)	CH ₃ Ac (b)	H _{α}	H _{β}	H _{γ}
Acetato livre	2,10	2,10	*	*	*
ampy livre	*	*	8,44	6,64	5,85
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$	2,11	1,58	8,94	7,29	5,69
adpy livre	*	*	8,77	7,96	7,85
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$	2,01	1,80	9,20	8,44	*
dmap livre	*	*	8,15	6,64	2,27
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$	2,08	1,63	9,02	7,29	3,28
dmpz livre	*	*	8,32	2,35	*
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$	2,02	1,84	8,53	2,63	*

Observa-se na Tabela 5, que os sinais obtidos para os complexos em estudo, não sofreram grandes deslocamentos em relação aos ligantes livres, esse comportamento era esperado, pois os compostos em estudo são diamagnéticos.⁶ Para todos os compostos da série, observa-se que os sinais referentes aos ligantes N-heterocíclicos (H_{orto}, H_{meta} e H_{para}) apresentam um deslocamento para frequências mais altas em relação ao ligante livre, devido a remoção de densidade eletrônica pela unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Estes valores encontrados estão em concordância com os valores reportados na literatura, no caso dos complexos simétricos ocorre o oposto devido à anisotropia paramagnética.¹

Os sinais referentes aos hidrogênios H das pontes acetato (b) apresentam um deslocamento para frequências mais baixas em relação ao ligante livre. Este efeito de blindagem ocorre devido a combinação de efeitos indutivos de centro metálico e do

efeito dos substituintes do anel do N-heterocíclico.¹⁵⁹

Figura 17: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 18: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 19: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 20: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 21: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 22: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 23: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Figura 24: Espectro de COSY do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ obtido a partir da solução de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila deuterada.

Nos espectros de ^1H RMN dos complexos em estudo (Figuras 17, 19, 21 e 23), observa-se a presença de dois sinais referentes aos grupos metila do acetato, os quais são característicos de complexos trinucleares assimétricos. Esse comportamento reflete a diferença de ambiente químico que os grupos metila estão inseridos. Um dos sinais (CH_3 Ac (a)) apresenta valor de integral igual a 12, este sinal é atribuído aos grupos metila presente entre o ligante N-heterocíclico e o CO, enquanto o sinal (CH_3 Ac (b)) tem valor de integração igual a 6, é atribuído as metilas que se localizam entre dois ligantes N-heterocíclicos. A figura 17 apresenta o espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, são observados, em região de compostos aromáticos, dois dupletos em 8,96 ppm (H_α) e 7,29 ppm (H_β) atribuídos aos hidrogênios presentes no anel piridínico e um singlete deslocado para 5,69 ppm (H_γ), o qual é atribuído aos hidrogênios do grupo substituinte do anel da piridina. No espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ (Figura 19) observa-se a presença de dois dupletos em 9,20 ppm (H_α) e 8,44 ppm (H_β) referentes aos hidrogênios presentes no anel piridínico.

Na Figura 21 é apresentado o espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$, são observados dois dupletos um em 9,02 ppm (H_α) e outro em 7,29 ppm (H_β) atribuídos aos hidrogênios do anel da piridínico e um singlete deslocado para baixa frequência em 3,28 ppm (H_γ) referente aos hidrogênios dos grupos metila substituintes do anel piridínico, estes átomos de hidrogênios são mais blindados em relação aos hidrogênio presentes no anel aromático, assim são observados em região de menor frequência.

Finalmente no espectro de ^1H RMN referente ao complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ (Figura 23), são observados dois singletos em regiões distintas um em 8,53 ppm (H_α) e outro em 2,68 ppm (H_β) atribuídos aos hidrogênios do anel pirazínico e aos hidrogênios dos grupos metila substituintes do anel respectivamente. A grande diferença nos sinais observados para os hidrogênios deste ligante reflete os distintos ambientes químicos onde estes átomos estão inseridos.

Um dos objetivos deste projeto é investigar a influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais N-heterocíclicos sobre a densidade eletrônica na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Nesta investigação foram utilizados como parâmetro de propriedade dos ligantes terminais N-heterocíclicos seus valores de pK_a .¹⁶⁰ Embora valores de pK_a

não sejam uma medida direta da capacidade doadora ou receptora de densidade eletrônica de um ligante, normalmente valores altos de pKa sinalizam para o fato de que o par de elétrons livres do heteroatomo está disponível para interagir com um centro metálico, estando menos comprometido com o sistema de conjugação π do anel aromático. O contrário é verdadeiro: quando esse par de elétrons está mais comprometido com o sistema de conjugação π do anel, está menos disponível para ser doado em uma interação com o centro metálico. O sistema de conjugação π , por sua vez, será sensível aos grupos substituintes doadores ou retiradores de densidade de carga introduzidos no anel do ligante aromático. Para o melhor entendimento das correlações que serão reportadas, além dos dados obtidos neste trabalho para os quatro complexos onde L = ampy, adpy, dmap e dmpz, foram utilizados também dados referentes a outros quatro complexos análogos, sendo um destes reportado na literatura¹⁶¹ e os demais sintetizados recentemente pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dra. Sofia Nikolaou.^{127,162} A série completa de complexos utilizada no estudo das correlações apresentadas neste trabalho é apresentada na Figura 25.

Figura 25: Estruturas da série de complexos utilizada no estudo das correlações (1) 2,6-dimetilpirazina, (2) isonicotinamida, (3) 4-acetilpiridina¹⁶², (4) 3-metilpiridina¹²⁷, (5) 4-metilpiridina¹⁶¹, (6) 4-terc-butilpiridina¹⁶², (7) 4-dimetil(amino)piridina e (8) 4-aminopiridina.

Os sinais de prótons dos grupos metilas das pontes acetato são considerados excelentes sondas de investigação da densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ (localização / deslocalização) em complexos trinucleares assimétricos e simétricos. Na elaboração do diagrama qualitativo de orbitais moleculares (proposto primeiramente por Cotton,¹⁶³ depois explorado por Meyer¹⁵⁵ e que será explorado no item 3.2.3) as interações de orbitais provenientes das pontes acetato foram negligenciadas por terem sido consideradas muito fracas. Entretanto, os orbitais dos grupos acetato têm simetria adequada para interagir com os orbitais de natureza metálica $d(x^2-y^2)$, d_{x^2z} e d_{y^2z} . Destes, os orbitais d_{x^2z} e d_{y^2z} dão origem aos orbitais moleculares a_2'' e e'' ; e e' e a_2' respectivamente. Estes dois conjuntos de orbitais moleculares, por sua vez, tem simetria adequada para interagir com o sistema π dos ligantes terminais piridínicos em ambas as orientações (paralela ou perpendicular ao plano da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$), proporcionando um percurso para os acetatos sentirem os efeitos de densidade eletrônica dos ligantes terminais. Além disso, o orbital d_{y^2z} do Ru(II) que interage com o ligante CO, também é capaz de transmitir as variações de densidade eletrônica aos grupos acetato.

Alexiou & Toma¹⁵⁹ mostraram que a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ se comporta como um único centro metálico apresentando uma forte deslocalização eletrônica, uma vez que os valores de deslocamento químico (δ) observados para os sinais das metilas dos grupos acetato seguiu uma tendência ditada por uma influência *trans* nos complexos trinucleares. Considerando essa influência *trans*, deve-se esperar que os valores de deslocamento químico para CH_3 (a), (acetato de "*trans*" para um ligante L) sejam menores que os valores de deslocamento observados para CH_3 (b) (acetato de "*trans*" para o ligante CO), ou seja, o grupo metila em *trans* a um ligante N-heterocíclico deve ser mais blindado do que o grupo metila que esta em *trans* ao ligante CO. No entanto, o oposto é observado na Tabela 6 e na Figura 26. Esta constatação nos leva à necessidade de idealizar um novo modelo explicativo para os deslocamentos observados, que contraponha o comportamento dos clusters deslocalizados simétricos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$ com os clusters $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$.

Tabela 6: Deslocamentos químicos δ de ^1H (ppm) dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$
L= ampy, adpy, dmap, dmpz, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic em acetonitrila deuterada.

	dmpz	adpy	acpy ^a	3-pic ^b	4-pic ^c	tbpy ^a	dmap	ampy
$\text{CH}_3\text{Ac(a)}^b$	2,02; 12H	2,01; 12H	2,00; 12H	1,94; 12H	2,06; 12H	1,96; 12H	2,08; 12H	2,11; 12H
$\text{CH}_3\text{Ac(b)}$	1,84; 6H	1,80; 6H	1,81; 6H	1,74; 6H	1,79; 6H	1,74; 6H	1,63; 6H	1,58; 6H
H_{ortho}^c	8,53; 2H	9,20; 2H	9,18; 2H	9,03; 1H	8,98; 2H	9,15; 2H	9,02; 2H	8,94; 2H
$\text{H}_{ortho'}$				9,01; 1H				
H_{metha}		8,44; 2H	8,46; 2H	8,03; 1H	7,83; 2H	8,19; 2H	7,29; 2H	7,29; 2H
H_{para}				8,19				
$\text{CH}_3 \text{L}^d$	2,63; 6H		2,85; 3H	2,67; 3H	2,85; 3H	1,62; 9H	3,28; 6H	
$\text{NH}_2 \text{L}^e$		n.o.						5,69
Valores de pKa dos Ligantes N-heterocíclicos.								
	2,26	3,59	3,60	5,05	5,98	6,14	9,20	9,39

^aDados retirados das referências ^a162 ^b127 e ^c163.

O complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$ é considerado um bom modelo para investigar o efeito indutivo proveniente da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, pois não possui ligantes N-heterocíclicos em sua estrutura. Para esta espécie, o sinal do acetato CH_3 (b) coordenado a dois íons Ru (III) ("trans" ao ligante CO) é observado em 7,68 ppm, enquanto que o sinal do acetato CH_3 (a) coordenado a um íon de Ru (III) e em um íon de Ru (II) (acetato de "trans" ligante N-heterocíclico) é observado em 7,49 ppm.¹⁶³ Os íon Ru (III), mais ácidos, removem a densidade eletrônica das pontes acetato CH_3 (b) causando maior desblindagem para os grupos metila CH_3 (b) que para as metilas CH_3 (a).

Figura 26: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios das metilas das pontes acetato dos complexos em estudo e de outros sintetizados pelo grupo vs os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos (ampy, adpy, dmpz, dmap, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic).

A Figura 26 mostra a dependência dos sinais de deslocamento químico das metilas das pontes acetato em função da variação do pKa dos ligantes N-heterocíclicos. Estas tendências refletem a influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais. Na estrutura dos complexos trinucleares monocarbonil, as metilas CH₃ (b) são ligadas diretamente aos íons de Ru(III), cuja densidade eletrônica é modulada por meio da capacidade σ -doadora ou π -receptora dos ligantes N-heterocíclicos. Ligantes σ -doadores são responsáveis por um aumento da densidade eletrônica na unidade [Ru₃O] por consequência as metilas CH₃ (b) são blindadas sendo observada uma diminuição nos deslocamentos químicos destas metilas. O oposto é observado no caso dos ligantes terminais de natureza π -receptora, a retirada de elétrons do centro metálico causada por estes ligantes é responsável pela desblindagem das metilas CH₃ (b), assim os valores de deslocamento químico são observados em maiores frequências. Para justificar estas observações, admitimos também a contribuição de interações π entre a unidade [Ru₃O]⁰ e os ligantes N-heterocíclicos.

Na Figura 26 observa-se também a correlação entre os valores de pKa dos

ligantes terminais e os valores de deslocamento químicos para as metilas CH₃ (a), as quais são ligadas a íons de rutênio (II) e (III). Devido a este ambiente químico distinto das metilas CH₃ (b), observa-se uma tendência diferente para as metilas CH₃(a), estas são menos blindadas com o aumento dos valores de pKa dos ligantes. Esta tendência reforça a descrição de valência localizada para os complexos monocarbonil, fato observado neste trabalho e na literatura.¹⁶⁴ A ligação do íon de Ru(II) com o ligante π -receptor CO envolve retrodoação, a qual é fortalecida pela doação de densidade eletrônica proveniente de ligantes terminais de natureza σ -doadora. Este fortalecimento da retrodoação diminui a densidade eletrônica sobre o íon de Ru(II) e torna as metilas CH₃ (a) mais desblindadas, e por consequência os valores de deslocamentos químicos para estas metilas são maiores. Assim ao longo da série de ligantes, os grupos CH₃ (a) tornam-se menos blindados com o aumento dos valores de pKa dos ligantes terminais. No caso dos ligantes π -receptores a retirada de elétrons é responsável pelo enfraquecimento da retrodoação, que causa um aumento na densidade eletrônica do íon de Ru(II) e assim as metilas CH₃ (a) são mais blindadas.

Desta forma, o aumento dos valores de pKa dos ligantes terminais é responsável pelo efeito de blindagem das metilas CH₃ (b), como esperado, pois as pontes acetato são ligadas a dois íons de rutênio (III). Enquanto que no caso das metilas CH₃ (b) é observado o oposto, sendo evidenciado que apesar da valência localizada, a densidade eletrônica no íon de Ru(II) é sensível aos efeitos dos outros átomos de Ru e ao átomo de oxigênio central que compõe a unidade [Ru₃O].

3.2.3. Espectroscopia Eletrônica

A estrutura dos complexos trinucleares de acetato de rutênio apresenta três íons de rutênio organizados em um arranjo trigonal e mantidos por seis pontes laterais carboxilato (μ -CH₃CO₂) e uma ponte central com um átomo de oxigênio (μ_3 -oxo).^{1,2,6,8} As fortes interações eletrônicas existentes entre os três íons de rutênio promovidas em maior intensidade pelas pontes com oxigênio e em menor extensão pelas pontes com carboxilatos são responsáveis pelas notáveis propriedades espectroscópicas e eletroquímicas destes compostos. Estas propriedades têm sido explicadas qualitativamente por meio do diagrama de orbitais moleculares desenvolvido por Cotton.⁶

Neste diagrama, construído para a unidade [Ru₃O], são consideradas as seguintes interações: as interações provenientes da combinação de orbitais dos átomos de rutênio com o orbital π p_z do átomo de oxigênio hibridizado em sp² (Ru-O-Ru), as interações metal-metal (Ru-Ru) e as interações entre a unidade [Ru₃O] e ligantes terminais (piridínicos).⁶

Figura 27: Sistemas de coordenadas usadas na construção do diagrama de orbitais moleculares da unidade [Ru₃O]⁶

σ_{xy} (plano da unidade [Ru₃O]) x', y' e z' são coordenadas locais

A combinação entre o orbital p_z do átomo de oxigênio e os orbitais d_{zy} de cada átomo de rutênio (Esquema 1) (em simetria D_{3h}, característica de clusters simétricos, L₁=L₂=L₃) resulta na formação de quatro orbitais moleculares: dois orbitais a''₂ (sendo um ligante com caráter de oxigênio e outro antiligante de caráter metálico) e dois orbitais não ligantes e'' degenerados.⁶

Esquema 1: Combinação entre o orbital p_z do átomo de oxigênio e os orbitais d_{zy} de cada átomo de rutênio⁶

As interações metal-metal envolvem a mistura dos orbitais atômicos d_{xz} - d_{xz} e $d_{x^2-y^2}$ - $d_{x^2-y^2}$ (Esquema 2) no plano da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e perpendicular a ele, respectivamente. As interações entre os orbitais d_{xz} de cada átomo de rutênio resultam na formação de um orbital antiligante a'_2 e mais dois orbitais ligantes e' degenerados, enquanto que a interação entre os orbitais atômicos $d_{x^2-y^2}$ resulta em três orbitais moleculares: dois orbitais desgenerados e' e um orbital antiligante a'_1 .⁶

Esquema 2: Interações metal-metal envolvem a mistura dos orbitais atômicos d_{xz} - d_{xz}

Os orbitais atômicos quadráticos dos átomos de rutênio apresentam simetria adequada para interagir também com os orbitais atômicos do átomo de oxigênio presente nas pontes carboxilato, porém esta interação não foi considerada por Cotton na

construção deste diagrama, pois são fracas quando comparadas as outras interações reportadas acima.⁶

Esquema 3: Interações metal-metal envolvem a mistura dos orbitais atômicos $d_{x^2-y^2}$ - $d_{x^2-y^2}$

Quanto à interação entre a unidade $[Ru_3O]$ e ligantes terminais, como a piridina, sabe-se que esta apresenta orbitais atômicos π e π^* de simetria e energia apropriadas para interagirem com os orbitais atômicos d_π dos centros metálicos. Esta interação tem a seguinte contribuição: a''_2 e e'' (quando o anel piridínico encontra-se paralelo ao plano da unidade $[Ru_3O]$) e a'_2 ou e' (quando o anel encontra-se perpendicular ao plano da unidade $[Ru_3O]$), pois este ligante apresenta rotação livre.⁶

Este diagrama de orbitais moleculares foi construído para complexos simétricos ($L_1=L_2=L_3$), entretanto foi adaptado para complexos trinucleares assimétricos ($L_1 \neq L_2=L_3$). Nesta condição ocorre um abaixamento de simetria ($D_{3h} \rightarrow C_{2v}$) e um desdobramento dos níveis e'' e e' , gerando os orbitais a_2+b_1 e a_1+b_2 .⁶

De acordo com o diagrama de orbitais moleculares da unidade $[Ru_3O]$, no espectro eletrônico de clusters simétricos a transição eletrônica $e'' \rightarrow a''_2$ é atribuída a transições internas da unidade $[Ru_3O]$, esta transição e a outra $a'_1 \rightarrow a''_2$ são permitidas para a simetria D_{3h} . A transição $e' \rightarrow a''_2$ é proibida para simetria D_{3h} , porém é permitida para a simetria C_{2v} .⁶

A transição eletrônica $a''_2 \rightarrow a'_2$ é proibida para as duas simetrias C_{2v} e D_{3h} , enquanto a transição $e'' \rightarrow \pi^*$ é permitida para as duas simetrias sendo atribuída como a transição de transferência de carga cluster ligante (TCCL), esta transição envolve a combinação dos orbitais d_{yz} dos átomos de rutênio com os orbitais π^* do ligante terminal, esta transição é atribuída à uma banda bastante intensa no espectro eletrônico

destes compostos. Os espectros eletrônicos dos clusters simétricos e assimétricos contendo ligantes piridínicos foram atribuídos de acordo com dados espectrais e com as transições eletrônicas observadas neste diagrama de orbitais moleculares (Figura 28).⁶

Figura 28: Diagrama qualitativo de orbitais moleculares de clusters de acetato de rutênio (a) clusters simétricos e (b) adaptado para clusters assimétricos.⁶

Os complexos trinucleares assimétricos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ (onde L= N-heterocíclicos) são diamagnéticos, neutros, os íons de rutênio apresentam estado de oxidação formal $\text{Ru}^{\text{III}} \text{Ru}^{\text{III}} \text{Ru}^{\text{II}}$ e a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ apresenta configuração eletrônica $(a_1)^2, (a_2)^2, (b_1)^2, (a_1)^2, (b_2)^2, (a_1)^2, (b_2)^2$ e $(a_1)^2$.¹⁶⁵

O espectro eletrônico dos clusters assimétricos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ apresentam uma banda larga com o máximo de absorção ao redor de 600 nm, atribuída às transições internas da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, denominada transição intra-cluster (IC) e outras duas bandas bem definidas, uma ao redor de 400 nm atribuída à transições de transferência de carga cluster $\rightarrow$ ligante (TCCL) e outra na região entre 290-230 nm atribuída à transições internas do ligante $\pi \rightarrow \pi^*$.⁶

Na figura 29 são mostrados os espectros eletrônicos referentes aos clusters

$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ ($\text{L}=\text{adpy}, \text{ampy}, \text{dmap}$ e dmpz). Observa-se para todos os compostos, a presença de uma banda larga entre 585-590 nm, a qual é atribuída à transição IC, de uma banda na região 351-394 nm atribuída a TCCL e de bandas entre 316-242 nm, as quais são atribuídas às transições internas do ligante. Para toda a série os valores encontrados são compatíveis com os valores reportados na literatura.^{155,156}

Figura 29: Espectros eletrônicos dos complexos em solução de acetonitrila (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{adpy})_2(\text{CO})]$, (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]$, (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$.

Os valores do coeficiente de absorvidade molar (ϵ), do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) e do $\log \epsilon$ obtidos para os complexos em estudo e de complexos análogos são apresentados na Tabela 7. Observa-se que os valores encontrados estão em concordância com os valores de complexos análogos da literatura.^{155,156}

Tabela 7: Valores de ϵ e λ_{max} dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ ($\text{L}=\text{adpy}$, ampy , dmap e dmpz) e de complexos análogos reportados na literatura.

	$\epsilon / \text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$		
	$\lambda_{\text{max}}(\text{IC})/\epsilon /$ $\log \epsilon$	$\lambda_{\text{max}}(\text{TCCL}) \epsilon /$ $\log \epsilon$	$\lambda_{\text{max}}(\pi-\pi^*)/\epsilon /$ $\log \epsilon$
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]^{\text{a}}$	587 (3250) 3,51	327 (5640) 3,75	
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{CO})]^{\text{b}}$	585 (4910) 3,69	337(6600) 3,82	
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{cnpy})_2(\text{CO})]^{\text{b}}$	590 (5610) 3,75	418 (7620) 3,88	265 (15000) 4,18
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$	589 (6753) 3,83	394 (7657) 3,88	263 (39989) 4,60
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{adpy})_2(\text{CO})]$	590 (5338) 3,73	406 (6963) 3,84	261 (21024) 4,32
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]$	591 (4684) 3,67	386 (7288) 3,86	264 (14107) 4,15
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$	585 (3845) 3,59	351 (8778) 3,94	242 (33090) 4,52

Dados retirados das referências ^a 127, ^b48.

Complexos trinucleares com carga formal zero apresentam banda IC ao redor de 900 nm, nos compostos em estudo esta banda é observada na região entre 585-590 nm, ocorre um considerável deslocamento hipsocrômico, o qual é atribuído ao efeito da retrodoação envolvida na ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CO}$. Esta interação estabiliza os níveis $d\pi$ e torna a unidade deficiente em elétrons (Figura 30).⁶

Figura 30: Espectros eletrônicos dos complexos com carga formal zero $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})(\text{dmpz})_2]$ $\text{L}=\text{CO}$ e CH_3OH

De acordo com a literatura, em complexos trinucleares de acetato de rutênio com simetria D_{3h} ou C_{2v} a combinação formada entre os orbitais $d\pi$ dos átomos de rutênio e de um orbital p_z do oxigênio, gera o orbital molecular antiligante de maior energia, o qual apresenta simetria, energia e orientação espacial adequada para bom recobrimento com orbitais de simetria π^* de ligantes π -ácidos (como o CO) e ligantes N-heterocíclicos (como a piridina e a pirazina).¹⁶⁵

A influência da natureza σ -doadora e π -receptora dos ligantes terminais N-heterocíclicos sobre a densidade eletrônica da unidade $[Ru_3O]$ foi investigada por meio de correlações entre os valores de pK_a dos ligantes terminais e os valores de máximos das bandas TCCL e IC. Estes valores são mostrados a seguir, na Tabela 8.

A figura 31 apresenta a correlação linear entre os valores de pK_a dos ligantes terminais N-heterocíclicos e os valores dos máximos das bandas TCCL (cm^{-1}) (A) e dos máximos das bandas IC (cm^{-1}) (B) para os complexos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(L)_2]$ sendo L= ampy, adpy, dmap, dmpz, acpy, 3-pic, 4-pic e tbpy.

Tabela 8: Valores de pK_a dos ligantes terminais e λ_{max} das transições TCCL e IC dos complexos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_2(CO)]$ (L=adpy, ampy, dmap, dmpz, 3-pic, 4-pic, acpy e tbpy).

λ_{max} (nm)	dmpz	adpy	acpy ^a	3-pic ^b	4-pic ^c	tbpy ^a	dmap	ampy
ϵ (mol cm^{-1} L ⁻¹)								
log ϵ								
IC	591	590	588	587	585	586	589	585
	4684	5338	8621	3250	4018	4462	6753	3845
TCCL	386	406	408	327	332	339	394	351
	7288	6963	4986	5640	6202	2322	7657	8778
pK_a	2,26	3,59	3,60	5,05	5,98	6,14	9,20	9,39

Dados das referências ^a 162, ^b 127 e ^c 161

Figura 31: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos com os valores de energia dos $\lambda_{\max}$ das bandas TCCL (A) e dos $\lambda_{\max}$ das bandas IC (B).

Na Figura 31-A, observa-se a dependência entre a energia das transições de transferência de carga cluster ligante (TCCL) e os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos. A análise da energia das bandas de TCCL mostra a influência do caráter σ -doador ou π -receptor dos ligantes terminais sobre os níveis $d\pi$ do metal e π^* dos ligantes. Como ilustrado na figura 31-A, os ligantes foram separados em dois grupos de acordo com o caráter predominante π -receptor (dmpz, adpy e acpy) ou σ -doador (ampy, dmap, 3-pic, 4-pic e tbpy). Desta forma é possível entender o comportamento das bandas de transferência de carga. Os ligantes de caráter predominantemente σ -doador (ampy, dmap, 3-pic, 4-pic e tbpy) doam densidade eletrônica para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, assim o aumento da densidade eletrônica nos níveis

$d\pi$ causa repulsão intereletrônica, que desestabiliza os níveis metálicos, diminuindo a energia das bandas de TCCL (esquema 4). Quanto maior a capacidade de doar densidade eletrônica, maior é a desestabilização nos orbitais $d\pi$.

Esquema 4: Representação dos orbitais envolvidos na transição TCCL.

Os ligantes de caráter π -receptor (dmpz, adpy e acpy) possuem orbitais π vazios disponíveis (antiligantes vazios, geralmente o LUMO) com energia mais elevada que a energia dos orbitais metálicos.¹⁶⁶ Estes ligantes removem a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, estabilizam os orbitais $d\pi$ do metal e aumentando a energia dos seus orbitais π^* , por consequência é observado um aumento na energia das transições TCCL, como ilustrado na figura 31-A.

Observa-se ainda que a energia das bandas de TCCL para o grupo de ligantes π -receptores é inferior à energia observada para o grupo de ligantes σ -doadores. Acreditamos que a presença dos substituintes estende a conjugação π nestes ligantes. Por exemplo, o segundo átomo de nitrogênio do dmpz (N-dmpz), as funções cetonas dos grupos $\text{NH}_2\text{-C=O}$ (adpy) e $\text{CH}_3\text{-C=O}$ (acpy) são responsáveis pela diminuição da energia dos orbitais π^* dos ligantes, o que resulta em diminuição significativa da energia total das bandas de TCCL para este grupo de ligantes.

A Figura 31-B, mostra a dependência entre a energia das transições intra-cluster (IC) e os valores de pK_a dos ligantes terminais N-heterocíclicos. A correlação linear observada nesta figura reflete a influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais sob os níveis $d\pi$ do metal. Observa-se uma clara tendência do aumento das energias da transição IC com o aumento dos valores de pK_a dos ligantes

De acordo com a literatura, complexos trinucleares de acetato de rutênio simétricos (com três ligantes terminais iguais $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$) apresentam forte deslocalização eletrônica, entretanto quando o ligante CO é coordenado ao complexo esta deslocalização é afetada, pois o CO é um ligante π -receptor que quando coordenado ao átomo de Ru(II) apresenta retrodoação. Desta forma a valência nesta classe de compostos é localizada $[(\text{Ru}^{\text{II}}-\text{CO})\text{Ru}^{\text{III}} \text{Ru}^{\text{III}}]$.²³

Recentemente Zhang e colaboradores demonstraram, por meio de cálculos DFT, que o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{py})_2]$ apresenta valência localizada.¹⁶⁴ Segundo os autores, a distribuição de cargas positivas para os íons de rutênio do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{py})_2]$ é nitidamente diferente das distribuições de cargas das duas outras espécies estudadas no trabalho, a saber $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_3]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CN})(\text{py})_2]$. No complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{py})_2]$, o valor da carga positiva sobre o íon de Ru coordenado ao CO é significativamente menor que o valor das cargas positivas encontradas sobre os íons de Ru coordenados à piridina. Enquanto para os outros dois complexos, os valores das cargas positivas localizadas sobre os íons de rutênio são bastante próximos, indicando que para estes compostos ocorre uma deslocalização eletrônica, diferente do observado para o complexo contendo CO coordenado. Ainda de acordo com o mesmo estudo, a descrição de localização eletrônica é considerada adequada para os complexos trinucleares monocarbonil: o íon de Ru (II) ligado ao CO $\{\text{Ru}(\text{II})\text{CO}\}$ contribui para o nível HOMO e os outros íons de Ru(III) ligados a piridinas $\{\text{Ru}(\text{III})\text{py}\}$ contribui para o nível LUMO. Desta forma, acredita-se que as energias de transição IC são influenciadas pelo caráter σ -doador ou π -receptor dos ligantes terminais. Os ligantes de natureza σ -doadora (ampy, dmap, 3-pic, 4-pic e tbpy) doam densidade eletrônica para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ fortalecendo a retrodoação envolvida entre o íon de Ru(II) e o ligante π -receptor CO, por consequência a densidade eletrônica sobre o íon de Ru(II) diminui, os níveis $d\pi$ do metal são estabilizados, e assim os valores das energias das transições IC para os complexos com estes ligantes são maiores, conforme ilustrado na Figura 31-B e no esquema 5.

Esquema 5: Representação dos orbitais envolvidos na transição IC.

O oposto é observado para os ligantes π -receptores (dmpz, adpy e acpy) que removem a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ enfraquecendo a retrodoação, aumentando a densidade eletrônica sobre o íon de $\text{Ru}(\text{II})$ e desestabilizando os níveis $d\pi$ do metal, assim os valores das energias das transições IC para os complexos com ligantes π -receptores são menores.

3.2.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma das técnicas utilizadas na caracterização de complexos trinucleares de acetato de rutênio. A atribuição do espectro vibracional é realizada por meio de comparação com espectros dos íons carboxilatos, dos ligantes livres e de complexos análogos já descritos na literatura.^{1,2,6,157,160} Os espectros vibracionais dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ ($\text{L}=\text{adpy}$, ampy , dmap e dmpz) (Figura 32) foram registrados com o objetivo de verificar a presença das espécies coordenadas ao rutênio, tais como pontes de acetato, ligantes terminais N-heterocíclicos e o ligante π -acceptor CO. Os valores das frequências observadas nos espectros destes complexos são apresentados a seguir na Tabela 9.

Figura 32: Espectros vibracionais dos compostos (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]$, (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{adpy})_2(\text{CO})]$, (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$, (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$ na região do infravermelho obtidos a partir de pastilhas de KBr.

Tabela 9: Valores de frequência observados na região de 4000-500 cm^{-1} para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L=adpy,ampy,dmap e dmpz).

Compostos	Banda (cm^{-1})	Atribuições
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{adpy})_2(\text{CO})]$	1947s	ν (CO)
	1684s	ν (C=O) adpy
	1603s	ν_{as} (COO) Ac
	1566s	ν_{as} (COO) Ac
	1421s	ν_{s} (COO) Ac
	1347w	δ (CH ₃) Ac
	1218w	δ (CH) py
	1064w	ν (anel py)
	1029w	δ (CH) Ac
	769w	r (NH) adpy
	687m	δ (OCO)
	624m	Π (COO)Ac
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$	3377m	ν (NH ₂) ampy
	1920/1940s	ν (CO)
	1639s	δ (NH ₂) ampy
	1605/1617s	ν_{as} (COO) Ac
	1575s	ν_{as} (COO) Ac
	1420s	ν_{s} (COO) Ac
	1347	δ (CH ₃) Ac
	1215m	δ (CH) py
	1060w	ν (anel py)
	1024s	δ (CH) Ac
	687w	δ (OCO)
	622w	Π (COO)Ac
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]$	1927s	ν (CO)
	1611s	ν_{as} (COO) Ac
	1579s	ν_{as} (COO) Ac
	1423s	ν_{s} (COO) Ac
	1346om	δ (CH ₃)Ac
	1227s	δ (CH) py
	1067m	δ (CH) py
	1022s	δ (CH) Ac
	688w	δ (OCO) Ac
	624w	Π (COO) Ac
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]$	1945s	ν (CO)
	1609s	ν_{as} (COO) Ac
	1569s	ν_{as} (COO) Ac
	1420s	ν_{s} (COO) Ac
	1348w	δ (CH ₃)Ac
	1253w	δ (plano do anel) dmpz
	1032w	δ (CH) Ac
	772w	δ (CH) dmpz
	732w	Respiração do anel dmpz
	688	δ (OCO)
	625	Π (COO)Ac

A molécula de monóxido de carbono livre apresenta estiramento característico ν (CO) em 2155 cm^{-1} , quando coordenada, esta frequência é deslocada para valores menores.¹⁶⁷ O espectro vibracional de complexos metálicos contendo CO coordenado apresenta uma banda bastante intensa na região entre $2100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ referente ao ν (CO), o qual geralmente não é acompanhado de acoplamento de outros modos vibracionais.¹⁶⁷ Nos espectros vibracionais dos quatro complexos em estudo (Figura 32) são observadas bandas de forte intensidade com frequências entre $1919\text{-}1947\text{ cm}^{-1}$, as quais são características do estiramento do CO coordenado. Estes valores encontrados estão em concordância com os valores reportados na literatura para complexos análogos.^{15,157,167} No espectro vibracional do composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ as bandas atribuídas aos estiramento ν (CO) e ν_{as} (COO) apresentam perfis distintos do observado para os demais complexos da série. Observa-se um pequeno desdobramento na extremidade dos picos, como ilustrado na Figura 33.

Figura 33: Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ em pastilhas de KBr.

Os dados de difração de Raios-X do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ revelaram que no interior da cela unitária deste composto existem quatro moléculas do complexo, as quais são unidas por meio de ligações de hidrogênio entre os átomos de

hidrogênio do grupo amina presente no ligante terminal ampy e átomos de oxigênio provenientes do ligante CO e das pontes acetato. Assim acredita-se que a participação dos átomos de oxigênio do ligante CO e das pontes acetato nas ligações de hidrogênio são responsáveis pelo enfraquecimento da ligação C-O, que por consequência introduz um componente vibracional de menor energia nos ν (CO) e ν_{as} (COO), 1920 cm^{-1} e 1605 cm^{-1} respectivamente. Ainda com base na cela unitária do composto, observou-se que os átomos de oxigênio das pontes acetato que participam das ligações de hidrogênio estão presentes nas pontes de acetato localizadas entre os dois ligantes piridínicos (ampy), assim estão ligadas a íons de rutênio (III), nestes íons metálicos a densidade eletrônica é menor e a vibração ν (COO) é maior que a mesma vibração para as pontes acetato ligadas ao átomo de Ru(II). Portanto, esta vibração $\nu_{as}(\text{COO})$ ocorre em valores de energia maiores ($\sim 1610\text{ cm}^{-1}$).

Complexos trinucleares de acetato de rutênio contendo CO coordenado podem ser isolados apenas na configuração $[(\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO})\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}]$ devido a elevada estabilidade proveniente da retrodoação envolvida na ligação entre o ligante π -receptor CO e o íon de Ru^{II} .¹⁶⁸

A Figura 34 ilustra a correlação linear entre frequências do ν (CO) coordenado versus os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos. Esta correlação reflete a retrodoação envolvida na interação do CO com a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. A ligação entre C-O é enfraquecida enquanto a ligação Ru-C é fortalecida pela retrodoação, pois o ligante CO possui um par de elétrons livres e orbitais π^* vazios que podem comportar pares de elétrons, na sua interação com o centro metálico este torna a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ deficiente em elétrons e estabiliza o orbital $d\pi$ do metal.^{15,168} Os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos e dos ν (CO) e ν (COO) encontram-se na Tabela 10.

Figura 34: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos e $\nu(\text{CO})$, para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L=adpy, ampy, dmap, dmpz, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic).

Tabela 10: Valores dos $\nu(\text{CO})$ e $\nu(\text{COO})$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ (L= adpy, ampy, dmap, dmpz, 3-pic, 4-pic, acpy e tbpy) e os respectivos valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos.

	dmpz	adpy	acpy ^a	3-pic ^b	4-pic ^c	tbpy ^a	dmap	ampy
$\nu(\text{CO}) (\text{cm}^{-1})$	1945	1947	1940	1939	1943	1948	1927	1920/1940
$\nu_{\text{as}}(\text{COO}) (\text{cm}^{-1})$	1609	1603	1608	1607	1610	1613	1611	1605/1617
$\nu_{\text{as}}(\text{COO}) (\text{cm}^{-1})$	1569	1566	1569	1572	1570	1574	1579	1575
$\nu_{\text{s}}(\text{COO}) (\text{cm}^{-1})$	1420	1421	1420	1420	1420	1421	1423	1420

Dados das referências ^a 162, ^b 127 e ^c 161.

Observa-se na Figura 34 que quanto menor o valor de pKa do ligante terminal, maior é o valor da frequência encontrado para o $\nu(\text{CO})$. Ligantes π -receptores deslocam a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, causando uma diminuição no efeito da retrodoação envolvida na ligação entre o Ru-C e consequentemente ocorre o fortalecimento da ligação C-O assim os valores de $\nu(\text{CO})$ encontrados para complexos com ligantes π -receptores coordenados são maiores que os valores encontrados para complexos com ligantes σ -doador os quais doam a densidade eletrônica para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ potencializando o efeito de retrodoação. Conforme ilustrado na figura 34 é

possível observar a correlação linear utilizando os dois valores do ν (CO) do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, sendo que na reta onde foi utilizado o valor de ν (CO) de 1920 cm^{-1} (em vermelho) apresentou melhor correlação, sendo portanto mais sensível que a outra reta (em preto).

A estrutura dos complexos em estudo apresenta seis pontes acetato, sendo que quatro estão coordenadas a íons de Ru^{III} e Ru^{II} e duas são coordenadas apenas entre íons Ru^{III} . Na teoria são esperadas duas bandas para cada um dos modos vibracionais assimétrico $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ e simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$, entretanto no espectro vibracional desta classe de compostos são observados duas bandas próximas a 1609 cm^{-1} e 1571 cm^{-1} para o $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ e apenas uma banda próxima a 1420 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$. De acordo com a literatura, os dipolos dos modos vibracionais $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ e $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ são afetados pela localização eletrônica, que ocorre nos complexos monocarbonilados em estudo $[(\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO})\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}]$, os modos vibracionais das pontes acetato coordenadas aos íons Ru^{III} apresentam absorção diferente dos modos vibracionais das pontes de acetato que são coordenadas ao átomo de Ru^{II} , além disso o acoplamento $\text{Ru}^{\text{III}}\text{-Ru}^{\text{II}}$ e o dipolo do $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ é maior quando comparado ao dipolo do $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$.²³

Nos espectros vibracionais dos complexos em estudo foram observados valores de frequências entre $1601 - 1617\text{ cm}^{-1}$, $1567 - 1577\text{ cm}^{-1}$ e $1421 - 1423\text{ cm}^{-1}$, as quais são atribuídas à frequência de $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ e de $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ respectivamente. Estes valores encontrados são próximos dos valores apresentados pelo acetato livre, que de acordo com a literatura é característico para acetato em ponte.¹⁶⁷ O íon acetato pertence ao grupo de ponto C_{2v} e apresenta 15 modos normais de vibração, sendo apenas um destes inativo no infravermelho.¹⁶⁰ Foram identificados seis destes modos vibracionais nos espectros de todos os complexos estudados.

A influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais N-heterocíclicos sobre a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ foi investigada também por meio das correlações lineares entre as frequências de $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ das pontes acetato e os valores de pK_a dos ligantes terminais (Figura 35).

Figura 35: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes terminais N-heterocíclicos e $\nu_{as}(\text{COO})$ e de $\nu_s(\text{COO})$ $\nu(\text{CO})$ para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ sendo L=adpy, ampy, dmap, dmpz, acpy, 3-pic, 4-pic e tbpy

Observa-se nitidamente na figura acima a tendência linear do aumento das frequências do $\nu_{as}(\text{COO})$ das pontes acetato com o aumento dos valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos. Os ligantes de natureza σ -doadora doam densidade eletrônica para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ fortalecendo a ligação entre o íon de Ru com o átomo de oxigênio central e enfraquecendo as ligações entre o íon de Ru e as pontes acetato, por consequência o valor do $\nu_{as}(\text{COO})$ das pontes acetato é observado em valores de frequência maiores. No caso dos ligantes de natureza π -receptora, ocorre o oposto, estes ligantes retiram densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ causando o enfraquecimento da ligação do íon de Ru com o átomo de oxigênio central e o fortalecimento das ligações entre os íons de Ru e as pontes acetato, assim os valores de $\nu_{as}(\text{COO})$ das pontes acetato são menores.

Nas correlações ilustradas nas figuras 34 e 35 as quais investigam a influência dos ligantes terminais sobre a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, observa-se que as correlações apresentadas na figura 35 referente ao $\nu_{as}(\text{COO})$ das pontes acetato *vs* o pKa dos ligantes terminais são melhores que as correlações mostradas na figura 34 referentes ao $\nu(\text{CO})$ *vs* o pKa dos ligantes terminais. Isto pode ser atribuído à descrição

de valência localizada presente nesta classe de compostos, observa-se que a influência dos ligantes terminais sobre o íon de Ru (II) no qual o CO está coordenado e apresenta retrodoação é pequena, de fato a retrodoação envolvida na ligação Ru(II)-CO é enfraquecida ou potencializada por meio do ligante terminal, entretanto esta influência dos ligantes N-heterocíclicos é menor, quando comparada a influência dos mesmos sob a ν_{as} (COO) das pontes acetato, as quais são ligadas a íons de rutênio (III) sendo mais sensíveis à doação ou retirada de densidade eletrônica na unidade [Ru₃O].

Além das pontes acetato e do ligante CO, coordenam-se a unidade [Ru₃O] ligantes N-heterocíclicos. Três dos quatro complexos em estudo apresentam como ligantes terminais anéis piridínicos substituídos (ampy, adpy e dmap) e um dos compostos apresenta como ligante terminal um anel pirazínico (dmpz).

De acordo com Londergan e Kubiak (2003), quando a molécula de piridina está coordenada a unidade [Ru₃O] esta apresenta frequências de estiramento simétrico e assimétrico em 208 cm⁻¹ e 203 cm⁻¹ respectivamente.¹⁶⁵ (Tabela 11) A molécula de piridina apresenta 27 modos normais de vibração, sendo que apenas 3 não são ativos no infravermelho. Após a coordenação, a piridina mantém sua simetria (C_{2v}) e a maioria das suas frequências vibracionais não sofrem deslocamentos consideráveis.^{160,168}

Tabela 11: Frequências calculadas para o complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(py)₂].¹⁶⁵

Frequência (cm ⁻¹)	Simetria	Atribuição
158	A ₁	Respiração simétrica do Complexo
208	B ₁	ν_{as} ([Ru ₃ O]-py)
203	A ₁	ν_s ([Ru ₃ O]-py)
1954	A ₁	ν (CO)

Os ligantes piridínicos (ampy, dmap e adpy) apresentam simetria C_{2v}, a qual é mantida após a coordenação, possuem 24 modos normais de vibração referentes ao anel, os quais são ativos no infravermelho e outros modos atribuídos aos seus substituintes.¹⁶⁰ Nos espectros vibracionais dos complexos contendo ligantes terminais piridínicos são

observados valores de frequências entre 1215-1227 cm^{-1} os quais são atribuídos a δ (CH) da piridina. Observa-se a presença de uma banda fraca com valores de frequência entre 1060-1064 atribuídos ao ν (anel py). São observadas ainda algumas bandas que confirmam a presença dos substituintes junto ao anel piridínico: uma banda de forte intensidade em 1684 cm^{-1} , referente ao ν (C=O) adpy e uma banda média em 3377 cm^{-1} atribuída a ν (NH₂) ampy. Estes valores estão em concordância com os valores reportados na literatura.¹⁶⁰

A molécula de pirazina apresenta simetria D_{2h} quando livre, após a coordenação ocorre uma quebra de simetria e esta passa a pertencer ao grupo de ponto C_{2v} . Quando este ligante bidentado encontra-se livre, este possui 24 modos normais de vibração, sendo que apenas 10 destes modos vibracionais são ativos no infravermelho. Após a coordenação são observados 21 modos normais de vibração ativos no infravermelho. A classificação dos modos normais de vibração desta molécula, assim como os da piridina foi adaptada dos estudos realizados para a molécula de benzeno (D_{6h}).¹⁶⁰ Na figura 36 são apresentados modos vibracionais totalmente simétricos da molécula de pirazina.

Figura 36: Modos normais vibração totalmente simétricos da molécula de pirazina.¹⁶⁵

O ligante 2,6-dimetilpirazina (dmpz) não muda de simetria (C_{2v}) após sua coordenação, esta molécula apresenta 21 modos vibracionais do anel ativos no infravermelho e outros modos referentes aos grupos metila presentes.¹⁶⁰ No espectro vibracional do complexo contendo o ligante pirazínico (dmpz) são observadas a presença de três bandas fracas em 772,732 e 1253 cm^{-1} , as quais são atribuídas, respectivamente, à δ (CH) da dmpz, à respiração do anel pirazínico e a δ (plano do anel) dmpz. Estes valores de frequências estão de acordo com a literatura.¹⁶⁰

A unidade [Ru₃O] apresenta quatro modos vibracionais ativos no infravermelho, dois estiramentos simétrico ν_s [Ru₃O], e assimétrico ν_{as} [Ru₃O] e duas deformações

simétrica δ_s [Ru₃O] e assimétrica δ_{as} [Ru₃O]. De acordo com a literatura as vibrações ν_s [Ru₃O] e δ_{as} [Ru₃O] são esperadas em frequências abaixo de 250 cm⁻¹ e o ν_s [Ru₃O] é encontrado em frequência próximo a 305 cm⁻¹. Estes modos normais de vibração estão fora da nossa faixa de estudo. Apenas a vibração ν_{as} [Ru₃O] prevista em frequência de 605 cm⁻¹ pode ser alcançada pela nossa análise.¹⁶⁰ Para toda a série, foi observada uma banda de fraca intensidade na região entre 588-599 cm⁻¹ a qual é atribuída ao ν_{as} [Ru₃O], estes valores de frequência estão em concordância com os valores reportados na literatura.¹⁶⁰

3.2.5. Voltametria Cíclica

Os complexos trinucleares de acetato de rutênio exibem propriedades eletroquímicas interessantes. Os voltamogramas de clusters simétricos apresentam quatro ou cinco pares de ondas monoeletrônicas reversíveis na faixa de potencial entre 1,5 a -2,5 V vs EPH, as quais são atribuídas a variação do estado de oxidação formal dos íons Ru^{II II II}/Ru^{II II III}/Ru^{II III III}/ Ru^{III III III}/ Ru^{III III IV}/ Ru^{III IV IV}, as quais são separadas regularmente por 1 V indicando uma intensa deslocalização eletrônica na unidade [Ru₃O].^{6,8,47}

No caso dos clusters assimétricos do tipo [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(L)₂], o perfil observado nos voltamogramas destes complexos, mostrado a seguir nas Figuras 37-40, apresenta um comportamento diferente. São observados três pares de ondas monoeletrônicas com separação irregular, nota-se um grande deslocamento nos valores de E_{1/2} no primeiro par de onda para o segundo. De acordo com a literatura, a presença do ligante π -receptor CO é responsável pelo perfil característico desta classe de compostos, pois esta molécula exerce enorme influência sobre a densidade eletrônica da unidade [Ru₃O].^{6,23,155}

A presença da molécula de CO causa um grande deslocamento dos valores de E_{1/2} para valores mais positivos, o qual é observado nos voltamogramas dos complexos em estudo, isso ocorre devido à retrodoação envolvida na interação entre este ligante e a unidade [Ru₃O], o CO coordenado remove a densidade eletrônica da unidade [Ru₃O].^{6,155} Outro efeito induzido pela presença do CO coordenado em complexos trinucleares é localização eletrônica da unidade [Ru₃O], nesta valência trapeada o

ligante CO é coordenado a um íon de rutênio bivalente ($[\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO})\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}]$) formando uma ligação muito estável.²³

Os voltamogramas cíclicos apresentados a seguir, foram obtidos a partir de soluções com concentração entre $1,5\text{-}5,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em acetonitrila, contendo TBAPF_6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A região estudada foi de $2,0$ à $-2,0$ vs Ag/Ag^+ . As Figuras de 37 a 40 apresentam os voltamogramas cíclicos dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ ($\text{L}=\text{adpy}$, ampy , dmap e dmpz) em três velocidades de varredura (50 , 100 e 200 mV).

Figura 37: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / $0,1 \text{ M TBAPF}_6, \text{Ag}/\text{Ag}^+$) em acetonitrila.

Figura 38: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / $0,1 \text{ M TBAPF}_6, \text{Ag}/\text{Ag}^+$) em acetonitrila.

Figura 39: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / 0,1 M TBAPF₆, Ag/Ag⁺) em acetonitrila.

Figura 40: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ / 0,1 M TBAPF₆, Ag/Ag⁺) em acetonitrila.

A atribuição dos pares redox mostrados nos voltamogramas dos complexos em estudo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy, adpy, dmap e dmpz, foi realizada por meio de comparação de complexos análogos descritos na literatura.⁶ Observa-se para cada complexo três pares de ondas quase-reversíveis (Figuras 37-40) Os processos redox são centrados na faixa de potencial entre -1,2 a +1,34 V vs Ag/Ag⁺ (Tabela 12) e

são atribuídos à variação dos estados de oxidação formal da unidade $\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$, $\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$ e $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{IV}}$.

Tabela 12: Valores de $E_{1/2}$ para os processos redox dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$
L = ampy, adpy, dmap, dmpz, acpy, tbpy, 3-pic e 4-pic.

$E_{1/2}$ (V vs Ag/AgCl)	dmpz	adpy	acpy ^a	3-pic ^b	4-pic ^c	tbpy ^a	dmap	ampy
$[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/-1}$	-0,68	-0,76	-0,68	-0,85	-0,86	-0,86	-1,12	-1,10
$[\text{Ru}_3\text{O}]^{1/0}$	0,69	0,67	0,69	0,65	0,65	0,66	0,50	0,51
$[\text{Ru}_3\text{O}]^{2/1}$	1,34	1,32	1,32	1,27	1,27	1,28	1,10	1,10

^aDados retirados das referências ^a162 ^b127 e ^c161.

O comportamento eletroquímico dos complexos trinucleares de acetato de rutênio pode ser modulado por meio da substituição dos ligantes axiais $\text{L}^{8,10,169}$ ou por meio da troca de uma ou mais pontes de carboxilato.¹¹⁻¹³

Toma e colaboradores mostraram que os potenciais redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ em complexos trinucleares simétricos são influenciados pelo caráter π -receptor ou σ -doador dos ligantes N-heterocíclicos. Foi observada uma clara dependência entre os valores de $E_{1/2}$ e os valores de pKa dos ligantes terminais.⁵ A Tabela 12 apresenta os valores de $E_{1/2}$ dos complexos em estudo e de outros complexos reportados na literatura¹⁶¹ e sintetizados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dra. Sofia Nikolaou.^{127,162} Por meio destes valores foi construída a Figura 41.

Figura 41: Gráfico de $E_{1/2}$ dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ versus pKa dos ligantes N-heterocíclicos (L= dmpz,adpy,acpy,3-pic,4-pic,tbpy,dmap e ampy).

Observa-se na figura 41, que os valores de $E_{1/2}$ dos processos redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ diminuem linearmente com o aumento dos valores de pK_a dos ligantes N-heterocíclicos. Esta tendência é atribuída à influencia da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais sobre os potenciais dos processos redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{5,6}$,

Esse comportamento que foi reportado na literatura para complexos simétricos, onde a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ é deslocalizada, foi observado também para os complexos trinucleares monocarbonil de valência localizada presentes neste trabalho.¹⁶⁰

A Figura 41 apresenta três retas correspondentes aos processos redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Observa-se claramente que a reta referente aos estados de oxidação $[\text{Ru}_3\text{O}]^{-1/0}$ (em verde) apresenta uma inclinação maior que as duas outras retas que compõem a correlação, pois o orbital que recebe o elétron neste processo redutivo (a''_2 em simetria D_{3h} ou b_1 em simetria C_{2v}) apresenta energia e simetria adequada para interagir com o orbital do ligante terminal piridínico, desta forma este processo redox é mais sensível à influência dos ligantes terminais. Na análise do diagrama qualitativo de orbitais moleculares dos complexos trinucleares de rutênio observa-se que nos processos redutivos (com ganho de elétrons) os orbitais com caráter predominante de ligante piridínico são populados, enquanto que os processos de maiores estados de oxidação são menos sensíveis à influência dos ligantes terminais, pois orbitais populados nestes processos têm caráter predominantemente metálico.

O aumento dos valores de pK_a dos ligantes favorece estados de oxidação maiores ($[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/+1}$ e $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/+2}$), esta interação σ -doadora conduz a um decréscimo nos valores de $E_{1/2}$ para processos de oxidação. Enquanto que para menores valores de pK_a são observados maiores valores de $E_{1/2}$, sendo favorecidos estados de oxidação baixos ($[\text{Ru}_3\text{O}]^{-1/0}$).

3.3. Liberação Fotoinduzida de Monóxido de Carbono

A liberação fotoinduzida de monóxido de carbono em complexos trinucleares de acetato de rutênio é bastante útil para o desenvolvimento de rotas sintéticas e para a construção de nano estruturas estendidas. Além disso, pode ser utilizada como estratégia na entrega controlada de CO *in vivo*.⁴⁸

As fotólises dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L = ampy, adpy, dmap e dmpz em concentração de 10^{-5} mol L⁻¹, foram realizadas em acetonitrila (CH₃CN) utilizando laser com comprimento de onda de 377 nm. A liberação fotoinduzida do CO foi monitorada por meio de alterações espectrais observadas em função do tempo total de irradiação, de 80 minutos, através da espectroscopia eletrônica. Os espectros eletrônicos foram registrados em intervalos de 5 minutos. O cálculo do rendimento quântico foi realizado utilizando actinometria. A variação espectral observada durante o tempo de fotólise é mostrada nos espectros eletrônicos dos complexos em acetonitrila (Figuras de 42 a 45).

Figura 42: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.

Figura 43: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.

Figura 44: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.

Figura 45: Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ em acetonitrila com tempo de irradiação de 80 minutos.

Observa-se nos espectros eletrônicos de todos os compostos da série (Figuras de 42 a 45) que após a fotólise houve uma diminuição gradual da intensidade da banda intra-cluster (IC) presente na região entre 585-591nm e a formação de uma nova banda localizada na região entre 902 a 912 nm, acompanhada de dois pontos isobésticos. (Tabela 13)

Tabela 13: Valores das bandas IC, da nova banda formada na região de 900 nm e dos pontos isobésticos formados durante a fotólise dos complexos em estudo.

Complexos	IC (nm)	Nova banda (nm)	Ponto isobéstico 1 (nm)	Ponto isobéstico 2 (nm)
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$	585	905	497	640
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$	590	909	525	690
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$	589	902	505	662
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$	591	912	513	700

Estas alterações espectrais observadas indicam que ocorreu a reação de foto liberação da molécula de monóxido de carbono, pois complexos trinucleares de acetato de rutênio contendo CO coordenado apresentam em seu espectro eletrônico a presença da banda IC na região próxima a 600 nm, a qual corresponde a $[(Ru^{II}-CO)Ru^{III}Ru^{III}]$. Após a labilização do ligante CO, forma-se uma nova banda localizada na região de 900 nm a qual é característica de complexos trinucleares reduzidos com estado de oxidação formal $Ru^{III}Ru^{III}Ru^{II}$. A presença dos pontos isobésticos observados indica que uma espécie nova foi formada.⁴⁸ De acordo com a literatura, ocorre uma reação de fotossustituição, onde uma molécula do solvente acetonitrila (CH_3CN) coordena-se a unidade $[Ru_3O]$ após a labilização do CO, conforme o esquema 4.^{23,48}

Esquema 6: Reação de fotossustituição dos complexos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(L)_2]$

A investigação realizada até o presente momento para a classe de compostos estudada mostra que a liberação fotoinduzida da molécula de monóxido de carbono ocorre, necessariamente, por meio de irradiação (em 377 nm) sobre a banda de transferência de carga cluster ligante (TCCL). De acordo com a literatura e trabalhos recentes do grupo de pesquisa da Prof^a. Sofia Nikolaou, a reação de fotossustituição da molécula de CO não foi observada quando as amostras foram irradiadas em 660 nm.^{48,162}

Acredita-se que após a irradiação na banda TCCL, no estado excitado, ocorre uma transferência de carga fotolítica do orbital $d\pi$ do íon de rutênio para o orbital π^* da molécula de CO, a qual enfraquece a retrodoação envolvida na ligação $Ru(II)-CO$, causando a fotossustituição da molécula de monóxido de carbono por uma molécula do solvente (acetonitrila) (esquema 4). O complexo trinuclear retorna ao estado fundamental com recombinação de elétron, assim o fotoproduto da reação é uma espécie reduzida, conforme mostrado acima nas figuras de 42-45 onde se observa o espectro característico desta espécie com banda IC na região de 900 nm. O esquema a seguir apresenta a reação de fotossustituição da molécula de monóxido de carbono por uma molécula do solvente.

Esquema 7: Reação do fotosubstituição da molécula de monóxido de carbono por uma molécula de solvente.¹⁶²

Os valores de rendimento quântico (Φ) envolvidos na liberação fotoinduzida do CO foram calculados por meio de actinometria, utilizando como actinômetro de ferrioxalato de potássio.¹⁷⁰ Estes valores são mostrados a Tabela 14.

Tabela 14: Valores de pKa e de rendimento quântico Φ da liberação fotoinduzida de CO a partir dos complexos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(L)_2]$ L = ampy, adpy, dmap, dmpz, 3-pic, acpy, tbpy e 4-pic.

Complexos	pKa	Φ CO
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmpz)_2]$	2,26	0,004±0,01
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(adpy)_2]$	3,59	0,004±0,01
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(acpy)_2]$ ^a	3,60	0,0012±0,01
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(3-pic)_2]$ ^b	5,05	0,0028±0,01
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(4-pic)_2]$ ^b	5,98	0,0042±0,01
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(tbpy)_2]$ ^a	6,14	0,0011±0,001
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmap)_2]$	9,20	0,006±0,001
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(ampy)_2]$	9,39	0,011±0,001

^aDados retirados da referência 162. ^bDados não publicados

Os valores de rendimentos quânticos (Φ) obtidos para os complexos em estudo estão em concordância com os valores reportados na literatura.⁴⁸ Estes mostraram que a liberação do CO ocorre mais facilmente em complexos que apresentam ligantes terminais com caráter σ -doador (ampy e dmap), pois os valores encontrados para estes compostos são maiores.

A Figura 46 apresenta a dependência dos rendimentos quânticos da liberação fotoinduzida do monóxido de carbono com os valores de pKa de ligantes terminais N-heterocíclicos. São observados desvios importantes da linearidade para essa correlação, os quais podem ser justificados pela diferença na solvatação dos diferentes grupos funcionais presentes nos ligantes N-heterocíclicos. Entretanto é nítida a tendência do aumento dos valores dos rendimentos quânticos com a capacidade σ -doadoras dos ligantes terminais.

No estado fundamental os complexos estudados, com ligante CO coordenado, apresentam carga formal zero (complexo reduzido) $[\text{Ru(II)-CORu}_2\text{(III)O}]^0$. No estado excitado, é simulada uma reação de oxidação e o transiente formado apresenta carga formal +1 (complexo oxidado) $[\text{Ru}_3\text{(III)O}]^{1+}$ (esquema 5), como reportado na literatura e nos dados de voltametria discutidos no item 3.2.5, estados de oxidação mais altos são favorecidos pela natureza σ -doadora dos ligantes terminais, tal característica justifica os valores de rendimentos quânticos encontrados.⁵

Figura 46: Dependência do rendimento quântico da liberação fotoinduzida do monóxido de carbono sob o valor de pKa dos ligantes terminais.

Capítulo 4

4.0. Estudo da interação entre complexos trinucleares de acetato de rutênio e biomoléculas alvo

4.1. Estudo da interação entre complexos trinucleares de acetato de rutênio e a albumina do soro humano (HSA)

4.1.1. Supressão de Fluorescência da HSA.

A albumina apresenta uma fluorescência intrínseca associada aos resíduos dos aminoácidos triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) (Figura 47). Dentre estes dois fluoróforos a emissão do Trp, localizado no subdomínio IIA, é a mais significativa, por esta razão neste estudo foi utilizado o comprimento de onda de excitação em 280 nm, o qual é característico do resíduo de triptofano.¹⁷¹

Figura 47: Representação da estrutura dos resíduos de aminoácidos (a) Tirosina e (b) Triptofano.

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas na caracterização das interações entre complexos de rutênio e biomoléculas alvos como a

HSA.^{60,61,70,172} A supressão da fluorescência de uma proteína pode ser induzida por diferentes processos, tais como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e colisões moleculares.¹⁷¹

De acordo com a literatura, as medidas de fluorescência podem ser classificadas em dois tipos: medidas de fluorescência convencional e no modo de fluorescência resolvida no tempo.¹⁷³ Nas medidas de fluorescência realizadas no modo convencional a fonte de radiação é uma lâmpada de xenônio. A amostra é irradiada com um feixe de luz contínua, sendo registrado o seu espectro de emissão. Este é o modo de fluorescência mais simples e comumente empregado em diversos estudos. O modo de fluorescência resolvida no tempo registra o decaimento da intensidade de fluorescência de uma amostra contra o tempo. Neste modo de fluorescência, a amostra é exposta a um pulso de luz, onde o intervalo do pulso é menor do que o tempo de decaimento da amostra. A intensidade do decaimento é registrada com um sistema de detecção de alta velocidade que realiza a medida em uma escala de nanosegundos.¹⁷³

As medidas de fluorescência resolvidas no tempo envolvem equipamentos mais dispendiosos, entretanto este modo de fluorescência, muito utilizado na área biológica, oferece valiosas informações, tais como, detalhes do microambiente do fluoróforo, reações intermoleculares (formação de dímeros e excímeros), transferência de energia e distâncias moleculares. Outra informação importante obtida por meio do modo de fluorescência resolvida no tempo é o tipo de mecanismo envolvido em um processo de supressão de fluorescência.¹⁷³

A classificação exata de um mecanismo de supressão de fluorescência como estático ou dinâmico é realizada por meio de medidas de tempo de meia vida, o qual representa o tempo médio em que uma molécula permanece no estado excitado, antes de retornar ao estado fundamental.^{173,174}

Na supressão estática uma fração dos fluoróforos observados é removida devido à formação de um complexo fluoróforo-supressor. Os fluoróforos complexados não são fluorescentes. É observada apenas a fração de fluoróforos remanescente (não complexados), a qual não é perturbada, assim o tempo de vida permanecerá constante e para o mecanismo estático temos que $\tau/\tau_0 = 1$.¹⁷³

No caso de um mecanismo definido como dinâmico, ocorre uma diminuição da

população no estado excitado devido ao processo de desativação de fluorescência causada pelas colisões entre o fluoróforo e supressor.¹⁷³ Assim é observado um decréscimo no tempo de meia vida da amostra, o qual é equivalente à da intensidade de fluorescência da amostra. Desta forma: $F_0/F = \tau_0/\tau$

Na ausência de um equipamento contendo modo de fluorescência resolvido no tempo, o mecanismo de supressão envolvido pode ser classificado qualitativamente como predominantemente dinâmico ou estático, por meio da dependência dos valores da constante de supressão de fluorescência (K_{sv}) com a temperatura. No caso do mecanismo dinâmico, a supressão ocorre por meio de colisões entre o fluoróforo (HSA) e o supressor (compostos de rutênio), assim os valores de K_{sv} aumentam com o aumento da temperatura. Enquanto no mecanismo estático, ocorre a formação de um complexo entre HSA e os derivados metálicos no estado fundamental, cuja estabilidade é diminuída com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, os valores de constantes de supressão (K_{sv}) diminuem.¹⁷³

O espectro de emissão da HSA apresentou uma banda intensa e alargada na região de 335 nm, quando a proteína foi excitada em 280 nm. A adição de alíquotas de solução dos complexos trinucleares de acetato de rutênio levou a uma diminuição gradativa da intensidade dessa banda, conforme ilustrado na Figura 48.

Figura 48: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença de (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ a 30 °C, $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm; pH= 7,2; $[\text{HSA}]=1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; $[\text{Ru}] = 0,0; 1,1; 2,2; 3,2; 4,3; 5,3$ e $6,5$ ($\times 10^{-6}$ mol L⁻¹), (a-g), respectivamente.

Uma vez que em nossos experimentos não foi utilizada a fluorescência resolvida no tempo, o mecanismo de supressão de fluorescência envolvido na interação entre a HSA e os complexos trinucleares em estudo foi avaliado, qualitativamente, por meio da dependência entre os valores da constante de supressão (K_{sv}) e a temperatura. Os dados obtidos foram tratados por meio da equação de Stern-Volmer.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$

Onde F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência do fluoróforo (HSA)

na ausência e presença do supressor (complexos de rutênio), respectivamente. K_q é a constante bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor (10^{-8} s), $[Q]$ é a concentração dos complexos, e K_{sv} é a constante de supressão dinâmica de Stern-Volmer.¹⁷⁵

O gráfico de Stern-Volmer de F_0/F em função da concentração do complexo metálico (Figura 49) apresenta perfil linear e descreve a supressão bimolecular de um fluoróforo (HSA) na presença de um supressor (complexo de rutênio). A partir da regressão linear desta figura, foram obtidos os valores de K_{sv} e K_q para a interação entre os complexos metálicos e a proteína em diferentes temperaturas, conforme apresentado na Tabela 15.

Figura 49: Gráficos de Stern-Volmer da interação entre HSA e os complexos trinucleares de acetato de rutênio, em três diferentes temperaturas. (a) 35°C, (b) 30°C, e 25°C (c). F= Fluorescência na presença do supressor. F_0 =Fluorescência na ausência do supressor. Solução tampão Tris-HCl pH=7,2. λ_{ex} = 280 nm.

Tabela 15: Valores de K_{SV} e K_q para os complexos trinucleares de acetato de rutênio na presença de HSA em diferentes temperaturas.

Composto	T(°C)	$K_{SV}(x10^4 mol^{-1})$	$K_q (x10^{12} mol^{-1} Ls^{-1})$	R^*	SD^{**}
[Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(ampy)₂]	25	2,15	2,15	0,9900	0,00895
	30	2,50	2,50	0,9960	0,00889
	35	3,33	3,33	0,9920	0,01586
[Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(adpy)₂]	25	1,51	1,51	0,9900	0,00725
	30	1,60	1,60	0,9910	0,02868
	35	2,24	2,24	0,9940	0,02766
[Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(dmap)₂]	25	15,3	15,3	0,9930	0,06259
	30	13,8	13,8	0,9904	0,06672
	35	7,60	7,60	0,9992	0,01052
[Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(dmpz)₂]	25	12,5	12,5	0,9933	0,06203
	30	13,4	13,4	0,9963	0,02229
	35	27,6	27,6	0,9947	0,07061

A análise dos dados apresentados na Tabela 15, mostra que no caso dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ sendo L= ampy, adpy e dmpz , o aumento da temperatura resultou em aumento dos valores de K_{sv} , indicando que os processos de supressão, para estes os compostos, ocorreram predominantemente via mecanismo dinâmico.

Analizando os dados referentes ao composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ observou-se o inverso, o aumento da temperatura resultou em um decréscimo dos valores de K_{sv} , assim no caso deste composto ocorreu a formação de um complexo entre HSA e este derivado metálico no estado fundamental.

4.1.2. Determinação da constante de ligação entre o Complexo Trinuclear e a HSA

A afinidade de um derivado metálico com a albumina é um parâmetro muito relevante na etapa de racionalização de um fármaco, pois a eficácia desta nova droga e o seu transporte no plasma sanguíneo dependem diretamente do nível de interação com a HSA.¹⁷⁶ Desta forma, para inferir a afinidade entre a proteína e os complexos em estudo, foi determinada a constante de formação aparente (K_b) do aduto complexo-albumina e o número de sítios que o composto ocupou na estrutura da biomolécula, por meio da equação de Stern-Volmer modificada.¹⁷⁷

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

Sendo que F_0 , F e $[Q]$ tem o significado mencionado acima e n é o número de sítios de interação do supressor (complexo) com a proteína.

A partir do gráfico de $\log (F_0 - F)/F$ vs o logaritmo da concentração dos complexos, ilustrado na Figura 50, foi obtido o valor da constante de formação aparente (K_b) e o número de sítios que o composto ocupa na estrutura da proteína (n) (Tabela 16) sendo que $\log k_b$ é o coeficiente linear e n é o coeficiente angular deste gráfico .

Figura 50: Gráfico de $\log [(F_0-F)/F]$ versus $\log [\text{complexo}]$ em (a) 35°C, (b) 30°C e (c) 25°C, respectivamente, para o sistema HSA – complexo trinuclear de acetato de rutênio.

Tabela 16: Constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) envolvidos na interação da HSA com o complexo trinuclear de acetato de rutênio.

Composto	T (C°)	K_b	N	R**	SD***
		(10^4mol L^{-1})			
	25	229,0	9	0,9961	0,0364
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$	30	46,8	9	0,9978	0,0242
	35	3,9	9	0,9967	0,0253

A constante de formação aparente (K_b) indica a afinidade envolvida entre a albumina e um supressor na formação de um aduto. Neste trabalho esta constante foi determinada apenas para o composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$, uma vez que por meio da dependência entre os valores de K_{sv} com a temperatura foi observado, qualitativamente, que a supressão causada pela presença deste derivado de rutênio apresenta mecanismo estático. A constante K_b não foi calculada para os demais compostos, pois os resultados obtidos nos indicaram que o provável mecanismo de supressão envolvido na interação destes compostos com a albumina é predominantemente dinâmico e, neste processo a supressão da fluorescência ocorre por

meio de choques muito rápidos entre a proteína e o supressor envolvendo apenas transferência de energia entre as espécies.

Na análise dos dados da Tabela 16, observa-se uma nítida diminuição dos valores de constante aparente (K_b) com o aumento da temperatura, isso nos sugere que o aduto formado HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ tem sua estabilidade reduzida com a elevação da temperatura. Entretanto a magnitude observada para $K_b \sim 10^4$ indica que o composto pode ser transportado pela proteína no plasma sanguíneo com eficiência, este valor de K_b esta em concordância com os valores reportados na literatura, os quais são encontrados no intervalo entre 10^4 e 10^6 L mol^{-1} . Desta forma, a ligação estabelecida é considerada moderadamente forte.⁶¹

Fármacos que estabelecem ligações fortes com a HSA apresentam menores efeitos colaterais, pois a concentração de espécies livres no plasma é pequena, assim o composto é transportado adequadamente no plasma sanguíneo.⁶¹ Além disso, o valor de n para as três temperaturas indica que em cada molécula da proteína são ligadas nove moléculas do complexo.¹⁷⁸

4.1.3. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos envolvidos na Interação entre a HSA e o Complexo Trinuclear

A ligação entre uma proteína e uma molécula pequena pode ser constituída por forças de natureza hidrofóbicas, ligação de hidrogênio, forças eletrostática ou forças de Van der Waals.^{179–182} Os parâmetros termodinâmicos associados a esta ligação descrevem a espontaneidade do processo e permitem inferir a natureza das ligações formadas, pois segundo Ross e Subramanian valores de $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ mostram que a ligação é constituída por forças hidrofóbicas, $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ indicam que a ligação é formada por ligações de hidrogênio ou por forças de Van der Waals e $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ sugerem que a ligação tem caráter eletrostático.¹⁸³

Na formação de uma ligação química entre uma proteína e uma molécula pequena, o grau de organização ou de desorganização molecular envolvido na reação será refletido nos valores da variação de entropia (ΔS) associada a este sistema. O somatório da energia envolvida na ruptura e na formação de ligações irá indicar os

valores da variação de entalpia (ΔH) associada a uma reação.

Durante a formação de uma ligação constituída por forças hidrofóbicas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$), ocorre o rompimento de camadas de hidratação presentes nas duas moléculas envolvidas na ligação e por consequência o desordenamento do solvente faz com que a variação de entropia seja positiva. O valor da variação da entalpia também será positivo, pois o valor do somatório da energia referente à ruptura das ligações é maior que a energia necessária para formação das mesmas, assim o processo é endotérmico.¹⁸⁴

Quando uma ligação química entre uma biomolécula e uma molécula pequena é formada por meio de ligações de hidrogênio ou por forças de Van der Waals ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$) são observados valores de variação de entropia e de variação de entalpia negativos, pois a formação destes tipos de ligações envolve diminuição na variação da entalpia, o processo é exotérmico. Durante a formação de uma ligação de hidrogênio ou de Van der Waals ocorre um aumento na organização molecular para que sejam estabelecidas as ligações, as moléculas polarizadas são ordenadas de acordo com seus polos na ligação de Van der Waals. Na ligação de hidrogênio ocorre também um aumento da organização molecular quando os átomos de hidrogênio, de oxigênio, nitrogênio ou flúor se posicionam para formar a ligação. Desta forma, como consequência é observado um decréscimo nos valores da variação de entropia na formação destas ligações.

A formação de ligações de caráter eletrostático ($\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$) envolve um processo exotérmico e ocorre o rompimento da camada de solvatação iônica, assim a perda da organização molecular devido à desordem das moléculas do solvente conduz a valores de variação de entropia positivos.^{76,184}

Os valores da variação da entalpia (ΔH) e da variação da entropia (ΔS) envolvidos na ligação entre a HSA e o complexo de rutênio $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ foram calculados utilizando a Equação de Van't Hoff^{183,185}

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

Sendo K a constante de ligação, R a constante dos gases e T a temperatura em que o experimento foi realizado.

A Figura 51 apresenta o gráfico de Van't Hoff, $\ln K_b$ versus $1/T(K)$. Por meio dos coeficientes angular e linear de tal figura, foram obtidos os parâmetros termodinâmicos, os quais são apresentados na Tabela 17.

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada utilizando a equação a seguir:

$$\Delta G = -RT \ln K$$

Sendo $T(K)$ a temperatura expressa em graus kelvin, K a constante de ligação e R a constante dos gases ideais ($8,314510 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)¹⁸⁶

Figura 51: Gráfico de Van't Hoff referente à interação entre a HSA e complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$

Tabela 17: Parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre a HSA e o complexo trinuclear de acetato de rutênio

Composto	T (C°)	ΔH	ΔS	ΔG
		(kJmol ⁻¹)	(Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	(kJmol ⁻¹)
$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$	25			-36,3
	30	901,2	304,9	-32,9
	35			-27,1

De acordo com os valores encontrados para os parâmetros termodinâmicos, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ e $\Delta G < 0$ (Tabela 17), o processo de ligação entre a HSA e complexo de rutênio é espontâneo e o caráter das forças de ligação envolvidas é hidrofóbico. De acordo com a literatura quando é estabelecida uma ligação de natureza hidrofóbica, a proteína expõe seus resíduos apolares no interior do seu arcabouço proteico para o solvente, ocorre uma alteração conformacional a qual induz a reorganização das moléculas do solvente favorecendo esta ligação.⁷⁰ Desta forma, acredita-se que o complexo ligou-se a HSA por meio de ligações hidrofóbicas estabelecidas entre os grupos metila do ligante terminal 4-dimetilaminopiridina (dmap) e resíduos de aminoácido apolares presentes em uma cadeia lateral da proteína ou em um dos sítios de Sudlow.⁷⁰

4.1.4. Análise Conformacional da HSA por Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma das técnicas físicas mais sensíveis aplicada na determinação estrutural e no monitoramento de mudanças estruturais de proteínas em solução. Esta técnica simples também é amplamente empregada no estudo de compostos que apresentem um grupamento quiral em sua estrutura, tais como, peptídeos, ácidos nucleicos, taninos e carboidratos.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

O espectro de CD registra a diferença entre a absorção de luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda em função do comprimento de onda, de acordo com a equação 5.¹⁸⁹

$$CD = \Delta A = A_{\text{esquerda}} - A_{\text{direita}} \text{ (Equação 5)}$$

Sendo ΔA a variação da absorção de luz circularmente polarizada, A_{esquerda} corresponde a luz circularmente polarizada a esquerda e A_{direita} a luz circularmente polarizada a direita.

O espectro de CD no ultravioleta é amplamente utilizado no estudo de estruturas proteicas. Este espectro é geralmente dividido em duas regiões: A região do UV-próximo compreendida entre 250 – 300 nm, a qual é chamada de região de aromáticos e a região do UV-distante localizada entre 185 – 250 nm. Esta segunda região é utilizada no estudo da estrutura secundária de proteínas.¹⁹⁰ Neste intervalo o

cromóforo responsável pela absorção diferencial da luz circularmente polarizada são os grupos amida das ligações peptídicas, pois estes apresentam centro opticamente ativo.¹⁹⁰

Os grupos amida, ilustrados na Figura 52, apresentam duas ligações com rotações não rígidas, as ligações Φ ($RC_\alpha-NH$) e Ψ ($CO-C_\alpha R$) cujos ângulos específicos são os responsáveis pelos espectros de CD característicos das estruturas secundárias das proteínas.

Figura 52: Representação dos grupos da amida e suas ligações: Φ ($RC_\alpha-NH$) e Ψ ($CO-C_\alpha R$).

A estrutura secundária das proteínas é constituída por conformações de α -hélice, folhas- β e turnos. A estrutura secundária da albumina é composta predominantemente por α -hélice (67%). Desta forma, seu espectro de CD apresenta o perfil característico desta conformação, o qual é caracterizado pela presença de duas bandas em região negativa de intensidades aproximadamente iguais. Observa-se uma banda na região de 222 nm atribuída a transição $n \rightarrow \pi^*$ e outra banda próxima a 208 nm atribuída a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amida.¹⁹⁰

Os espectros de CD da albumina pura e da proteína na presença de crescentes concentrações dos complexos trinucleares de acetato de rutênio foram registrados na região de 195 a 260 nm, ilustrados na Figura 53. Como reportado anteriormente, este intervalo reflete as mudanças na estrutura secundária da proteína, mais especificamente no conteúdo da conformação de α -hélice da HSA.

O decréscimo da intensidade das bandas de CD referentes às conformações α -hélices da albumina é usado como medida de desnaturação proteica induzida pela presença de ligantes.

Figura 53: Espectros de CD da HSA na presença dos complexos trinucleares de acetato de rutênio (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ a 25°C , $[\text{HSA}] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{Ru}]$ ($0-5,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

Nas Figuras 53-A, 53-B e 53-C observa-se que a presença dos complexos trinucleares de acetato de rutênio não alterou o perfil espectral da proteína, o que está em concordância com o estudo de supressão da biomolécula, pois estes três compostos não estabeleceram uma ligação com a proteína e o provável mecanismo de supressão encontrado para os mesmos é dinâmico. Este envolve apenas colisões e transferência de energia, então nestes casos não seriam esperadas mudanças na estrutura secundária da HSA, uma vez que não ocorreu a formação de ligação. Entretanto no caso do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ o qual apresentou mecanismo de supressão de

fluorescência estático, na figura 53-D observa-se que a presença deste composto causou um decréscimo na intensidade das duas bandas negativas localizadas na região de 222 e 208 nm atribuídas as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amida respectivamente.¹⁹⁰

Na presença do complexo trinuclear ocorreu uma perda de 5% no conteúdo de α -hélice da estrutura secundária da proteína, esta alteração conformacional observada é menos significativa que as alterações reportadas na literatura para outros complexos metálicos na presença da HSA.¹⁹¹ Após as adições de alíquotas do complexo trinuclear a biomolécula mantém predominantemente a sua estrutura helicoidal, assim a sua função é preservada, uma vez que a atividade biológica e a função de uma proteína é dependente do seu arranjo conformacional.^{76,192} Além disso, de acordo com a literatura as alterações conformacionais observadas na estrutura secundária da HSA resultam em um aumento na exposição de algumas regiões hidrofóbicas.^{193,194} Como reportado anteriormente a ligação formada entre o complexo trinuclear e a proteína apresenta caráter hidrofóbico.

4.2. Estudo da Interação entre os Complexos Trinucleares e o Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

A espectroscopia eletrônica na região UV-visível tem sido bastante empregada no estudo da interação entre o DNA e complexos metálicos, esta técnica simples permite determinar a concentração da biomolécula, sua pureza e o seu modo de ligação com moléculas pequenas.¹⁹⁵ O espectro eletrônico do DNA apresenta uma banda de absorção com máximo em 260 nm, atribuída às transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ das bases nitrogenadas do DNA.^{195,196} Durante a interação entre um complexo metálico e o DNA são observadas algumas alterações espectrais, as quais refletem alterações na estrutura do DNA e evidenciam o modo de ligação presente na interação. Geralmente é observado um aumento na intensidade da absorvância (hipercromismo) ou uma diminuição da mesma (hipocromismo). A alteração na intensidade da absorção pode ser acompanhada por deslocamentos para a região do vermelho (batocromismo) ou para a região do azul (hipsocromismo).¹⁷⁸

O hipercromismo é reflexo de ligações que causam a desnaturação da estrutura de dupla hélice do DNA. As ligações de hidrogênio presentes entre as bases nitrogenadas do

DNA limitam a ressonância dos anéis aromáticos, limitando também a absorção das bases. Quando ocorre a desnaturação da dupla hélice as ligações de hidrogênio são rompidas e como resultado ocorre um aumento significativo na absorção das bases nitrogenadas. O hipercromismo também pode ser atribuído à ligação eletrostática entre compostos catiônicos e grupos fosfatos, pois esta interação causa a exposição das bases nitrogenadas por meio do desenvelonamento da estrutura helicoidal do DNA.¹⁹⁵

Outra característica espectral observada na interação entre o DNA e derivados metálicos é o hipocromismo, o qual indica uma possível intercalação do complexo metálico nas bases nitrogenadas do DNA, tal interação resulta no preenchimento dos orbitais π das bases nitrogenadas assim a probabilidade de transição eletrônica é diminuída, resultando em um decréscimo da absorvância.¹⁹⁵

O batocromismo e o hipsocromismo são resultados da diminuição ou do aumento na diferença de energia entre os orbitais das bases nitrogenadas e dos compostos respectivamente. O batocromismo é comumente observado quando ocorre uma ligação por intercalação acompanhado de hipocromismo. De acordo com a literatura ocorre uma interação entre os orbitais π^* do complexo metálico e os orbitais π das bases nitrogenadas do DNA, a qual resulta em um decréscimo do nível de energia do orbital π^* do complexo, sendo observado o deslocamento para a região do vermelho do espectro UV-visível^{195,197}

A Figura 54 apresenta os espectros eletrônicos dos complexos trinucleares $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ (A), $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ (B), $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ (C) e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ (D) na presença do *ct*-DNA em 30°C

Figura 54: Titulação dos complexos trinucleares (A) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$, (B) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, (C) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ e (D) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ via espectroscopia eletrônica com adições de *ct*-DNA. $[\text{Complexos}] = 3,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{DNA}] = 0,0; 3,57; 7,14; 11,0; 14,3; 17,9; 21,4 \text{ e } 25,0 (\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1})$, (a-g), respectivamente.

Nos espectros 54-A e 54-B observa-se um perfil hipocrômico associado à banda de transferência de carga com máximo de absorção em 394 e 351 nm para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ respectivamente, esta alteração espectral sugere a formação de uma ligação por intercalação entre estes compostos e o DNA. Os espectros 54-C e 54-D são correspondentes aos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ respectivamente. Os perfis espectrais destes espectros não apresentam alterações.

A magnitude dos valores das constantes de ligação (K_b) de complexos metálicos com o DNA tem sido utilizada para confirmar o possível modo de ligação dos complexos com a biomolécula. Segundo a literatura compostos intercaladores apresentam valores de

K_b no intervalo entre 10^6 - 10^7 M^{-1} , valores inferiores a estes sugerem a presença de outros modos de ligação não covalente entre o DNA e um composto de coordenação.¹⁹⁵

A interação entre complexos metálicos e DNA tem sido estudada por meio de espectroscopia eletrônica e no tratamento dos dados obtidos é amplamente empregado o método matemático de Benesi-Hildebrand.^{112,178,194} Esta abordagem matemática desenvolvida por Benesi e Hildebrand, em 1949, é um dos métodos mais comuns para a determinação de constantes de ligação entre moléculas por meio de dados de espectroscopia UV-visível.¹⁹⁸

O valor da constante de ligação (K_b) entre o DNA e os derivados de rutênio foi obtido por meio da equação de Benesi-Hildebrand:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{[Ru]_T \Delta \epsilon} + \frac{1}{[Ru]_T \Delta \epsilon K [DNA]}$$

Onde ΔA é a variação da absorbância, $[DNA]$ é a concentração do DNA, K é a constante de ligação, $\Delta \epsilon$ é a variação no coeficiente de absorção, a partir do composto de rutênio.¹⁹⁹ A partir dessa equação, foi construído o gráfico de $1/\Delta A$ em função da concentração de $1/[DNA]$, para os compostos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmap)_2]$ e $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(ampy)_2]$ como representado na Figura 55.

Figura 55: Gráfico duplo-recíproco Benesi-Hildebrand em para os complexos trinucleares (A) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmap)_2]$ e (B) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(ampy)_2]$.

Embora tenha sido observado um perfil hipocrômico durante a interação dos complexos trinucleares $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ com *ct*-DNA e esta alteração espectral sugerir a formação de uma ligação por intercalação, o valor da constante de ligação (K) encontrada para os dois complexos $3,22 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, $1,13 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (coeficiente de correlação = R = 0,9952, 0,9989) respectivamente, é bastante inferior aos valores apresentados por compostos intercaladores. De acordo com a literatura, o hipocromismo também pode ser observado como consequência da formação de uma ligação não covalente em uma das cavidades (sulcos) da estrutura do DNA.¹⁹⁷

O complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ apresenta como ligante terminal uma molécula de monóxido de carbono (CO) e duas moléculas de 4-dimetilaminopiridina (dmap). Acredita-se que os dois grupos metila presentes no ligante N-heterocíclico podem ter interagido com cavidade do DNA por meio de forças de hidrofóbicas. No caso do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ a interação com as cavidades do DNA pode ter ocorrido por meio de ligações de hidrogênio envolvendo o grupo amina do ligante 4-aminopiridina. De acordo com os dados de difração de raios-X reportados no item 3.3.1, o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ é capaz de realizar este tipo de ligações.

Capítulo 5

5.0. Avaliação do Potencial Biológico dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio

Como reportado anteriormente, um dos objetivos deste trabalho é contribuir com a ampliação dos estudos e das aplicações dos complexos trinucleares de acetato de rutênio na área biológica, uma vez que a literatura ainda é escassa quando se trata deste tipo de aplicação e considerando a classe de compostos estudada neste trabalho a proposta é inédita.

Desta forma, neste capítulo serão apresentados resultados preliminares da avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos complexos trinucleares de acetato de rutênio frente a duas linhagens celulares distintas B16F10 de melanoma murino e L929, de fibroblastos de murino (células não tumorigênicas) e uma avaliação da atividade tripanocida dos compostos em estudos. Espera-se que estas investigações iniciais direcionem os estudos do grupo de pesquisa a melhor compreensão dos complexos trinucleares em meio biológico, assim como direcionem os novos trabalhos que surgirão a partir deste.

5.1. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio frente à Linhagem de Células de Melanoma Murino (B16F10).

A atividade citotóxica dos complexos trinucleares de acetato de rutênio foi avaliada por meio da viabilidade celular obtida em diferentes concentrações (5 , 25 e 50×10^{-6} mol. L^{-1}) para os compostos precursores (1) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$ e (2) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(CH_3OH)_2]$, assim como para os complexos da série em estudo: (3) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(ampy)_2]$, (4) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(adpy)_2]$, (5) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmap)_2]$ e (6) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmpz)_2]$.

Os resultados obtidos foram analisados por meio das ferramentas estatísticas ANOVA one-way -Tukey e Bonferroni como teste de confirmação. Foi observada uma

diferença estatística entre o controle e as células incubadas após 24h com os complexos trinucleares. Na cultura de células da linhagem L929 (células saudáveis), todos os compostos apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle (sem composto) com viabilidade celular entre 85 a 90%, exceto os complexos precursores 1 e 2, os quais não apresentaram citotoxicidade conforme ilustrado na Figura 56.

Figura 56: Porcentagem de viabilidade celular (L929) dos complexos trinucleares de acetato de rutênio em diferentes concentrações (5,25 e 50 μM) em comparação com o controle. O número de células foi avaliado por MTT e os resultados são expressos como uma porcentagem em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata. Valores em média $\pm$ SEM. Os tratamentos foram realizados com ANOVA-one way análises (* $p < 0,05$) utilizando o teste de Tukey. Complexos: (1) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ e (2) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$, (3) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, (4) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$, (5) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (6) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$.

A análise estatística dos resultados obtidos no estudo de citotoxicidade contra a linhagem celular B16F10, realizada nas mesmas condições do estudo anterior, revelou que em concentração de $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ os compostos 3, 5 e 6 apresentaram uma resposta com $p < 0,05$ em comparação com o controle. Os demais compostos não demonstram diferença significativa quando comparados com o controle.

Entre os complexos trinucleares avaliados neste estudo, os compostos 3 e 6 apresentaram maior citotoxicidade frente as células tumorais (B16F10) com 60% de viabilidade celular em concentração de $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados referentes aos mesmos compostos em mesma concentração resultou viabilidade celular de 86% para as células L929, mostrando que estes compostos demonstraram alguma seletividade frente

as células de melanoma murino.

A Figura 57 apresenta a citotoxicidade dos complexos 1-6 frente à linhagem celular B16F10 em comparação com o controle. Observa-se para os complexos 3 e 6 ($[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy e dmpz) uma dependência entre o aumento da concentração e a toxicidade. O complexo 5 apresentou toxicidade apenas na concentração mais elevada ($50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Os demais complexos 1, 2 e 4 não demonstraram citotoxicidade frente a linhagem celular B16F10. Acredita-se que a presença dos ligantes terminais 4-aminopiridina (ampy) e 2,6-dimetilpirazina (dmpz) são responsáveis pela citotoxicidade dos complexos 3 e 6 frente as células B16F10, uma vez que o complexo precursor (2) apresenta a mesma estrutura que os demais complexos exceto os ligantes N-heterocíclicos e como pode ser observado na Figura 57 este composto não apresenta citotoxicidade em nenhuma das concentrações estudadas.

Figura 57: Gráfico da viabilidade celular de células B16F10 incubadas com complexos trinucleares de acetato de rutênio em diferentes concentrações em comparação com o controle. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores são a média $\pm$ SEM. Os tratamentos estatísticos foram realizados por ANOVA-one way (* $p < 0,05$) utilizando o teste de Tukey. Complexos:

- (1) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ e (2) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$,
(3) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, (4) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$, (5)
 $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ e (6) $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$.

De acordo com a literatura, o ligante 4-aminopiridina inibe a proliferação celular e induz a apoptose de vários tipos de células cancerígenas, incluindo as células de melanoma, as quais têm seu ciclo de divisão celular comprometido, devido ao bloqueio dos canais de potássio causado do pela presença do ligante 4-aminopiridina.^{200,201}

5.2. Avaliação da Atividade Tripanocida in vitro dos Complexos Trinucleares de Acetato de Rutênio.

A atividade tripanocida dos complexos trinucleares de acetato de rutênio foi investigada sobre a forma amastigota (forma replicativa intracelular do parasita), pois nesta forma o parasita participa da manutenção da infecção durante a fase indeterminada da doença de Chagas.¹³¹

A Figura 58 apresenta a percentagem da atividade tripanocida dos complexos trinucleares de acetato de rutênio e seus ligantes terminais N-heterocíclicos livres (ampy, adpy, dmap e dmpz.) em função da concentração. Como ilustrado na figura 62-A, os compostos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ (em vermelho) e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$ (em amarelo) apresentaram perfis com dose resposta mais próximos ao perfil do composto de referência (benzonidazol - BZN em preto). Na concentração máxima ($500 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$) estes dois compostos apresentam atividade tripanocida superior ao BZN, em concentrações entre $250 - 62,5 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$ estes complexos têm atividade tripanocida próxima ao composto de referência e em menores concentrações entre $31,25 - 3,75 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$ a atividade tripanocida de todos os complexos trinucleares e seus respectivos ligantes livres foi inferior à atividade do BZN. Ainda nesta mesma figura, observa-se que os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2]\text{CH}_3\text{COO}$ assim como os ligantes livres ampy e dmap apresentaram atividade tripanocida inferior ao BZN em todas as concentrações estudadas.

Figura 58: Atividade anti-Trypanosoma dos complexos trinucleares de acetato de rutênio e seus respectivos ligantes N-heterocíclicos livres.

Observa-se na Figura 58-B que o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ demonstrou atividade tripanocida superior ao benzonidazol nas concentrações de 500 e $250 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$, entretanto essa atividade foi inferior ao fármaco de referência nas demais concentrações.

O composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{adpy})_2]$ apresentou atividade tripanocida igual ao benzonidazol nas concentrações de 500 e $125 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$, nas demais concentrações a atividade tripanocida se manteve inferior a atividade tripanocida do BZN e superior a atividade tripanocida dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2]\text{CH}_3\text{COO}$ e dos ligantes

N-heterocíclicos livres. Quanto aos ligantes livres, apenas o dmpz apresentou atividade tripanocida superior ao benzonidazol (em concentração de 500 e 250 x 10⁻⁶ mol. L⁻¹), entretanto nas demais concentrações a atividade tripanocida foi menor, quando comparada a atividade do composto de referência. De forma geral, observa-se que os ligantes coordenados à unidade [Ru₃O] apresentaram melhores resultados quando comparados aos mesmos livres. Comparando a atividade tripanocida dos compostos [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(CH₃OH)₂] e [Ru₃O(CH₃COO)₆(CH₃OH)₂]₂CH₃COO observa-se que a presença do ligante CO parece favorecer um aumento da atividade tripanocida dos complexos estudados.

A citotoxicidade dos complexos trinucleares e dos seus respectivos ligantes N-heterocíclicos livres foi avaliada em células de baço de rato. A Tabela 18 apresenta os valores referentes ao IC₅₀ e o DL₅₀ dos complexos e os seus ligantes N-heterocíclicos livres.

Tabela 18: Valores de IC₅₀ (concentração mínima para causar a morte de 50% dos parasitas) e DL (atividade tóxica) dos complexos trinucleares de acetato de rutênio e seus respectivos ligantes N-heterocíclicos livres.

Compostos	IC_{50amas} B-gal (μM)	DL_{50Baço} (μM)
BZN	16,0	408,5
dmap livre	320,0	330,9
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CO)(dmap) ₂]	59,6	290,8
ampy livre	327,3	306,2
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CO)(ampy) ₂]	168,1	291,7
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CH ₃ OH) ₃] ₂ CH ₃ COO	330,1	231,5
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CO)(CH ₃ OH) ₂]	54,2	361,0
adpy livre	174,9	423,6
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CO)(adpy) ₂]	56,9	368,4
dmpz livre	109,7	337,4
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CO)(dmpz) ₂]	111,1	403,7

Observa-se na tabela 18 que entre os complexos estudados, os compostos [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(CH₃OH)₂], [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(adpy)₂] e [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(dmap)₂] foram os que apresentaram menores valores de IC₅₀ 54,2; 56,9 e 59,6 respectivamente. Estes valores são superiores ao valor de IC₅₀ do composto de referência, entretanto quando comparados aos valores de IC₅₀ dos ligantes N-heterocíclicos livres é muito menor, por exemplo, o ligante dmap livre tem valor de

IC₅₀ 5 vezes maior que o valor de IC₅₀ quando coordenado ao complexo trinuclear. Outra observação que mostra o efeito do ligante sobre a citotoxicidade é a coordenação do ligante monóxido de carbono.

Comparando os valores de IC₅₀ dos complexos [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(CH₃OH)₂] e [Ru₃O(CH₃COO)₆(CH₃OH)₃]CH₃COO observa-se que o valor de IC₅₀ do complexo contendo o CO coordenado é seis vezes menor que o mesmo valor encontrado para o cluster mãe com três moléculas de solvente (metanol) como ligantes terminais.

Comparando os dados de DL₅₀ e IC₅₀, observa-se que os ligantes N-heterocíclicos livres são mais tóxicos para os parasitas do que para as células saudáveis, entretanto seus valores de IC₅₀ são muito elevados. Os complexos [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(CH₃OH)₂], [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(dmap)₂] e [Ru₃O(CH₃COO)₆(CO)(adpy)₂] apresentaram os melhores resultados quando foram analisados os dois parâmetros IC₅₀ e DL₅₀, estes complexos apresentaram valores de atividade tóxica mais próximos ao valor do benzonidazol.

6.0. Considerações Finais e Perspectivas

Os complexos trinucleares de acetato de rutênio de fórmula geral [Ru₃O(CH₃COO)₆(L)₂(CO)] (L=adpy, ampy, dmap e dmpz) foram sintetizados e caracterizados, as adaptações realizadas na rota sintética dos compostos mostraram-se viáveis, pois minimizaram a formação de subprodutos indesejados. Contudo foi necessário realizar etapas de purificação, nas quais foi utilizada a cromatografia de adsorção em coluna e em placa preparativa. Esta foi realizada com sucesso, a pureza dos complexos de interesse foi confirmada por meio das técnicas de RMN de ¹H voltametria cíclica.

Os resultados obtidos por meio das técnicas de caracterização (espectroscopia eletrônica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, voltametria cíclica, RMN de ¹H e COSY e difração de raios X) confirmaram a obtenção dos complexos de interesse. Foram obtidos espectros eletrônicos característicos desta classe de complexos e os valores dos coeficientes de absortividade molar estão em concordância com os

valores reportados na literatura.

A coordenação dos ligantes piridínicos e das pontes carboxilato foi confirmada por meio dos espectros de ^1H RMN e COSY. Os dados obtidos por meio da difração de raio-X revelaram que o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$ apresenta sistema cristalino ortorrômbico e sua cela unitária possui quatro moléculas do complexo unidas por ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênios do grupo amida e os átomos de oxigênio das pontes carboxilato e da molécula de monóxido de carbono. A estrutura proposta, as distâncias atômicas e os ângulos de ligação foram elucidados por meio desta técnica.

Observou-se que as distâncias de ligação entre os átomos de rutênio e o átomo de oxigênio da ponte central são diferentes. O átomo de rutênio ligado à molécula de CO ($\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO}$) apresenta maior distância de ligação com o átomos de oxigênio da ponte central quando comparado aos outros dois íons de rutênio, devido ao efeito trans exercido pela molécula de CO, como consequência a ligação a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ apresenta geometria próxima de um triângulo isósceles e diferente dos complexos trinucleares simétricos estes compostos apresentam uma valência localizada $[(\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO}) \text{Ru}^{\text{III}} \text{Ru}^{\text{III}}]$, esta localização eletrônica também foi refletida nos dados de espectroscopia vibracional e RMN.

Os espectros vibracionais confirmaram a presença das espécies coordenadas ao rutênio, tais como pontes de acetato, ligantes terminais N-heterocíclicos e o ligante π -acceptor CO. O espectro vibracional do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ apresentou uma característica distinta dos demais compostos em estudo, uma divisão nos picos de $\nu(\text{CO})$ e $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$, a qual foi atribuída a participação dos átomos de oxigênio das pontes acetato e da molécula de monóxido de carbono nas ligações de hidrogênio presentes entre as moléculas do complexo em sua cela unitária, conforme reportado nos dados de difração de raios-X. Além disso, por meio da correlação linear entre frequências do $\nu(\text{CO})$ coordenado versus os valores de pK_a dos ligantes terminais N-heterocíclicos, foi evidenciada a retrodoação envolvida na interação do CO com a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e também a influência que a natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais exerce sobre esta interação. Dados de RMN e voltametria cíclica também demonstraram esta mesma influência.

Nos voltamogramas da série de complexos, observou-se que a presença da molécula de CO exerce enorme influência sobre a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, pois é responsável por um grande deslocamento dos valores de $E_{1/2}$ para valores mais positivos, isso ocorre devido a retrodoação envolvida na interação entre este ligante e a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Estudos da variação de velocidade de varredura em três velocidades (50, 100 e 200 mV s^{-1}) mostraram que ocorre apenas a transferência monoelétrica na superfície do eletrodo, pois a variação dos potenciais de oxidação e redução é quase nula.

A influência da natureza dos ligantes terminais N-heterocíclicos sobre a densidade eletrônica na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ foi observada por meio das correlações lineares entre os valores de pKa dos ligantes terminais e dados de espectroscopia eletrônica, de RMN, de infravermelho e voltametria cíclica. Foi observada a dependência entre as energias das bandas de TCCL e IC com os valores de pKa dos ligantes terminais. Na correlação das bandas de TCCL observa-se o acréscimo ou decréscimo da densidade eletrônica na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ devido à natureza dos ligantes terminais, influência os níveis $d\pi$ do metal e π^* do ligante, enquanto no caso das bandas IC a mesma influência é observada no nível $d\pi$ do metal. Nos dados de infravermelho, a correlação linear entre os valores de pKa e os valores de $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ mostrou-se bastante sensível à doação ou retirada de densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ por meio dos ligantes terminais, pois estas pontes são ligadas a íons de rutênio (III). Na correlação linear obtida por meio dos valores de pKa dos ligantes terminais e dos valores de deslocamento químico das metilas das pontes acetato observou-se que a doação ou a remoção da densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ é refletida na blindagem e na desblindagem das metilas.

A correlação linear entre os valores de $E_{1/2}$ dos complexos e os valores dos ligantes N-heterocíclicos mostrou que os valores de $E_{1/2}$ dos processos redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ diminuem linearmente com o aumento dos valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos, tal comportamento é atribuído a influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais sobre os potenciais dos processos redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. O aumento dos valores de pKa dos ligantes favorece estados de oxidação maiores, esta interação σ -doadora conduz a um decréscimo nos valores de $E_{1/2}$ para estes processos de oxidação. Enquanto que para menores valores de pKa são observados

maiores valores de $E_{1/2}$, sendo favorecidos estados de oxidação baixos. Observou-se também que os processos redutivos são mais sensíveis à influência do ligante terminal pois, como reportado, o orbital que recebe o elétron no processo redutivo apresenta energia e simetria adequada para interagir com o orbital do ligante terminal piridínico.

Os resultados obtidos por meio da investigação da liberação fotoinduzida de CO mostraram que a molécula de CO é liberada a partir dos complexos em estudo, quando irradiada com laser em comprimento de onda de 377 nm em meio orgânico (acetonitrila). Os valores de rendimentos quânticos encontrados estão em concordância com os valores reportados na literatura. A influência da natureza σ -doadora ou π -receptora dos ligantes terminais também foi observada nestes experimentos e na correlação linear obtida entre os valores de rendimento quântico e do pKa dos ligantes terminais, observou-se que os complexos com ligantes contendo ligantes de caráter σ -doador apresentaram maiores valores de rendimentos quânticos, pois estes parecem favorecer a liberação da molécula de CO.

O estudo de supressão de fluorescência da HSA na presença dos complexos trinucleares de acetato de rutênio mostrou por meio dos espectros de emissão da HSA na presença de cada complexo em estudo, que ocorreu uma diminuição na intensidade de fluorescência desta macromolécula.

Os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ ($\text{L} = \text{ampy}$, adpy e dmpz) apresentaram o processo de supressão dinâmico, o qual foi indicado pela dependência das K_{SV} dos compostos com a temperatura, enquanto que para o composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ os valores de K_{SV} indicaram processo de supressão estático. Desta forma, apenas este complexo trinuclear estabeleceu uma ligação com a proteína, a qual é espontânea, pois os valores encontrados para a variação de energia livre são negativos.

Os outros parâmetros termodinâmicos calculados neste estudo indicaram que a natureza das ligações formadas entre o derivado de rutênio com a biomolécula é de caráter hidrofóbico. Além disso, o espectros de CD dos complexos na presença da HSA mostraram que somente o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmap})_2]$ causou alteração na estrutura secundária da proteína, contudo a mudança no conteúdo de α -hélice da biomolécula não compromete a sua atividade biológica. Assim os resultados obtidos

sugerem que este composto pode ser transportado e distribuído pelo organismo com eficácia por meio da HSA.

A espectroscopia eletrônica foi utilizada para investigar a interação entre complexos trinucleares de acetato de rutênio e o DNA. Foi observado um perfil hipocrômico durante a interação entre os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy e dmap e o ácido nucleico, a magnitude das constantes de ligação indicaram que estes compostos podem ter se ligado a uma das cavidades (sulcos) do DNA por meio de ligações de hidrogênio e de ligações de natureza hidrofóbica entre os grupos funcionais dos ligantes N-heterocíclicos e as bases nitrogenadas da estrutura da biomolécula ou ainda a interação com ácido nucleico pode ter ocorrido por meio de uma intercalação parcial dos complexos trinucleares na estrutura do DNA. A natureza destas ligações será oportunamente investigada por meio de novos experimentos. Os demais complexos da série não apresentaram mudanças no perfil espectral assim acredita-se que estes não interagiram com o ácido nucléico.

Os resultados referentes à avaliação da atividade tripanocida dos complexos trinucleares mostraram que estes compostos de rutênio não apresentaram potencial para uma promissora aplicação na terapia da doença de chagas, uma vez que os valores de IC_{50} encontrados para estes complexos são superiores aos valores do composto de referência (benzonidazol) em todas as concentrações estudadas. Neste estudo foi observado que os ligantes N-heterocíclicos coordenados apresentaram melhores valores de atividade tripanocida e de citotoxicidade quando comparados à sua forma livre, além disso, a presença do ligante CO parece favorecer um aumento na atividade tripanocida destes complexos. Entretanto a atividade apresentada por estes compostos não é suficiente para que os mesmos sejam indicados para a continuidade de ensaios biológicos vislumbrando a aplicação na terapia da doença de Chagas.

Os dados de citotoxicidade *in vitro* dos complexos trinucleares de rutênio frente às linhagens celulares de células tumorais B16F10, mostraram que os compostos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy e dmpz apresentaram os melhores valores de citotoxicidade frente as células tumorais (B16F10) com 60% de viabilidade celular em concentração de $50 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$ e 86% viabilidade celular para as células L929. Entretanto, para o melhor entendimento da atividade citotóxica apresentada por estes complexos, é interessante a realização de novos experimentos para investigar a

internalização dos compostos nas células utilizando sistemas carreadores, já visto que estes complexos apresentaram solubilidade limitada em meio polar. Outra proposta seria investigar a atividade citotoxicidade dos ligantes na sua forma livre.

As propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Investigar a liberação de monóxido de carbono proveniente dos complexos trinucleares de acetato de rutênio em meio aquoso e em solventes orgânicos de polaridades diferentes;

- Realizar novos ensaios biológicos *in vitro* para ampliar a investigação sobre a atividade anticancerígena dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ L= ampy e dmpz.

7.0. Referências

1. A. D. P. Alexiou, S. Dovidauskas, H. E. Toma, *Química Nova*, 23, 6 (2000) 785-793.
2. H. E. Toma, K. Araki, A. D. P. Alexiou, S. Nikolaou, S. Dovidauskas, *Coordination Chemistry Reviews*, 219-221 (2001) 187-234.
3. A. Spencer, G. Wilkinson, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (1972) 1570.
4. S. D. Glover, J. C. Goeltz, B. J. Lear, C P. Kubiak, *Coordination Chemistry Reviews*, 254 (2010) 331-345.
5. H. E. Toma, C. J. Cunha, C. Cipriano, *Inorganica Chimica Acta*, 154 (1988) 63-66.
6. S. Nikolaou, *Desenvolvimento de Estruturas Polinucleares baseadas em Clusters Trinucleares e Complexos Poliimínicos de Rutênio: unidades de montagem em Química Supramolecular*, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2002.
7. M. N. Eberlin, D.M.Tomazela, K. Araki, A. D. P. Alexiou, A. L.B. Formiga, H. E. Toma, S. Nikolaou, *Organometallics*, 25 (2006) 3245-3250.
8. S. H. Toma, S. Nikolaou, D. M. Tomazela, M. N. Eberlin, H. E. Toma, *Inorganica Chimica Acta* 357 (2004) 2253-2260.
9. K. P. Naidek, D. M. Hoffmeister, J. Pazinato, E. Westphal, H. Gallardo, M. Nakamura, K. Araki, H. E. Toma, H. Winnischofer, *European. Journal of Inorganic Chemistry* (2014) 1150–1157.
10. F. Dai, B. Li, L. Shi, L. Zhang, Z. Chen, *Dalton Transactions* (2009) 10244-10249.
11. A. Inatomi, M. Abe, Y. Hisaeda, *Australian Journal of Chemistry*, 65 (2012) 1599-1607.
12. H. Yuge, S. Asahi, T. K. Mijamoto, *Dalton Transactions* (2009) 2287-2289.
13. F. Dai, H. Ye, B. Li, L. Zhang, Z. Zhang, *Dalton Transactions* (2009) 8696-8703.
14. J. C. Goeltz, E. E. Berson, C. P. Kubiak, *Journal of Physical Chemistry B*, 114 (2010) 14729-14734.
15. . H. Ye, F. Dai, L. Zhang, Z. Chen, *Inorganic Chemistry*, 46 (2007) 6129-6135.

16. H. E. Toma, J. Cunha, *Canadian Journal of Chemistry*, 67 (1989) 1632-1635.
17. H. E. Toma M. A. L. Olive, *Polyhedron* 13 (1994) 2647-2652.
18. R. C. Rocha, M.G. Brown, C. H. Londergan, J. C. Salman, P. C. Kubiak, A. P. Shreve, *Journal of Physical Chemistry A*, 109 (2005) 9006-9012.
19. H. Ohtsu, N. Fujiwara, T. Tamaguchi, *Inorganic Chemistry*, 50 (2011) 7382-7384.
20. C. P. Kubiak, *Inorganic Chemistry*, 52 (2013) 5663-5676.
21. M. Abe, T. Michi, A. Sato, T. Kondo, W. Zhou, S. Ye., K. Uosaki, Y. Sasaki, *Angewandte Chemie*, 115 (2003) 3018-3021.
22. M. Abe, T. Masuda, T. Kondo, K. Uosaki, Y. Sasaki, *Angewandte Chemie*, 44 (2005) 416-419.
23. W. Zhou, S. Ye, M. Abe, T. Nishida, K. Uosaki, M. Osawa, Y. Sasaki, *European Journal of Chemistry*, 11 (2005) 5040-5054.
24. W. Zhou, y. Zhang, M. Abe, K. Uosaki, M. Osawa. Y. Sasaki, S. Ye, *Langmuir*, 24 (2008) 8027-8035.
25. Y. Zhang, T. Tong, M. Abe, K. Uosaki, M. Osawa, Y. Sasaki, S. Ye, *Journal of Materials Chemistry*, 19 (2009) 261-267.
26. H. E. Toma, A. L. B. Formiga, A. D. P. Alexiou, G. S. Nunes, *Química Nova*, 33, 10 (2010) 2046-2050.
27. G. S. Nunes, A. D. P. Alexiou, H. E. Toma, *Journal of Catalysis*, 260 (2008) 188-192.
28. S. H. Toma, J. J. Santos, R. G. Velho, M. Nakamura, H. E. Toma, K. Araki, *Electrochimica Acta*, 66 (2012) 287-294.
29. M. Itou, Y. Araki, O. Ito, H. Kido, *Inorganic Chemistry*, 45 (2006) 6114-6116.
30. J. Chen, L. Zhang, Z. Chen, L. Gao, M. Abe, Y. Sasaki, *Inorganic Chemistry*, 43 (2004) 1481-1490.
31. F. Dai J. Chen H. Ye, L. Zhang, Z. Chen, *Dalton Transactions*, 32 (2008) 1167-1174.
32. T. Ito, N. Imai, T. Yamaguchi, T. Hamaguchi, C. H. Londergan, C. P. Kubiak, *Angewandte Chemie*, 43 (2004) 1376-1381.
33. H. Zhang, Y. Sasaki, M. Abe, Y. Zhang, S. Ye, M. Osawa, K. Uosaki, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 714–715 (2014) 51–55.
34. H. Zhang, Y. Sasaki, M. Abe, Y. Zhang, S. Ye, M. Osawa, *Journal of*

- Organometallic Chemistry*, 797 (2015) 29-36.
35. J. C. Salsman, S. Ronco, C. H. Londergan, C. P. Kubiak, *Inorganic Chemistry*, 45 (2006) 547-554.
36. J. C. Goeltz, P. C. Kubiak, *Journal of the American Chemical Society*, 132 (2010) 17390-17392.
37. F. Dai, Y. Wu, L. Zhang, B. Li, L. Shi, Z. Chen, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2011) 2306-2316.
38. R. Matsuse, M. Abe, Y. Tomiyasu, A. Inatomi, H. Yonemura, S. Yamada, Y. Hisaeda, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 23 (2013) 136-146.
39. B. J. Lear, C. P. Kubiak, *Inorganic Chemistry*, 45 (2006) 7041-7043.
40. A. L. B. Formiga, A. F. Nogueira, K. Araki, H. E. Toma, *New Journal of Chemistry*, 32 (2008) 1167-1174.
41. M. Itou, M. Otake, Y. Araki, O. Ito, H. Kido, *Inorganic Chemistry*, 44 (2005) 1580-1587.
42. S. Nikolaou, D. M. Tomazela, M. N. Eberlin, H. E. Toma, *Transition Metal Chemistry*, 33 (2008) 1059-1065.
43. S. Nikolaou, H. E. Toma, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2008) 2266-2271.
44. S. Nikolaou, A. L. B. Formiga, H. E. Toma, *Inorganic Chemistry Communications*, 13 (2010) 1032-1035.
45. S. Nikolaou, S. H. Toma, V. R. Souza, J. B. Alves, K. Araki, H. E. Toma, *Transition Metal Chemistry*, 36 (2011) 775-783.
46. S. H. Toma, J. J. Santos, K. Araki, H. E. Toma, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2011) 1640-1648.
47. S. H. Toma, H. E. Toma, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 1628-1632.
48. D. Akashi, H. Kido, M. Abe, Y. Sasaki, T. Ito. *Dalton Transactions* (2004) 2883-2889.
49. S. Ye, W. Zhou, M. Abe, T. Nishida, T. Cui, K. Uosaki, M. Osawa, Y. Sasaki, Y. Sasaki, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004) 7434-7435.
50. R. Alberto, R. Motterline, *Dalton Transactions*, (2007) 1651-1660.

51. A. Marazioti, M. Bucci, C. Coletta, V. Vellecco, P. Baskaran, C. Szabó, G. Cirino, A. R. Marques, B. Guerreiro, A.M L. Gonçalves, J. D. Seixas, A. Beuve, C. C. Romão, A. Papapetropoulos, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 31 (2011) 2570-2576.
52. R. Foresti, M. G. Bani-Hani, R. Motterlini, *Intensive Care Med*, 34 (2008) 649-658.
53. L. Wu, R. Wang, *Pharmacological Reviews*, 57 (2005) 585-630.
54. L. Rochette, Y. Cottin, M. Zeller, C. Vergely, *Pharmacology & Therapeutics*, 137 (2013) 133-152.
55. R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9 (2010) 728-743.
56. G. L. Miessler, D. A. Tarr, *Inorganic Chemistry*, Ed. Pearson, 1991, p.136.
57. C. J. Jones, *A Química dos elementos dos blocos d e f*, Ed. Bookman, 2002, p. 130.
58. B. P. Espósito, *Interações de Complexos de Ródio (II) com Albumina Humana*. Tese de Doutorado- IQ-USP, 2000.
59. A. Levina, A. Mitra, P. A. Lay, *Metallomics*, 1 (2009) 458-470.
60. N. Cacita, S. Nikolaou, *Journal of Luminescence*, 169 (2016) 115–120.
61. F. C. C. Reis, J. S. V. Coelho, W. M. Pazin, S. Nikolaou, *Inorganic Chemistry Communications*, 63 (2016) 96–100.
62. A. Iovescu, A. Baran, G. Stinga, A. R. Cantemir-Leontieș, M. E. Maxim, D. F. Anghel, *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 153 (2015) 198–205.
63. X. M. He, D. C. Carter, *Nature*, 358 (1992) 209-215.
64. D. C. Carter, J. X. Ho, *Advances in Protein Chemistry*, 45 (1994) 153-203.
65. Y. Ni, S. Su, S. K. *Spectrochimica Acta Part A*, 75 (2010) 547-552.
66. Z. Wang, J. X. Ho, J. R. Ruble, J. Rose , F. Rüker, M. Ellenburg, R. Murphy, J. Click, E. Soistman, L. Wilkerson, D. C. Carter, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (2013) 5356–5374.
67. T. Peters Jr, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Elsevier Inc, 1995.
68. G. Fanali, A. Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (2012) 209–290.

69. M. J. Geisow, G. H. Beaven, *Biochemical Journal*, 161 (1977) 619-625.
70. M. B. Moreira, D. S. Franciscato, K. C. F. Toledo, J. R. B. Souza, H. S. Nakatani, V. R. Souza, *Química Nova*, 38, 2 (2015) 227-232.
71. R. Liu, X. Yu, W. Gao, D. Ji, F. Yang, X. Li, J. Chen, H. Tao, H. Huang, P. Yi, *Spectrochimica Acta Part A*, 78 (2011) 1535-1539.
72. Y. Zhang, A. Ho, J. Y. L. Kong, Z. Zhou, X. Wu, F. Yang, H. Liang, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86 (2014) 449-455.
73. N. Shahabadi, M. Falsafi, S. Hadidi, *Journal of Luminescence*, 167 (2015) 339-346.
74. J. I. Gowda, S. T. Nandibewoor, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124 (2014) 397-403.
75. K. Wiglusz, L. Trynda-Lemiesz, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 289 (2014) 1-6.
76. R. L. S. R. Santos, R. N. F. Sanches, D. O. Silva, *Journal of Coordination Chemistry*, 68 (2015) 17-18.
77. K. Yamasaki, V. T. G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 5435-5443.
78. W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (2013) 5444-5455.
79. V. C. Silveira, M. P. Abbott, M. Cavicchioli, M. B. Gonçalves, H. M. Petrilli, L. Rezende, A. T. Amaral, D. E. P. Fonseca, G. F. Caramoric, A. M. C. Ferreira, *Dalton Transactions*, 42 (2013) 6386-6396.
80. L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, *Free Radical Biology and Medicine*, 65 (2013) 244-253.
81. T. W. Evans, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16 (2002) 6-11.
82. M. Anraku, V. T. G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (2013) 5465-5472.
83. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124 (2013) 1-19.
84. S. Tabassum, M. Ahmad, M. Afzal, M. Zaki, P. K. Bharadwaj, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140 (2014) 321-331.
85. Z. Kazemi, H. A. Rudbari, V. Mirkhani, M. Sahihi, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, I. Mohammadpoor-Baltork, *Journal of Molecular Structure*

- 1096 (2015) 110–120.
86. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576 (2015) 49–60.
87. M. A. Rizvi, M. Zaki, M. Afzal, M. Mane, M. Kumar, B. A. Shah, S. Srivastav, S. Srikrishna, G. M. Peerzada, S. Tabassum, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90 (2015) 876–888.
88. T. P. Camargo, *Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de Fe III Zn II a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucleicos*, Tese de Doutorado, UFSC, 2013.
89. A. P. S. Fontes, S. G. Almeida, A. L. Nader, *Química Nova*, 4, 20 (1997) 398–406.
90. www.rcsb.org, (Protein Data Bank- Acesso em 10/02/2016).
91. P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, E. Jayanthi, R. R. Butorac, A. H. Cowley, N. Dharmaraj, *Inorganica Chimica Acta*, 384 (2012) 83–96.
92. A. Naseri, S. Hosseini, F. Rasoulzadeh, M. Rashidi, M. Zakery, T. Khayamian, *Journal of Luminescence*, 157 (2015) 104–112.
93. M. Saeidifar, H. Mansouri-Torshizi, A. A. Saboury, *Journal of Luminescence*, 167 (2015) 391–398.
94. X. Chen, K. Qian, Q. Chen, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93 (2015) 492–500.
95. L. G. Naso, M. Valcarcel, M. Roura-Ferrer, D. Kortazar, C. Salado, L. Lezama, T. Rojo, A. C. González-Baró, P. A. M. Williams, E. G. Ferrer, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 135 (2014) 86–99.
96. L. Tabrizi, P. McArdle, A. Erxleben, H. Chiniforoshan, *European Journal of Medicinal Chemistry* 103 (2015) 516–529.
97. M. Hasanzadeh, N. Shadjouc, *Materials Science and Engineering C*, 61 (2016) 1002–1017.
98. A. P. S. Fontes, E. T. Cesar, H. Beraldo, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 6 (2005) 13–18.
99. V. L. Almeida, A. Leitão, L. C. B. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, M. T. P. Lopes, *Química Nova*, 28, 1 (2005) 118–129.
100. L. L. Silva, C. L. Donnici, J. C. D. Lopes, M. O. F. Goulart, F. C. Abreu, F. S. Paula, C. E. S. Bravo, M. M. Santoro, A. M. L. Denadai, A. M. C. Santos,

- C. A. Montanari, *Química. Nova*, 35, 7 (2012) 1318-1324.
101. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> (acesso em 25/04/2016)
102. B. P. Esposito, R. Najjar, *Coordination Chemistry Reviews*, 232 (2002) 137-149.
103. N. Graf, S. J. Lippard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 993–1004.
104. F. Trudu, F. Amato, P. Vanhara, T. Pivetta, E. M. Peña-Méndez, J. Havel, *Journal of Applied Biomedicine*, 13 (2015) 79 – 103.
105. A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J.H. Beijnem, G. Sava, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106 (2012) 90-99.
106. M. J. Clarke, *Coordination Chemistry Reviews*, 232 (2002) 69-93.
107. M. J. Clarke, *Coordination Chemistry Reviews*, 236 (2003) 209-233.
108. G. Sava, S. Pacor, A. Bergamo, M. Cocchietto, G. Mestroni, E. Alessio. *Chemico-Biological Interactions*, 95 (1995) 109-126.
109. F. Kratz, B. K. Keppler, M. Hartmann, L. Messori, M.R. Berger, *Metal-Based Drugs*, 3 (1996) 15-23.
110. F. G. Vilchez, R. Vilaplana, G. Blasco, L. Messori, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 71 (1998) 45-51.
111. R. P. Paitandi, R. K. Gupta, R. S. Singh, G. Sharma, B. Koch, D. S. Pandey, *European Journal of Medicinal Chemistry* 84 (2014) 17-29.
112. R. S. Correa, K. M. Oliveira, F. G. Delolo, A. Alvarez, R. Mocelo, A. M. Plutin, M. R. Cominetti, E. E. Castellano, A. A. Batista, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 150 (2015) 63–71.
113. I. N. F. Stepanenko, A. Casini, F. Edafe, M. S. Novak, V. B. Arion, P. J. Dyson, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Inorganic Chemistry*, 50 (2011) 12669-12679.
114. A. A. Nazarov, M. Baquie, P. Nowak-Sliwinska, O. Zava, J. R. Beijnum, M. Groess, D. M. Chisholm, Z. Ahmadi, J. S. McIndo, A. W. Griffioen, H. Bergh, P. J. Dyson, *Scientific Reports Nature*, 3, 1485 (2013) 1-7.
115. G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M.R. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa. *Clinical Cancer Research*, 9 (2003) 1898-1905.
116. L. Messori, P. Orioli, D. Vullo, E. Vullo, E. Alessio, E. Lengo, *European Journal of Biochemistry*, 267 (2000) 1206-1213.

117. A. Martínez, J. Suárez, T. Shand, R. S. Magliozzo, R. A. Sánchez-Delgado, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (2011) 39–45.
118. C. Kasper, H. Alborzinia, S. Can, I. Kitanovic, A. Meyer, Y. Geldmacher, M. Oleszak, I. Ott, S. Wölfl, W. S. Sheldrick, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106 (2012) 126–133.
119. Z. A. Carneiro, J. C. Biazotto, A. D. P. Alexiou, S. Nikolaou, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 134 (2014) 36–38.
120. R. S. Correa, K. M. Oliveira, F. G. Delolo, A. Alvarez, R. Mocelo, A. M. Plutin, M. R. Cominetti, E. E. Castellano, A. A. Batista, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 150 (2015) 63–71.
121. L. B. Negri, *Complexos rutênio-ftalocianinas como fotosensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos*. Dissertação de mestrado, FCFRP-USP, 2015.
122. P. J. Barnard, R. S. Vagg, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99 (2005) 1009–1017.
123. J. Grau, V. Noe, C. Ciudad, M. J. Prieto, M. Font-Bardia, T. Calvet, V. Moreno, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109 (2012) 72–81.
124. C. L. Donnici, M. H. Araújo, H. S. Oliveira, D. R. M. Moreira, V. R. A. Pereira, M. A. Souza, M. C. A. B. Castro, A. C. L. Leite, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (2009) 5038–5043.
125. G. C. Seuanes, M. B. Moreira, T. Petta, M. P. F. M. Del Lama, L. A. B. Moraes, A. R. M. Oliveira, R. M. Z. G. Naal, S. Nikolaou, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153 (2015) 178–185.
126. M. G. Sauaia, R. S. Silva, *Transition Metal Chemistry*, 28, 3 (2003) 254.
127. N. Cacita, B. Possato, C. F.N. Silva, M. Paulo, A. L. B. Formiga, L. M. Bendhack, S. Nikolaou, *Inorganica Chimica Acta*, 429 (2015) 114–121.
128. D. C. A. S. Santana, T. T. Pupo, M. G. Sauaia, R. S. Silva, R. F. V. Lopez, *International Journal of Pharmaceutics*, 391 (2010) 21–28.
129. D. Gambino, L. Otero, *Inorganica Chimica Acta* 393 (2012) 103–114.

130. M. Navarro, C. Gabbiani, L. Messori, D. Gambino, *Drug Discovery Today*, 15, 23/24 (2010) 1070-1078.
131. Z. A. Carneiro, *Avaliação de atividade tripanocida in vitro e in vivo do composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) em meio aquoso e em sistema de liberação de droga*, Tese de Doutorado, FCFRP-USP, 2015.
132. J. Clayton, Chagas Disease 101. *Nature*, 465 (2010) 4-5.
133. P. Faral-Tello, M. Liang, G. Mahler, P. Wipf, C. Robello, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43 (2014) 262–268.
134. R. O. A. Soares, A. Echevarria, M. S. S. Bellieny, R. T. Pinho, R. M. M. Leo, W. S. Seguins, G. M. Machado, M. M. Canto-Cavalheiro, L. L. Leon, *Experimental Parasitology*, 129 (2011) 381–387.
135. L. C. Dias, M. A. Dessoy, R. V. C. Guido, G. Oliva, A. D. Andricopulo, *Química Nova*, 36, 10 (2013) 1552-1556.
136. D. G. J. Batista, P. B. Silva, D. R. Lachter, R. S. Silva, R. Q. Aucelio, S. R. W. Louro, H. Beraldo, M. N. C. Soeiro, L. R. Teixeira, *Polyhedron*, 29 (2010) 2232–2238.
137. A. M. Silva, P. G. Cerqueira, V. G. Silva, F. R. Gadelha, E. F. do Peloso, S. M. R. Teixeira, C. R. Machado, *Mutation Research*, 767 (2016) 8–22.
138. D. Santos, B. Parajón-Costa, M. Rossi, F. Caruso, D. Benítez, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, N. Gómez, M. E. Caputto, A. G. Moglioni, G. Y. Moltrasio, L. M. Finkielstein, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117 (2012) 270–276.
139. L. C. Dias, M. A. Dessoy, J. J. N. Silva, O. H. Thiemann, G. Oliva, A. D. Andricopulo, *Química Nova*, 32, 9 (2009) 2444-2457.
140. A. R. P. Ambrozini, P. C. Vieira, J. B. Fernandes, M. F. Graças, F. Silva, S. Albuquerque, *Química Nova*, 31, 4 (2008) 740-743.
141. A. M. A. Velásquez, A. I. Francisco, A. A. N. Kohatsu, F. A. J. Silva, D. F. Rodrigues, R. G. S. Teixeira, B. G. Chiari, M. G. J. Almeida, V. L. B. Isaac, M. D. Vargas, R. M. B. Cicarelli, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 (2014) 1707–1710.

142. A. Casini, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109 (2012) 97-106.
143. H. Beraldo, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 6 (2005) 4-6.
144. D. G. J. Batista, P. B. Silva, L. Stivanin, D. R. Lachter, R. S. Silva, J. Felcman, S. R. W. Louro, L. R. Teixeira, M. N. C. Soeiro, *Polyhedron*, 30 (2011) 1718–1725.
145. L. Becco, A. Rodríguez, M. E. Bravo, M. J. Prieto, L. Ruiz-Azuara, B. Garat, V. Moreno, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109 (2012) 49–56.
146. M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. D. Maya, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103 (2009) 411–418.
147. B. Demoro, F. Caruso, M. Rossi, D. Benítez, M. Gonzalez, H. Cerecetto, B. Parajón-Costa, J. Castiglioni, M. Galizzi, R. Docampo, L. Otero, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104 (2010) 1252–1258.
148. J. C. Pessoa, S. Etcheverry, D. Gambino, *Coordination Chemistry Reviews*, 301–302 (2015) 24–48.
149. G. Scalese, J. Benítez, S. Rostán, I. Correia, L. Bradford, M. Vieites, L. Minini, A. Merlino, E. L. Coitiño, E. Birriel, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, J. C. Pessoa, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 147 (2015) 116–125.
150. R. S. Corrêa, M. M. Silva, A. E. Graminha, C. S. Meira, J. A. F. Santos, D. R.M. Moreira, M. B. P. Soares, G. V. Poelhsitz, E. E. Castellano, C. Bloch Jr, M. R. Cominetti, A. A. Batista, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 156 (2016) 153–163.
151. D. J. Feld, H. Hsu, A. L. Eckermann, T. J. Meade, *Langmuir*, 28 (2012) 939-949.
152. J. Tauchman, L. E. H. Paul, J. Furrer, B. Therrien, G. Süss-Fink, *Inorganica Chimica Acta*, 423 (2014) 16–20.
153. M. Liu, Z. J. Lim, Y. Y. Gwee, A. Levina, P. A. Lay, *Angewandte. Chemie. International*, 49 (2010) 1661 –1664.

154. H. J. Kuhn, S. E. Braslavsky, R. Schmidt, *Pure and Applied Chemistry Pure and Applied Chemistry*, 76 (2004) 2105-2146.
155. J. A. Baumann, D. J. Salmon, S. T. Wilson, T. J. Meyer, W. E. Hatfield, *Inorganic Chemistry*, 17 (1978) 3342-3350.
156. A. Inatomi, M. Abe, Y. Hisaeda, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2009) 4830-4836.
157. K. Ota, H. Sasaki, T. Matsui, T. Hamaguchi, T. Yamaguchi, T. Ito, H. Kido, C. P. Kubiak, *Inorganic Chemistry*, 38 (1999) 4070-4078.
158. H. Ohtsu, N. Oka, T. Yamaguchi, *Inorgânica Chimica Acta*, 383 (2012) 1-6.
159. A. D. P. Alexiou, H. E. Toma, *Journal of Chemical Research* (1997) 338-339.
- 160 C. J. Cunha, *Correlações Espectroscópicas e Eletroquímicas em Clusters Trigonais de Rutênio com ligantes N-heterocíclicos*, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 1989.
161. H. E. Toma, A. D. P. Alexiou, A. L. B. Formiga, M. Nakamura, S. Dovidauskas, M. N. Eberlin, D. M. Tomazela, *Inorganica Chimica Acta*, 358 (2005) 2891-2899.
162. C. F. N da Silva, *Investigação comparativa da liberação controlada de CO e NO por carboxilatos trinucleares de rutênio contendo ligantes π -receptor e σ -doador*, Dissertação de Mestrado, FFCLRP, Universidade de São Paulo, 2015.
163. F. A. Cotton, J. G. Norman, *Inorganica Chimica Acta* 6 (1972) 411 – 419.
164. H. Zhang, Y. Sasaki, Y. Zhang, S. Ye, M. Osawa, M. Abe, K. Uosaki, *Inorganic. Chemistry*, 53 (2014) 1288-1294.
165. C. H. Londergan, C.P. Kubiak, *The Journal of Physical Chemistry A*, 107 (2003) 9301-9311.
166. D. F. Shriver, P. Atkins, *Química Inorgânica*, 4ªEdição, Bookman, Porto Alegre, 2008.
167. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and CoordinationCompounds*. 5th ed. John Wiley & Sons INC, 1997.

168. A. D. P. Alexiou, *Síntese Caracterização e Reatividade de Clusters Trigonais de Acetato de Rutênio*, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 1993.
169. J. Chen, X. Zhang, L. Zhang, L. Shi, Z. Chen, *Inorganic Chemistry*, 44 (2005) 1037-1043.
170. F. J. Rabek, *Experimental methods in photochemistry and photophysics*, John Wiley and Sons, New York, 1982.
171. S. M. T. Shaikh, J. Seetharamappa, S. Ashoka, P. B. Kandal, *Dyes and Pigment*, 73 (2007) 211.
172. T. D. Tullius, *Metal-DNA Chemistry*, American Chemical Society, Washigton, 1989.
173. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Springer Science, 2006.
174. M. Takara, *Propriedades Ópticas de Absorção e Emissão Fluorescente do Ácido orto-Aminobenzóico e seus Derivados em meio solvente*, Tese de Doutorado, FFCLRP-USP, 2006.
175. S. M. T. Shaikh, J. Seetharamappa, S. Ashoka, P. B. Kandal, *Dyes and Pigment*, 73 (2007) 211.
176. A. Divsalar, M. J. Bagheri, A. A. Saboury, H. M.-Torshizi, M. Amani, *Journal of Physical Chemistry B*, 113 (2009) 14035-14042.
177. S. S. Kalanur, J. Seetharamappa, V. K. A. Kalalbandi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (2010) 660-666.
178. E. Lissi, C. Calder, A. Campos, *Photochemistry and Photobiology*, 89 (2013) 1413–1416.
179. X. Yu, S. Lu, Y. Yang, X. Li, P. Yi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 91 (2012) 113-117.

180. R. Liu, X. Yu, W. Gao, D. Ji, F. Yang, X. Li, J. Chen, H. Tao, H. Huang, P. Yi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78 (2011) 1535-1539.
181. F. Ding, J. Huang, J. Lin, Z. Li, F. Liu, Z. Jiang, Y. Sun. *Dyes and Pigments*, 82 (2009) 65-70.
182. P. D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry*, 20 (1981) 3096-3102.
183. F. C. C. Reis, *Investigação Química de coordenação de antibióticos enrofloxacina e norfloxacina combinados ao íons Ru (III) e suas interações com biomoléculas alvo*, Dissertação de mestrado, FFCLRP-USP, 2014.
184. J. Jayabharathi, V. Thanikachalan, M. Perumal, *Spectrochimica Acta Part A*, 79 (2011) 502-507.
185. D. W. Ball, *Físico-Química*, vol 2, Editora Pioneira Thomson Learnin, 2005.
186. M. B. Pessuto, I.C. da Costa, A. B. de Souza, F. M. Nicoli, J. C. P. de Mello, F. Petereit, H. Luftmann, *Química Nova*, 32,2, (2009) 412-416.
187. A. M. Montaña, F. J. Bernal, J. Lorenzo, C. Farnós, C. Batalla, M. J. Prieto, V. Moreno, F. X. Avilés, J. M. Mesas, M. T. Alegre, *Bioorganic and medicinal Chemistry*, 16 (2008) 1721-1737.
188. M. L. Barreiros, J. M. David, J. P. David, *Química Nova*, 28, 6 (2005) 1061-1065.
189. G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York, 1996.
190. H. A. Havel, *Spectroscopic Methods For Determining Protein Structure In Solution*, Wiley-VCH, New York, 1995.
191. V. C. Silveira, G. F. Caramori, M. P. Abbott, M. B. Gonçalves, H. M. Petrilli, A. M. C. Ferreira, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103 (2009) 1331-1341.
192. D. Voet, J. G. Voet, *Bioquímica*, 3ª Ed, Artmed: Porto Alegre, 2006.

193. X. Fu, Z. Lin, H. Liu, X. Le, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122 (2014) 22–33.
194. X. Fu, G. Wenga, D. Liu, X. Le, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 276 (2014) 83–95.
195. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124 (2013) 1–19.
196. N. Selvakumaran, N. S. P. Bhuvanesh, A. Endo, R. Karvembu, *Polyhedron* 75 (2014) 95–109.
197. Z. Kazemi, H. A. Rudbari, V. Mirkhani, M. Sahihi, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, I. Mohammadpoor-Baltork, *Journal of Molecular Structure* 1096 (2015) 110–120.
198. H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *Journal American of. Chemical Society*, 71 (1949) 2703.
199. M. K. Tanimoto, K. Dias, S. Dovidauskas, S. Nikolaou, *Journal of Coordination Chemistry*, 65, 9 (2012) 1504–1517.
200. W. Wang, J. B. Xiao, M. Adachi, Z. Liu, J. Zhou, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28 (2011) 199–208.
201. B. Nilius, W. Wohlrab, *Journal of Physiology*, 445 (1992) 537–548.