Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

"$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$: síntese, caracterização, cinética de troca de ligantes, comparação com complexo análogo e estudos biológicos"

Felipe Costa Claro Reis

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**

Orientadora: Profa. Dra. Sofia Nikolaou

Co-Orientador: Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO -SP

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Felipe Costa Claro
"$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2(PF_6)_2$: síntese, caracterização, cinética de troca de ligantes, comparação com complexo análogo e estudos biológicos" Ribeirão Preto, 2018.
216p.: il.; 30cm

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

1. Complexo Binuclear de Rutênio. 2. 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina. 3. Cinética de troca de ligantes. 4.Interação com HSA. 5. Stern-Volmer. 6.DNA. 7. Benesi-Hildebrand.

Nome: REIS, Felipe Costa Claro

Título: $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$: síntese, caracterização, cinética de troca de ligantes, comparação com complexo análogo e estudos biológicos.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências

e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,

para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr.:_____Instituição:_____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof.Dr.:_____Instituição:_____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof.Dr.:_____Instituição:_____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof.Dr.:_____Instituição:_____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof.Dr.:_____Instituição:_____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Agradecimentos

Seria impossível começar os agradecimentos sem mencionar a Professora Dra. Sofia Nikolaou. Orientadora que me acompanha desde o mestrado e seguiu comigo até o final da conclusão desta tese. Acredito que você não tenha muita ideia de como seu suporte foi importante nos momentos em que meu psicológico parecia não mais responder as minhas vontades e você me disse para ficar despreocupado e que tudo daria certo no final, e realmente deu. Foi totalmente compreensiva no momento que tive me afastar do laboratório por meses devido a problemas de saúde, sempre dizendo que minha saúde valia mais do que qualquer doutorado ou artigo. Escrevo esse agradecimento já com saudades das discussões sobre política, séries, filmes, livros, tatuagens além das discussões científicas. Aprendi a ter uma certa independência durante a execução dos experimentos de doutorado, sempre ouvi que o trabalho era meu e eu que deveria conduzi-lo como achasse melhor, mas sempre muito bem resguardado por todo seu conhecimento. Enfim, sou muito grato pela oportunidade, lições, puxões de orelha, por todas as nossas conversas e por ajudar no meu processo de amadurecimento e formação científica.

Ao Professor Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira pela co-orientação, todo ensinamento em uma área totalmente nova para mim e pelo uso dos equipamentos do laboratório.

Ao Professor Dr. Roberto Santana da Silva pelas discussões acadêmicas e pelo uso dos equipamentos e espaço de seu laboratório.

Aos Professores Dr. Amando Siuiti Ito, Dr. Zeeki Naal, Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal e Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira pelo uso dos equipamentos do laboratório.

Ao Professor Dr. André Luiz Barboza Formiga pela realização de medidas de Raio-X.

À Dra. Loyanne Ramos pelos experimentos de citotoxicidade e também pelos anos de amizade.

À técnica Maria Perpétua Freire de Morais Del Lama pelos experimentos de alergia.

À Ms. Nayara Cristina Perez de Albuquerque pela ajuda nos experimentos envolvendo HPLC e também por ser tão prestativa e me auxiliar no uso de um equipamento totalmente novo para mim.

Ao Dr. Miquéias Ferreira Gomes e Dra. Pâmela Oliveira Martins Gomes pela ajuda nas medidas de voltametria cíclica.

À Dra. Bruna Possato por toda sabedoria e amizade de anos, você pode não ter ideia, mas eu aprendi muito com você.

Á Dra. Natacha Cacita Pietro pela amizade de muitos anos e que espero levar para vida inteira.

Á Ms. Camila Fontes Neves da Silva por me ajudar sempre que precisei e nunca me dizer um não em 6 anos de amizade.

Aos meus amigos de grupo Gaby, Natália, Pedro, Douglas, Sâmya e Ricardo pelo apoio, conversas, almoços, bares, momentos de descontração, com vocês o doutorado ficou muito mais leve.

À Roberta, Carol e Lari por serem companheiras tanto dentro quando fora do laboratório e tenho certeza que serão amigas para vida.

Aos amigos de laboratório Elo, João, André, Alexia, Renatinha, Tássia, Jacqueline e Laísa.

A todos meus amigos de Jaboticabal e Ribeirão Preto pelas risadas e descontração nos momentos de desespero.

Por último, mas com certeza não menos importante, agradeço ao meu pai, mãe e irmão. Com certeza, sou quem eu sou e realizei tudo isso até hoje graças a vocês. Agradeço também toda minha família, que estão juntos comigo desde sempre e para sempre.

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

“A ignorância afirma ou nega veementemente. A ciência duvida.”

Voltaire

“Acho que fiz tudo do melhor jeito, meio torto, talvez, mas tenho tentado da maneira mais bonita que sei.”

Caio Fernando Abreu

Resumo

Este trabalho foi baseado na síntese e caracterização de um complexo binuclear de rutênio (III) com ponte µ-oxo inédito, combinado aos ligantes piridina (C_5H_5N, py) e 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina ($C_9H_{11}N$, THIQ), de formulação $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. Foram realizados estudos cinéticos de troca dos ligantes THIQ *trans* a ponte µ-oxo por diferentes solventes (água, metanol e acetonitrila) e também por piridina. Os resultados mostraram que os complexos binucleares de rutênio apresentam uma grande labilidade frente à água e metanol. É sabido que o complexo análogo trinuclear de rutênio de formulação $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]PF_6$ é inerte frente a substituição de seus ligantes. Então, propôs-se nesse trabalho investigar se a nuclearidade dos complexos bi- e trinucleares impacta na atividade anticâncer e nas suas interações com as biomoléculas albumina do soro humano (HSA) e DNA; ou ainda se esta atividade está unicamente relacionada ao ligante THIQ. A caracterização do complexo sintetizado foi feita por espectrometria de massas, espectroscopias de UV-visível, infravermelho e RMN e voltametria cíclica. Foi possível a obtenção de cristais do complexo sendo exequível determinar sua estrutura cristalina por difração de raios-X, que confirmou que a ligação dos ligantes THIQ *trans* à ponte µ-oxo são maiores (2.151 e 2.145 Å) que as ligações das piridinas (2.086, 2.087, 2.087 e 2.084 Å). Estudos de interação com HSA mostraram que ambos os mecanismos (estático e dinâmico) são responsáveis pela supressão de fluorescência da albumina. O tratamento termodinâmico mostrou que a interação predominante entre o complexo supressor e HSA é do tipo eletrostático ($\Delta H<0$, $\Delta S>0$ e $\Delta G<0$). Estudos do tempo de vida mostraram diminuição do tempo de vida do estado excitado da HSA, o que demonstra que o mecanismo principal de supressão seja o dinâmico. Estudos de interação com o *fs*-DNA também mostraram que o tipo predominante de interação entre a biomolécula e o complexo é eletrostático. O estudo do potencial citotóxico frente às células de melanoma murinho B16F10 mostrou que o complexo trinuclear, que é inerte e mantêm os ligantes THIQ coordenados, apresenta uma maior citotoxicidade em comparação com o análogo binuclear. O estudo da atividade antialérgica mostra que o complexo não produz alergia assim como o complexo binuclear $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6].(PF_6)_2$. Esta capacidade muito provavelmente está relacionada ao ligantes e não à unidade $[Ru_2O]$.

Palavras chave: Complexo Binuclear de Rutênio. 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina. Cinética de troca de ligantes. Interação com HSA. Stern-Volmer. DNA. Benesi-Hildebrand.

Abstract

This work was based on the synthesis and characterization of a novel ruthenium (III) binuclear complex with μ-oxo bridge, combined with the ligands pyridine (C_5H_5N, py) and 5,6,7,8-tetrahydroisoquinoline ($C_9H_{11}N$, THIQ) $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. Kinetic studies were performed on the exchange of THIQ ligands *trans* to the μ-oxo bridge by different solvents (water, methanol and acetonitrile) and also by pyridine. The results showed that the ruthenium binuclear complex presents a great lability in water and methanol. It is known that the trinuclear analogue $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]PF_6$ is inert to the substitution of the ligands. This work was to investigate whether the nuclearity of bi- and trinuclear complexes affect the anticancer activity and its interactions with human serum albumin (HSA) and DNA biomolecules; or if this activity is solely related to the THIQ ligand. The characterization of the synthesized complex was done by mass spectrometry, UV-visible, infrared and NMR spectroscopy and cyclic voltammetry. It was possible to obtain crystals of the complex being able to determine its crystalline structure by X-ray diffraction, which confirmed that the bond of the THIQ *trans* to the μ-oxo bridge are longer (2,151 and 2,145 Å) than that of pyridine (2,086, 2,087, 2,087 and 2,084 Å). Interaction studies with HSA showed that both mechanisms (static and dynamic) are responsible for the quenching of albumin fluorescence. The thermodynamic treatment showed that the predominant interaction between the suppressor complex and HSA is electrostatic type ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ and $\Delta G < 0$). Life-time studies have shown decreased lifetimes of HSA excited state, which demonstrates that the main mechanism of suppression is dynamic. Interaction studies with *fs*-DNA have also shown that the predominant interaction type between the biomolecule and the complex is electrostatic. The study of the cytotoxic potential toward murine melanoma B16F10 cells showed that the trinuclear complex, which is inert and maintains the coordinated THIQ ligands, shows a higher cytotoxicity compared to the binuclear analogue. The study of antiallergic activity shows that the complex does not produce allergy as well as the binuclear complex $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$, this capacity is most likely related to the ligand not to the $[Ru_2O]$ unit.

Keywords: Ruthenium Binuclear Complex. 5,6,7,8-tetrahydroisoquinoline. Kinetics of ligand exchange. Interaction with HSA. Stern-Volmer. DNA. Benesi-Hildebrand.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas dos complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (à esquerda, este trabalho) e $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$ (à direita, [2])..... 27
Figura 2: Estrutura de um complexo de fórmula geral $[Ru_2(\mu\text{-}O)(RCOO)_2(L)_6]^n$ (à esquerda) e dos ligantes (à direita). 27
Figura 3: Tabela Periódica dos Elementos. 29
Figura 4: Esquema de ativação da cisplatina. 31
Figura 5: Esquema simplificado que diferencia uma célula saudável (esquerda) de uma célula cancerígena (direita). 33
Figura 6: Representação dos complexos hexa-amino $CoCl_3{\cdot}6NH_3$, penta-amino $CoCl_3{\cdot}5NH_3$, tetra-amino $CoCl_3{\cdot}4NH_3$ e tris-amino $CoCl_3{\cdot}3NH_3$ segundo a Teoria de Blomstrand-Jörgensen. 34
Figura 7: Estrutura dos complexos cis-$[Co(NH_3)_4Cl_2]^+$ (à esquerda) e trans-$[Co(NH_3)_4Cl_2]^+$ (à direita) 36
Figura 8: Estrutura do NAMI-A (à esquerda) e do KP1019 (à direita). 41
Figura 9: À esquerda a molécula de Desoxi-hemeritrina, à direita a molécula de Oxi-hemeritrina quando ligada a molécula de O_2. 42
Figura 10: Estrutura da quinolina. 43
Figura 11: Estrutura da HSA. 47
Figura 12: Representação da estrutura do DNA. 47
Figura 13: Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA. 48
Figura 14: Perfil do gráfico obtido para um mecanismo de supressão de fluorescência puramente dinâmico. 64
Figura 15: Perfil do gráfico obtido para um mecanismo de supressão de fluorescência puramente estático. 67
Figura 16: Perfil do gráfico obtido para supressão de fluorescência a partir dos dois mecanismos: estático e dinâmico. 68
Figura 17: Estrutura do complexo percursor sintetizado evidenciando a chamada unidade $[Ru_2O]$. 81
Figura 18: Espectro de absorção na região do UV-vis evidenciando a formação da unidade $[Ru_2O]$, em acetonitrila. 81

Figura 19: Espectro de absorção na região do UV-vis do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$. 82
Figura 20: Espectro eletrônico do produto obtido na ausência de água. 83
Figura 21: Estrutura do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ a partir de medidas de Raios-X. 85
Figura 22: Espectro de massas do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. 88
Figura 23: Distribuição isotópica obtida para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. 89
Figura 24: Espectro de massas do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, antes da purificação. 90
Figura 25: Correntes de anel e linhas de força induzidas para a molécula do benzeno. 91
Figura 26: Complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$, com destaque para os hidrogênios em cores diferentes 92
Figura 27: Espectro de ^{1}H-RMN (acima) e COSY (abaixo) do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$, obtido de uma solução 10^{-2} M em acetonitrila-d_3. 93
Figura 28: Esquema qualitativo dos orbitais moleculares para as interações Ru-O-Ru. 97
Figura 29: Esquema qualitativo dos orbitais moleculares envolvidos nas interações entre Ru(dπ)-O-(pπ) em relação a formação curvada da unidade Ru-O-Ru. 98
Figura 30: Espectro eletrônico para o os complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (em preto) e $[Ru_2O(CH_3COO)_2(S)_6]^{2+}$ (em vermelho), em acetonitrila. 99
Figura 31: Espectro eletrônico do $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ antes purificação, em acetonitrila. 101
Figura 32: Modos de coordenação do íon carboxilato. 103
Figura 33: Espectro de infravermelho do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(C_9H_{11}N)_2](PF_6)_2$ obtido em pastilha de KBr, na região de 4000 - 400 cm^{-1}. As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do PF_6^- 105

Figura 34: Voltamograma cíclico do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]$ em acetonitrlia, solução 0,1 mol L^{-1} hexafluorofosfato de amônio à temperatura ambiente. 108
Figura 35: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (6,40 $x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$) em acetonitrila, à 37 ºC. 110
Figura 36: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (1,16 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$) pela piridina em acetonitrila, à 37 ºC. 110
Figura 37: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (1,06 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$) em metanol, à 37 ºC.....111
Figura 38: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (1,16 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$) em água, à 37 ºC. 111
Figura 39: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, obtido de uma solução 10 mM em acetonitrila-d_3 em diferentes tempos de análise. 115
Figura 40: Estudo da influência da temperatura na troca dos ligantes THIQ, em metanol. A. 25 ºC (1,07 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$), B. 31 ºC (1,16 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$), C. 37 ºC (1,06 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$), D. 43 ºC (1,26 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$), E. 49 ºC (1,10 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$). 117
Figura 41: Deconvolução do espectro obtido para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, em metanol, tempo zero, a 37 ºC. 120
Figura 42: Deconvolução do espectro obtido para o complexo formado após 12 horas de experimento, em metanol, A. 25 ºC, B. 31 ºC, C. 37 ºC e D. 43 ºC..122
Figura 43: Variação da intensidade de banda em 585 nm em função do tempo, em diferentes temperaturas. 123
Figura 44: Estudo da influência da temperatura na troca dos ligantes THIQ, em água. A. 25 ºC, B. 31 ºC, C. 37 ºC, D. 43 ºC, E. 49 ºC 127
Figura 45: Deconvolução do espectro obtido para o complexo formado após 12 horas de experimento, em metanol, A. 25 ºC, B. 31 ºC, C. 37 ºC. D. 43 ºC. E. 49 ºC.....128
Figura 46: Variação da intensidade de banda em 580 nm em função do tempo, em diferentes temperaturas. 129

Figura 47: Gráfico de Arrhenius do ln(k_{obs}) versus 1/T, para a reação em estudo. 133
Figura 48: Acompanhamento da troca de ligantes do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em água, a 25 ºC. 135
Figura 49: Curva cinética da reação de troca de ligantes da área do pico em relação ao tempo, em 3 diferentes temperaturas. 137
Figura 50: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 25 ºC; λ_{exc}=280 (A) nm e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}. 142
Figura 51: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 31 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}. 142
Figura 52: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 37 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}. 143
Figura 53: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 43 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}. 143
Figura 54: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 49 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}. 144
Figura 55: Curvas de F_0/F versus concentração do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ com λ_{exc} = 280 e 295 nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49ºC). 145
Figura 56: Curvas de supressão de fluorescência estática e dinâmica em diferentes concentrações do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ com λ_{exc} = 280 e 295 nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49ºC). 147

Figura 57: Gráfico do log[(F_0-F)/F] versus log [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, para λ_{exc} = 280 e 295 nm em diferentes temperaturas de incubação. 151
Figura 58: Curvas da intensidade da fluorescência (F/F_0) em função da razão molar [supressor]/[HSA]para os dois comprimentos de excitação (λ_{exc}= 280 e 295 nm), para as temperaturas de incubação de 25 (A), 31 (B), 37 (C), 43 (D) e 49 ºC (E). 154
Figura 59: Gráfico de van´t Hoff, para excitação em λ_{exc}=280 e 295 nm, em diferentes temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49 ºC). 158
Figura 60: Perfil de decaimento da fluorescência da interação HSA-[$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em tampão tris (pH=7,2), λ_{exc} = 295 nm, à 25 ºC (A), 37 ºC (B) e 49 ºC (C). 161
Figura 61: Dependência do tempo de vida do estado excitado da HSA com o aumento da concentração do complexo [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, para três diferentes temperaturas. 162
Figura 62: Comparação entre o espectro eletrônico do complexo puro e os espectros eletrônicos do sistema [HSA-Ru_2O-complexo], em diferentes temperaturas. 165
Figura 63: Espectro de CD para monitoramento da estrutura secundária da HSA em tampão tris, em diferentes concentrações do complexo [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. 166
Figura 64: Titulação espectrofotométrica, em 25 ºC (A), 31 ºC (B), 37 ºC (C), 43 ºC (D) e 49 ºC (E) do complexo [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (4,2 x10^{-5} mol.L^{-1}) com fs-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. 169
Figura 65: Comparação entre a intensidade da última curva da titulação espectrofotométrica e a concentração equivalente de fs-DNA livre (3,2 x10^{-5} mol.L^{-1}), em 25 ºC (A) e 49 ºC (B). 170
Figura 66: Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ durante a titulação com o fs-DNA, em diferentes temperaturas. 173
Figura 67: Gráfico de van´t Hoff para o complexo [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 260 nm. 173
Figura 68: Representação da reação de redução do MTT à formazan. 175

Figura 69: Viabilidade celular após o tratamento com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (A) e o ligante THIQ (B), em diferentes concentrações frente as células B16F10. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de todos os experimentos realizados. As diferenças foram consideradas com significância de 0,05 com p ≤ 0,05; * (diferente do grupo controle). 176
Figura 70: Viabilidade celular após o tratamento com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (A) e o ligante THIQ (B), em diferentes concentrações frente as células MCF7. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de todos os experimentos realizados. As diferenças foram consideradas com significância de 0,05 com p ≤ 0,05; * (diferente do grupo controle). 177
Figura 71: Viabilidade celular após o tratamento com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (A) e o ligante THIQ (B), em diferentes concentrações sob as células L929. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de todos os experimentos realizados. As diferenças foram consideradas com significância de 0,05 com p ≤ 0,05; * (diferente do grupo controle). 177
Figura 72: Efeito inibitório do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ sobre a desgranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações do complexo, seguido de estímulo celular com antígeno (DNP-BSA, 0,1 µg/mL). Após incubação à 37 ºC por 1 h, as células foram incubadas com MUG 3,6 mM por subsequentes 30 minutos e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem do MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa, as barras de erro representam os desvios padrão para amostras em triplicata de um único experimento. 182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados. 53
Tabela 2: Valores teóricos e obtidos para análise elementar do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. 84
Tabela 3: Dados cristalográficos obtidos pelo refinamento da estrutura do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ 86
Tabela 4: Comprimentos e ângulos das ligações da unidade $[Ru_2O]$, Ru-py e Ru-THIQ. 86
Tabela 5: Relação entre os sinais do espectro de RMN e suas atribuições 95
Tabela 6: Comparação entro os deslocamentos químicos dos complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$ e $[Ru_2O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]^{+}$..... 96
Tabela 7: Atribuições tentativas das transições observadas no espectro UV-vis do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$. 100
Tabela 8: Comparação e atribuições tentativas das transições observadas no espectro UV-vis do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e $[Ru_2O(CH_3COO)_2(THIQ)_3](PF_6)$.....102
Tabela 9: Atribuição tentativa das bandas do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e comparação ao complexo análogo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$.....106
Tabela 10: Valores de $E1_{/2}$ para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ 108
Tabela 11: Valores das constantes de velocidades observadas para diferentes temperaturas. 124
Tabela 12: Valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para diferentes temperaturas. 125
Tabela 13: Valores das constantes de velocidade observadas para diferentes temperaturas. 131
Tabela 14: Valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para diferentes temperaturas. 132
Tabela 15: Valores das constantes de velocidade para diferentes temperaturas. 138
Tabela 16: Valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para diferentes temperaturas. 139

Tabela 17: Constante de supressão de fluorescência (K_{ap}) e constante de velocidade de supressão bimolecular de fluorescência (k_q), para diferentes temperaturas de incubação. 149
Tabela 18: Constantes de ligação (K_b) e números de sítios de ligação do supressor (n), para diferentes temperaturas de incubação.....152
Tabela 19: Parâmetros termodinâmicos da interação entre o complexo supressor e a HSA, para λ_{exc} = 280 e 295 nm. 159
Tabela 20: Resultado dos ajustes feitos do decaimento de fluorescência do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, onde T_1, T_2 e T_3 são os tempos de vida do estado excitado da HSA; P_1, P_2 e P_3 são as contribuições percentuais de cada tempo de vida para o decaimento total da fluorescência. 163
Tabela 21: Porcentagem estimada de α-hélice da HSA, através das curvas de Dicroísmo Circular.....167
Tabela 22: Valores da constante de ligação (K_b) e dos parâmetros termodinâmicos para interação do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ com o fs-DNA 174
Tabela 23: Valores de viabilidade celular para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e o ligante THIQ em diferentes linhagens de célula. 178
Tabela 24: Comparativo da viabilidade celular dos complexos binucleares e trinuclear de rutênio frente as células tumorais B16F10. 179

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 26
Equação 2 38
Equação 3 58
Equação 4 59
Equação 5 60
Equação 6 60
Equação 7 61
Equação 8 61
Equação 9 61
Equação 10 61
Equação 11 61
Equação 12 62
Equação 13 62
Equação 14 62
Equação 15 63
Equação 16 63
Equação 17 63
Equação 18 63
Equação 19 64
Equação 20 65
Equação 21 65
Equação 22 65
Equação 23 65
Equação 24 65
Equação 25 66
Equação 26 66
Equação 27 66
Equação 28 66
Equação 29 66
Equação 30 67
Equação 31 70
Equação 32 70

Equação 33 71
Equação 34 72
Equação 35 72
Equação 36 72
Equação 37 73
Equação 38 73
Equação 39 73
Equação 40 73
Equação 41 73
Equação 42 74
Equação 43 74
Equação 44 74
Equação 45 75
Equação 46 75
Equação 47 75
Equação 48 75
Equação 49 76
Equação 50 78
Equação 51 79
Equação 52 118
Equação 53 125
Equação 54 126
Equação 55 132
Equação 56 133
Equação 57 133
Equação 58 139
Equação 59 139
Equação 60 139
Equação 61 140
Equação 62 140
Equação 63 140
Equação 64 140
Equação 65 140
Equação 66 140

Equação 67 140
Equação 68 146
Equação 69 146
Equação 70 146
Equação 71 146
Equação 72 148
Equação 73 151
Equação 74 157
Equação 75 157
Equação 76 164

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C – Antes de Cristo

A – Adenina

A – Absorbância

A – Fator pré-exponencial

ACN – Acetonitrila

$A_{emissão}$ - Absorbância de Emissão

$A_{excitação}$ - Absorbância de Excitação

B16-F10 –Células de Melanoma Murino

BSA – Albumina Sérica Bovina

C – Citosina

CD – Dicroísmo Circular

c – Concentração

d ou b – Caminho Óptico

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Δo – Parâmetro de Desdobramento do Campo Cristalino

DRX – Difração de Raios-X

E_a – Energia de Ativação de Arrhenius

EAACI – Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica

EDRF – Fator Relaxante Derivado do Endotélio

H_4EDTA – Ácido Etilenotetracético

F_0 – Intensidade de Fluorescência na Ausência do Agente Supressor

F – Intensidade de Fluorescência na Presença do Agente Supressor

$F_{observado}$ - Fluorescência Observada

$F_{corrigido}$ – Absorbância Corrigida

fs-DNA – DNA de Esperma de Salmão

G – Guanina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

HSA – Albumina Sérica Humana

IgE – Imunoglobulina E

IC – Intracluster

I_{abs} – Fótons Absorvidos

I_{em} – Fótons Emitidos

Im – Imidazol

Ind – Indazol

K_a – Constante de Associação

K_{ap} – Constante de Supressão de Fluorescência Aparente do Sistema

k_{abs} – Constante de Absorção

K_b – Constante de Ligação

K_D – Constante de Supressão de Fluorescência Dinâmica

k_{diff} – Constante Difusional

k_f – Constante de Fluorescência

k_{ic} – Constante de Conversão Interna

KP1019 – *trans*-$[RuCl_4(Ind)_2]$IndH

k_q – Constante de Velocidade Bimolecular de Supressão de Fluorescência

K_S – Constante de Supressão de Fluorescência Estática

K_{sv} – Constante de Stern-Volmer

L929 – Fibroblasto Murino

M – Massa da Proteína

MCF7 – Adenocarcinoma de Mama Humano

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

m/z – massa/carga

NAMI-A – *trans*-[$RuCl_4$(DMSO)(Im)]ImH

OM – Orbital Molecular

P – Contribuição Percentual do Tempo de Vida do Estado Excitado

Phen – Fenantrolina

ppm – parte por milhão

py – Piridina

r – Número Estimado de Resíduos da Proteína

R – Constante dos Gases Ideais

RBL – *Rat Basophilic Leukemia*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

T – Timina

T – Temperatura

T – Tempo de Vida do Estado Excitado

$t_{1/2}$ – Tempo de Meia-vida

TCC – Teoria do Campo Cristalino

TCCL – Transição de Transferência de Carga do Cluster para o Ligante

TCL – Teoria do Campo Ligante

THIQ – 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina

TLV – Teoria da Ligação de Valência

TOM – Teoria do Orbital Molecular

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

UV-vis – Ultravioleta Visível

ΔA – Variação da Absorbância

ΔH – Variação de Entalpia

ΔS – Variação de Entropia

ΔG – Energia Livre de Gibbs

[Q] – Concentração do Agente Supressor

τ_0 – Tempo de Vida do Estado Excitado do Fluoróforo na Ausência do Agente Supressor

τ – Tempo de Vida do Estado Excitado do Fluoróforo na Presença do Agente Supressor

Φ – Rendimento Quântico de Fluorescência

Φ_0 – Rendimento Quântico de Fluorescência na Ausência do Agente Supressor

γ – Eficiência dos Choques que Promovem a Supressão

ε - Coeficiente de Absortividade Molar

θ – Elipsidade

λ_{exc} – Comprimento de Onda de Excitação

λ_{em} – Comprimento de Onda de Emissão

Sumário

1 APRESENTAÇÃO DA TESE 26

2 INTRODUÇÃO..... 29

2.1 Rutênio..... 29

2.2 Complexos Metálicos – Contextualização histórica 33

2.3 Metalofármacos..... 39

2.3.1 Metalofármacos de rutênio 40

2.4 Complexos binucleares de rutênio com ponte µ-oxo 42

2.5 Ligantes azanaftalenos..... 43

2.6 Cinética de troca de ligantes 44

2.7 Biomoléculas e suas interações com complexos de coordenação 45

2.7.1 Albumina Sérica Humana 46

2.7.2 DNA..... 47

2.8 Câncer..... 49

2.9 Alergias 50

3 OBJETIVOS..... 52

4 MATERIAIS e MÉTODOS..... 53

4.1 Reagentes..... 53

4.2 Rota Sintética..... 54

4.2.1 Síntese do precursor $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_6](PF_6)_2$; 54

4.2.2 Síntese do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$; 54

4.3 Análise Elementar 55

4.4 Difração de Raios-X em monocristal (DRX)..... 55

4.5 Espectrometria de Massas – Ionização por spray eletrolítico (ESI) 56

4.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 56

4.7 Espectroscopia Eletrônica 56

4.8 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho..... 56

4.9 Voltametria Cíclica 57

4.10 HPLC (High-perfomance liquid chromatography) 57

4.11 Espectroscopia de Luminescência – Interação com HSA..... 58

4.11.1 Estudo da interação do complexo binuclear de rutênio com a HSA 59

4.1 Medidas de Tempo de Vida..... 69

4.2 Dicroísmo Circular 70

4.3 Titulação Espectrofotométrica na Região do UV-visível – Interação com DNA..... 71

4.4 Atividade Antialérgica 76

4.4.1 Preparação das Células 76

4.4.2 Ensaio de potencial antialérgico: quantificação da enzima β-hexosaminidase (β-hex) 76

4.5 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais 77

4.5.1 Cultivo de células B16-F10, MCF7 e L929..... 77

4.5.2 Ensaios de Viabilidade Celular 78

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 80

5.1 Sínteses 80

5.1 Análise Elementar 83

5.2 Raios-X 84

5.3 Espectrometria de Massas 87

5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 90

5.5 Espectroscopia Eletrônica 96

5.6 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho 103

5.7 Voltametria Cíclica 106

5.8 Cinética de troca de ligantes 109

5.9 Estudo da interação entre o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e a HSA.....141

5.10 Tempo de vida.....160

5.10.1 Espectroscopia Eletrônica de Dicroísmo Circular – Análise conformacional da HSA.....166

5.11 Titulação espectrofotométrica na região do UV-visível 168

5.11.1 Estudo da interação do *fs*-DNA com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ 168

5.12 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais 175

5.13 Atividade Antialérgica 180

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 183

7 REFERÊNCIAS 185

1 APRESENTAÇÃO DA TESE

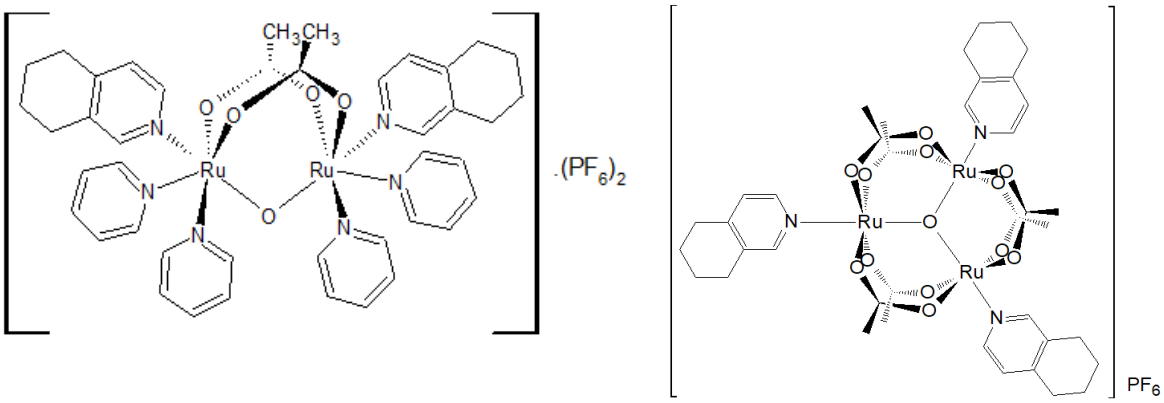
A síntese de complexos binucleares de rutênio com ponte µ-oxo – unidade [Ru_2O] – é bastante complexa, uma vez que esses compostos são precursores para formação de complexos trinucleares de rutênio com ponte µ-oxo – unidade [Ru_3O]. Então, o controle da temperatura juntamente com o tempo de reação e estequiometria entre os reagentes devem ser trabalhados com bastante rigor. Quando utilizo as palavras "bastante rigor" quero dizer que 1 minuto a mais de síntese ou 2 ^oC a mais na temperatura podem deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação de complexos trinucleares, ou ocorrer uma mistura de complexos mononucleares, binucleares e trinucleares, ou ainda o aparecimento de alguns subprodutos não caracterizados, como mostrado no esquema qualitativo abaixo. Essa premissa vale para diversos ligantes testados em diversas rotas sintéticas.

Equação 1

$$RuCl_3.nH_2O + CH_3COOH + piridina\ (py) + Ligante(L) + PF_6$$
$$\rightleftharpoons [Ru_2O(CH_3COO)_2\ (py)_4(L)_2](PF_6)_2$$
$$\rightleftharpoons\ [Ru_3O(CH_3COO)_6\ (L)_3]PF_6$$
$$+\ subprodutos$$

Visto isso, essa tese mostrará a síntese, caracterização, cinética de troca de ligantes e estudos de atividade biológica de um complexo binuclear de rutênio com ponte µ-oxo inédito, sintetizado a partir do complexo mononuclear $RuCl_3.nH_2O$, piridina (py) e o ligante 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina (THIQ). Recentemente foram reportados resultados para um composto trinuclear com o mesmo ligante, de fórmula $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_3]PF_6$ [1] [2] [3]. Os resultados observados para o comportamento biológico do complexo trinuclear suscitou o interesse em comparar dois complexos contendo o mesmo ligante THIQ, porém com diferentes nuclearidades. Portanto, em muitas discussões apresentadas aqui irá ocorrer uma abordagem em ternos comparativos da unidade central desses complexos, [Ru_3O] para complexos trinucleares e [Ru_2O] para os complexos binucleares.

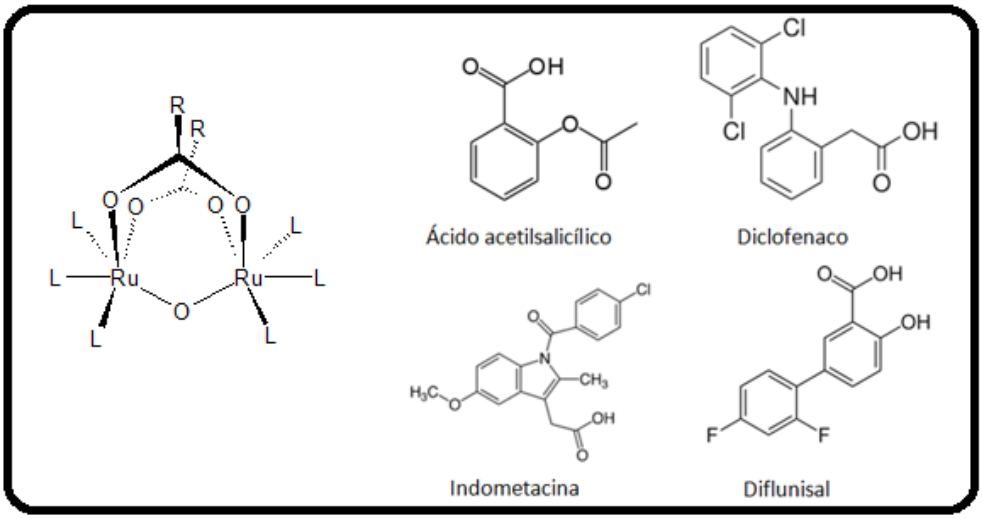
Figura 1: Estruturas dos complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (à esquerda, este trabalho) e $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$ (à direita, **[2]**).



Fonte: Autor.

Vale a pena ressaltar que o objetivo original desse trabalho de doutorado era a síntese e caracterização de potenciais candidatos a metalofármacos binucleares de rutênio com ponte μ-oxo de formula geral $[Ru_2O(carb)_2(L)_6](PF_6)_2$, onde L seria a água ou piridina e carb os anti-inflamatórios não esteroidais derivados do ácido salicílico (ácido acetilsalicílico, indometacina, diflunisal e diclorefenaco), formando uma série de complexos possibilitando assim o estudo da correlação das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas. Abaixo estão mostrados a estrutura do complexo geral bem como os ligantes que seriam utilizados.

Figura 2: Estrutura de um complexo de fórmula geral $[Ru_2(\mu\text{-}O)(RCOO)_2(L)_6]^n$ (à esquerda) e dos ligantes (à direita).



Fonte: Autor

Poderia descrever páginas e mais páginas de sínteses que não nos levaram a obtenção dos complexos de interesse, porém esse não é o intuito. Mas gostaria de deixar claro que foi realizado um trabalho rigoroso e árduo, sempre procurando novas rotas na literatura, no intuito do sucesso da síntese. Variou-se, de modo sistemático parâmetros como tempo de reação, estequiometria dos reagentes, temperatura, solventes utilizados no meio reacional – bem como purificação dos mesmos – agitação, ordem de adição dos reagentes, mudança do precursor e etc. Sintetizou-se também o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$ com o intuito de trocar os CH_3COO^- por ligantes derivados do ácido acetilsalicílico, porém a ligação do acetado é bastante inerte e não se observou a troca.

Em todas as sínteses, tentou-se a purificação por cromatografia em coluna dos sólidos obtidos. Porém, ao realizar esse procedimento, viu-se uma grande quantidade de mistura de compostos formados. Variou-se as fases móveis bem como a fase estacionária em busca de uma separação eficiente, mas o produto final obtido não foi suficiente para realizar a caracterização.

Então, apenas com o intuito de esclarecimento, o objetivo inicial era a substituição dos dois carboxilatos pelos ligantes derivados do ácido salicílico. Devido aos percalços, para a obtenção do complexo sintetizado e apresentado nessa tese utilizou-se o ligante THIQ coordenado na posição *trans* ao átomo de oxigênio, os demais L são a piridina.

2 INTRODUÇÃO

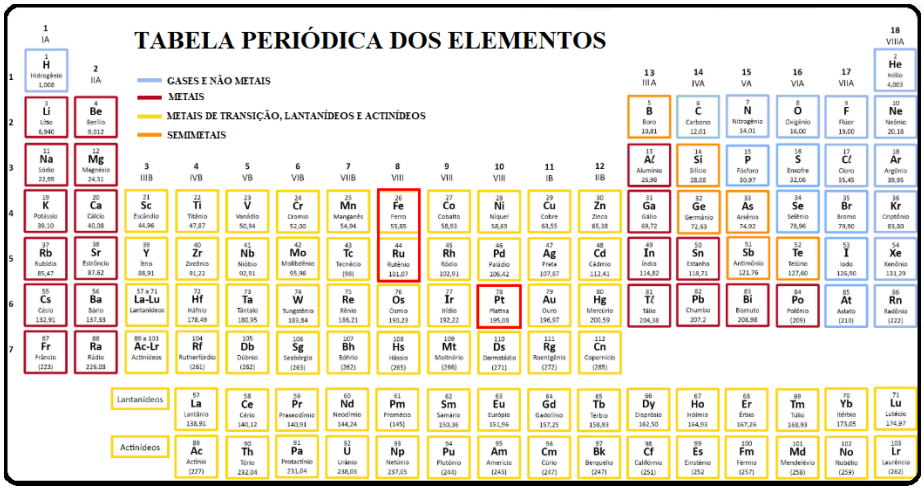
2.1 Rutênio

A primeira pergunta a ser feita é: Por que escolher o rutênio como íon metálico para síntese de novos candidatos a metalofármacos?

Por muito tempo utilizou-se certas generalizações sobre a química do rutênio (Ru), que foram reproduzidas sistematicamente em diversos artigos e trabalhos sem nenhuma análise crítica a respeito do assunto. Muito se escreveu/leu sobre o desenvolvimento de complexos metálicos de rutênio como uma alternativa promissora ao tratamento de alguns tipos de câncer [4] [5] [6], e esses estudos foram alavancados a partir da descoberta da atividade antitumoral da cis-platina (*cis*-diaminodicloroplatina (II)), feita por Rosenberg em 1965 [7].

Além disso, é sabido que elementos encontrados em um mesmo grupo, como mostrado na figura abaixo, apresentam determinadas propriedades semelhantes, como o caso do ferro (Fe) e rutênio. Fundamentando-se nessa ideia, e sabendo-se que o ferro é um metal essencial para a vida, responsável pela formação da hemoglobina, mioglobina e de certas enzimas [8], perpetuou-se a fala de que o rutênio, quando administrado no corpo humano, apresentaria baixa toxicidade, sendo possível metabolizá-lo e excretá-lo pelas mesmas vias que o ferro.

Figura 3: Tabela Periódica dos Elementos.



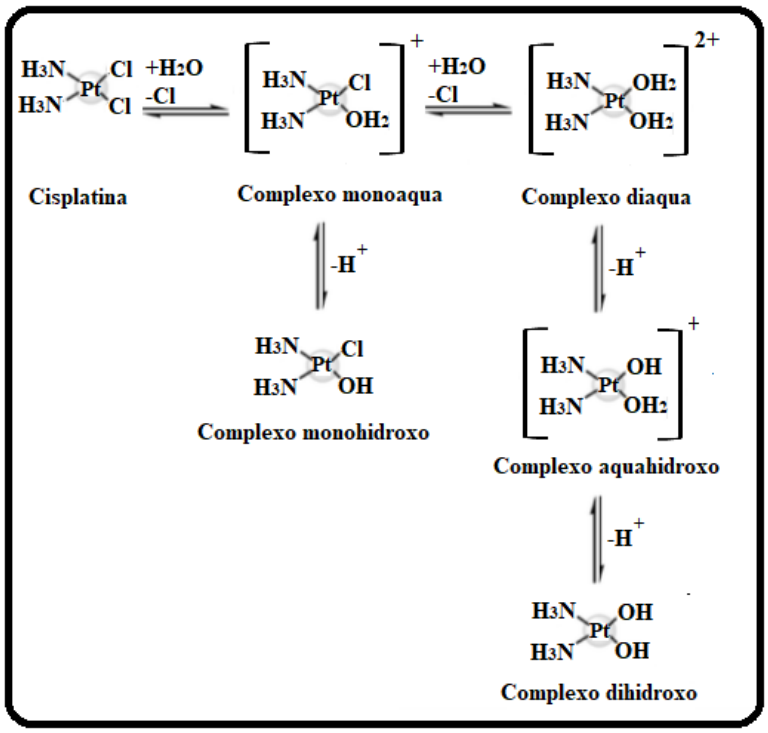
Fonte: Imagem de domínio público coletada da internet, adaptada.

Por isso, textos que abordam as vantagens de utilização do rutênio frente ao ferro e a platina são comumente encontrados, como mostrado nos itens abaixo.

1). *Complexos metálicos de rutênio apresentam baixa toxicidade pois são capazes de "mimetizar" a ligação do ferro a biomoléculas* [9] [10] [11] – Ru e Fe tem em comum o fato de apresentarem dois estados de oxidação principais (Fe^{2+}/Fe^{3+} e Ru^{2+}/Ru^{3+}) e complexos derivados desses metais apresentam geometria de coordenação octaédrica. Em contrapartida diferem quanto ao tamanho de seus raios (o Fe^{3+}, que apresenta equilíbrio de *spin* ou *spin cross-over,* possui raio de 55 pm em spin baixo e 64,5 pm, quando em spin alto, já o Ru^{3+} que ocorre apenas em spin baixo tem raio de 68 pm), propriedades *redox,* Ru^{2+}/Ru^{3+} são consideravelmente mais moles e inertes do que Fe^{2+}/Fe^{3+} e apresentam diferentes valores de ácidez de Lewis. Em resumo, o rutênio sendo maior e mais mole que o ferro implica em diferenças significativas quanto a interação frente a determinadas biomoléculas. Além disso em caso de um metal com diferentes propriedades cinéticas e termodinâmicas, em relação ao ferro, se ligar a biomoléculas essencias a manutenção celular pode ocorrer o oposto do que se espera, a morte celular [12] [13];

2). *Comparado a complexos de platina (II), os complexos de rutênio apresentam taxas de troca de ligantes lentas* [14] [10] [15] – Esse fato está associado ao tempo de muitos processos de divisão celular, então complexos metálicos que apresentam cinética de troca de ligantes entre uma e duas horas poderiam desempenhar certa atividade anticâncer. Antes de continuar com essa explicação vale a pena relembrar que a cis-platina só apresenta atividade anticâncer – ou seja, se liga ao DNA da célula cancerígena – após a substituição de um ou dois ligantes cloretos por uma ou duas moléculas de água [16] [17], respectivamente, conforme mostrado na figura 4. Então, esse comportamento lento de troca de ligantes é desejável para que haja uma "garantia" de que após o complexo com determinada atividade anticancerígena ser administrado no organismo e percorrer todo o caminho até chegar as células alvo, sua integridade seja mantida, interagindo com o mínimo de células saudáveis possíveis, tornando-se ativo apenas nos tecidos cancerígenos [13]. Então, procura-se complexos de rutênio que apresentem taxas de hidrólises e estabilidade cinética parecidas com a cis-platina nas mesmas condições.

Figura 4: Esquema de ativação da cisplatina.



Fonte: Autor.

De modo geral, os íons Ru^{3+} são classificados como sendo mais inertes que a Pt^{2+}, porém isso não é uma verdade absoluta. Essa generalização muito provavelmente ocorre devido à máxima que diz que quanto maior o número de oxidação do metal, maior o valor do parâmetro de desdobramento de campo cristalino (Δo). Relacionando então altas cargas positivas do íon metálico com maior atração com ligantes aniônicos ou polares, aumentando a interação eletrostática entre eles e os elétrons dos orbitais d. Em contrapartida, em vista da Pt^{2+} apresentar configuração eletrônica $5d^8$ e o Ru^{3+} $4d^5$, considera-se que o valor de Δo para a Pt^{2+} seja maior, ou seja, a distância entre os elétrons d de um metal num nível mais alto (5 no caso da platina) é maior, permitindo assim uma maior interação com os ligantes [12].

Em suma, nenhuma generalização a respeito do enunciado acima é possível sem estudar cada complexo individualmente;

3). *Complexos formados com Ru^{3+} são mais inertes frente a substituição dos ligantes em relação aos complexos reduzidos Ru^{2+}, portanto precisam ser "ativados" por redução* [10] [18] – De acordo com essa proposição formula-se que o caráter hipóxico de um tumor sólido reduza Ru^{3+} a Ru^{2+} levando assim a uma certa seletividade para o tecido cancerígeno em relação aos tecidos

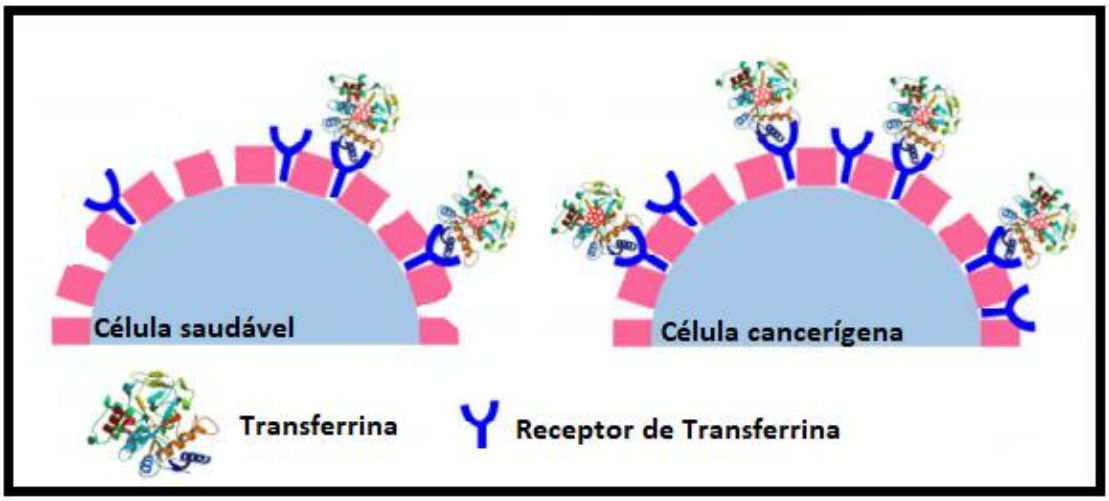
saudáveis. Mais uma vez, utilizando-se da química de coordenação nota-se uma contradição nessa afirmação. A labilidade/inércia desses complexos depende do número de oxidação dos íons metálicos tanto quanto da natureza dos ligantes de saída. Propagou-se a ideia de que esses complexos seriam inertes até sofrerem redução no interior de tumores sólidos, onde só assim apresentariam determinada atividade anticâncer. Quando o ligante de saída apresenta caráter π doador, tem preferência por coordenar-se ao Ru^{3+} devido ao elétron desemparelhado encontrado em um dos orbitais t_{2g}, nesse caso então os complexos Ru^{3+} são mais inertes. Em contrapartida, quando o ligante de saída apresenta caráter π receptor, sua ligação ao Ru^{2+} é mais forte e consequentemente esse complexo reduzido é mais inerte.

Por fim, há sim evidências que comprovam a redução dos complexos de rutênio *in vivo*, porém há de se fazer uma análise crítica, uma vez que os ligantes de saída são determinantes quanto a labilidade ou inércia de cada complexo [12].

4). *Acumulam-se especificamente em tecidos cancerígenos* [10] – Essa afirmação foi relatada pela primeira vez em meados de 1970 e aceita por muitos anos. Nessa época foram estudados apenas cloretos de rutênio, amino complexos (exemplo, vermelho de rutênio) e alguns complexos utilizando-se como ligantes quelatos (exemplo, $[Ru(phen)_3]^{2+}$). Em se tratando desses compostos citados, realmente apresentam um acúmulo modesto em determinados tipos de tumores. Porém estudos mais recentes não conseguiram provar essa preferência do rutênio se acumular em tecidos cancerígenos, mais uma vez a seletividade dos complexos de rutênio serem “ativados” por hipóxia é desmitificada [12] [13].

5). *Podem ser absorvidos e/ou transportados através da transferrina* [10] [19] – Sabe-se que tumores sólidos são altamente vascularizados, por isso precisam de uma grande quantidade de ferro para se desenvolver. Consequentemente, nesses tecidos há uma maior quantidade, em relação aos tecidos saudáveis, de receptores de transferrina em sua superfície, como mostrado na figura 5. Então, concatenou-se a analogia de que os complexos de rutênio também teriam uma maior afinidade em se ligar a tecidos cancerígenos [12] [13].

Figura 5: Esquema simplificado que diferencia uma célula saudável (esquerda) de uma célula cancerígena (direita).



Fonte: imagem de domínio público coletada da internet, adaptada.

Alguns estudos recentes mostraram que a ligação entre a transferrina e o rutênio realmente ocorre, no entanto, muito provavelmente o aduto formado não apresenta a configuração correta para interagir com os receptores celulares, tendo assim uma menor taxa de internalização celular. Então, pode-se concluir que apesar da capacidade de alguns complexos de rutênio se ligarem à transferrina em condições adequadas e ter se verificado uma taxa de internalização celular desses complexos, ainda pouco se sabe sobre a capacidade do aduto transferrina-Ru liberar o rutênio nas mesmas condições fisiológicas em que o ferro é liberado (redução do Fe(III) à Fe(II) através da ferriredutase em meio ácido com consequente diminuição da afinidade pela transferrina) [10] [12] [13].

A conclusão sobre isso tudo é que complexos de rutênio com certeza são uma promissora classe de compostos com potencial propriedades farmacológicas, porém as justificativas de seu uso não concordam com a química básica já muito bem consolidada.

2.2 Complexos Metálicos – Contextualização histórica

O texto abaixo foi baseado nas referências [20] [21] [22] [23] [24].

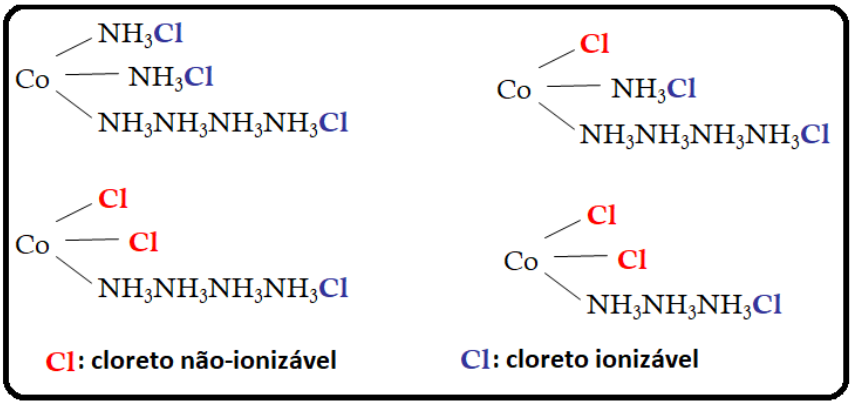
A química de coordenação e, consequentemente, de complexos metálicos é relativamente nova, surgindo em torno de 1890 com estudos e quebras de paradigmas alavancados por Alfred Werner. Na época, as teorias vigentes explicavam muito bem compostos orgânicos, porém, a tentativa de explicar estruturas maiores e mais complicadas, que foram então chamadas de *complexos*, eram totalmente falhas. Percebendo isso, Werner passou a formular suas próprias teorias com o intuito de conseguir elucidar as características físico-químicas desses novos complexos.

Complexos metálicos podem ser definidos como compostos constituídos por íons metálicos ou ácidos de Lewis (espécie capaz de receber elétrons) ligados a ligantes ou bases de Lewis (espécies doadoras de elétrons).

Werner em sua curiosidade científica tentava entender cores, geometria, estados de oxidação, número de ligantes entre outras características dos compostos encontrados na época.

Antes das teorias propostas por Werner serem aceitas, utilizavam-se conceitos totalmente equivocados na tentativa de se explicar a estrutura e propriedades dos complexos metálicos. A Teoria da Cadeia, desenvolvida por Blomstrand e aprimorada por Jörgensen, "conseguia" explicar a estrutura de compostos aminometálicos de cobre (Cu). Essa teoria defendia a formação de cadeias de moléculas de amônia unidas por ligações nitrogênio-nitrogênio (N-N), baseada em compostos orgânicos onde ocorrem ligações carbono-carbono (C-C), em que cada átomo de N seria pentavalente. Então, nessa época as estruturas foram elucidadas conforme mostrado na figura abaixo:

Figura 6: Representação dos complexos hexa-amino $CoCl_3 \cdot 6NH_3$, penta-amino $CoCl_3 \cdot 5NH_3$, tetra-amino $CoCl_3 \cdot 4NH_3$ e tris-amino $CoCl_3 \cdot 3NH_3$ segundo a Teoria de Blomstrand-Jörgensen.



Fonte: adaptado [20].

Essas estruturas foram baseadas em experimentos simples de condutividade elétrica em solução e precipitação dos cloretos com nitrato de prata ($AgNO_3$) e também no conceito de valência fixa proposto por Kekulé, onde o átomo de nitrogênio por ser pentavalente obrigatoriamente teria de fazer 5 ligações e o cobalto no estado de oxidação +3 faria apenas 3 ligações. Segundo esse modelo os átomos de cloro não-ionizáveis não poderiam ser precipitados com $AgNO_3$, pois estão ligados diretamente ao metal e consequentemente apresentariam uma ligação mais forte, em contrapartida, os átomos de cloro ionizáveis poderiam ser precipitados pois estariam mais fracamente ligados ao átomo de nitrogênio. Então, através de medidas de condutividade elétrica Jörgensen foi "capaz" de propor que estes compostos apresentavam três, dois ou um íon cloreto em solução.

Contudo, a teoria mostrada acima não era capaz de explicar complexos aminometálicos que formavam soluções não eletrolíticas, ou seja, seguindo-se a lógica proposta na época, um complexo com 3 átomos de cloro ligados forte e diretamente ao cobre de modo a não haver mais "espaço" para que os grupamentos amino se coordenassem. E foi isso que Werner provou, através dos mesmos experimentos, que as estruturas propostas não poderiam estar corretas, uma vez que não eram capazes de contemplar alguns complexos estudados.

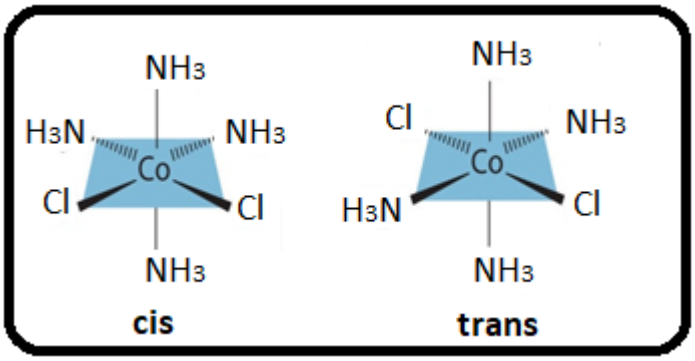
Em 1891, em sua publicação intitulada "Contribuição à Teoria de Afinidade e Valência", Werner mostrou que o modelo de valência fixa, proposto por Kekulé e completamente aceito pela sociedade química da época, era bastante falho quando se pretendia explicar complexos metálicos. Nesse contexto, Werner foi desacreditado e considerado um lunático pela maioria dos grandes nomes de cientistas da época. Segundo Kekulé, um elemento ao saturar sua valência, ou seja, fazer tantas ligações quanto fosse o número de oxidação do elemento, não teria mais afinidade química e capacidade de se ligar a outros átomos/ligantes. No entanto, Werner foi capaz de provar empiricamente que isso não se aplicava a determinados compostos.

Surgiram então, dois novos conceitos: o de valência primária que seria o estado de oxidação e o de valência secundária entendido como o número total de ligantes coordenados ao íon metálico, ou simplesmente, o número de coordenação do metal. Foi provado então que, mesmo quando os átomos

pareciam estar saturados quanto ao número de ligações, assim como postulado pela teoria de Kekulé, eles ainda eram capazes de estabelecer ligações com outros átomos, completando assim sua esfera de coordenação.

Foi em 1907, após quase 20 anos da teoria de Werner ser proposta e com a síntese do complexo tetramindiclorocobalto (III) ($[Co(NH_3)_4Cl_2]^+$) (mostrado na figura abaixo), que apresenta um isômero *cis* de coloração verde e um isômero *trans* de coloração violeta que Jörgensen e outros químicos importantes da época passaram a aceitar as ideias de modelos propostos por Werner. Segundo Werner, havia uma esfera interna de coordenação compostas pelos ligantes ligados diretamente ao cobalto, acompanhado de uma esfera externa de coordenação, onde ficariam os íons atraídos eletrostaticamente para neutralizar a carga global. Em posse de tamanho conhecimento, Werner logo admitiu a existência de mais de uma possibilidade de arranjo estrutural, ou seja, a presença de isômeros. Surgiu então, a estereoquímica.

Figura 7: Estrutura dos complexos *cis*-$[Co(NH_3)_4Cl_2]^+$ (à esquerda) e *trans*-$[Co(NH_3)_4Cl_2]^+$ (à direita).



Fonte: Adaptado [24].

Merecidamente, em 1913 Werner conquistou o prêmio Nobel de química, o primeiro relacionado à química inorgânica.

Posteriormente às ideias de Werner, surgiram teorias que auxiliaram muito no avanço do estudo desses complexos. Lewis, em 1916, escreveu a "Teoria das ligações de Lewis", que tinha como premissa básica que *"para dois átomos se ligarem eles deveriam compartilhar um ou mais pares de elétrons"* – nesse ponto vale a pena ressaltar que Werner desenvolveu suas teorias sem a ideia da existência dos orbitais.

Com o intuito ainda de se explicar as ligações químicas surgiu, em 1930, a Teoria da Ligação de Valência (TLV), escrita por Linus Pauling. Essa foi a primeira teoria sobre ligações covalentes que levava em consideração os orbitais atômicos. Segundo Linus Pauling, orbitais de valência de um átomo se superpõem com orbitais de valência de outro átomo formando uma ligação química, nesse contexto surgiu também os conceitos de ligações σ e π. Concomitante a essa teoria, surge a Teoria do Campo Cristalino (TCC), desenvolvida por Bethe e Van Vleck. A TCC é uma teoria que não visa descrever as ligações químicas, o intuito principal é explicar as propriedades magnéticas e eletrônicas dos complexos de coordenação.

Resumidamente, a TCC olhava a perturbação eletrônica sofrida pelo centro metálico quando rodeado por ligantes – considerados como cargas pontuais – e era capaz de explicar propriedades que a TLV não conseguia por considerar todos os orbitais moleculares degenerados, sendo incapaz de elucidar a cor dos complexos, por exemplo.

Já em meados de 1950, Griffith e Orgel apresentam a Teoria do Campo Ligante (TCL), teoria essa que levava em conta muitos princípios da TCC, porém passa a considerar as características eletrônicas dos ligantes, esses deixam de serem considerados como cargas pontuais. Todas essas teorias foram imprescindíveis para o desenvolvimento da Teoria do Orbital Molecular (TOM), desenvolvida por Mulliken em 1966.

Dentre todas as teorias citadas até agora, a TOM é a mais completa sendo capaz de explicar tanto as ligações químicas entre o núcleo metálico e ligantes bem como propriedades eletrônicas e magnéticas dos complexos metálicos. Essa teoria enuncia que para haver formação de orbitais moleculares é necessário a sobreposição entre os orbitais atômicos, obedecendo três regras principais: 1) Simetria dos orbitais devem ser semelhantes; 2) Distância entre os átomos devem ser a menor possível, porém a repulsão intereletrônica não deve ser muito pronunciada a ponto de a ligação não ser energeticamente favorável; 3) A energia entre os orbitais que se quer combinar devem ser semelhantes. Obedecendo essas regras, dois orbitais atômicos geram dois orbitais moleculares, um ligante e um antiligante. Os orbitais ligantes têm energias inferiores às energias de qualquer um dos orbitais que lhes deram origem e, em sua maioria, estão energeticamente mais próximos dos orbitais dos ligantes, já

os orbitais antiligantes apresentam energias superiores às energias de qualquer um dos orbitais que lhes deram origem e, em sua maioria, situam-se mais próximos das energias do metal. Há ainda, os orbitais não-ligantes, que apresentam energias iguais às dos orbitais atômicos de origem.

Então, todas as teorias apresentadas até agora foram imprescindíveis para o desenvolvimento da química de coordenação, sobretudo a capacidade de explicar, entender e prever características interessantes dos complexos metálicos que atualmente são utilizados nas mais diversas áreas: Agronomia – desenvolvimento de adubos e pesticidas; Indústria de alimentos – complexos capazes de retardar a deterioração (oxidação) dos alimentos; Análises químicas – determinação de certos íons em águas, solos e etc.; Indústria fotográfica – brometo de prata utilizado com a finalidade de revelar fotos; Metalurgia – extração de metais, tais como prata e ouro; Produtos de limpeza – alguns tipos de detergentes; Sistemas luminescentes – utilizados como pigmentos para tintas; Medicina – no tratamento de diversas doenças.

Em geral, complexos metálicos de rutênio apresentam uma boa aplicabilidade em diversas áreas. Estudos publicados recentemente mostram aplicações no desenvolvimento de tecnologias para a produção de combustíveis através da utilização de complexos metálicos de rutênio e outros metais de transição na oxidação da água [25]. Esses complexos são utilizados como catalisadores acelerando assim a reação, como mostrado na equação abaixo:

Equação 2

$$2\ H_2O \xrightarrow{\text{catalisador}} O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^-$$

Mais recentemente, complexos de rutênio coordenados com polipiridinas estão sendo aplicados em bioanálises, bioimagens, células solares e também diodos emissores de luz [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32].

Além disso, estão sendo testados como imunossupressores [33] [34] antibióticos [35], no combate a células cancerígenas e tumores [36] [4] [37], antifúngicos [38] [39] [40], antibactericida [40], intercaladores de DNA [41] [42] e contra o HIV [43] [44].

Frente a tantas aplicações, fica fácil justificar o estudo da química básica de complexos metálicos de rutênio, visando estudos clínicos no futuro.

2.3 Metalofármacos

Foi a descoberta da atividade antitumoral da cis-platina, em 1965, que impulsionou o estudo e planejamento de compostos utilizando metais de transição.

Metalofármacos ou metalodrogas, são compostos metalados que apresentam propriedades farmacológicas quando interagem com biomoléculas no meio celular. Neste tipo de composto, o íon metálico pode estar coordenado a fármacos orgânicos ou então a espécies que, quando não coordenadas, não possuem nenhuma ação farmacológica ou medicinal. Embora os principais alvos desses agentes sejam proteínas e DNA, a passagem pelo sangue e, eventualmente, até a célula, permite que o metalofármaco entre em contato com uma variedade de íons e pequenas moléculas que podem modificar sua composição e alterar a reatividade química [12] [45] [46] [47].

Existem relatos de que há aproximadamente 5.000 anos o uso medicinal dos metais já era praticado. Sua utilização na área medicinal esteve presente entre os egípcios, chineses e renascentistas europeus. Por exemplo: há aproximadamente 3.000 a.C. o cobre já era usado pelos egípcios na esterilização da água, e em 1.500 a.C., utilizavam-se medicamentos contendo ferro. Nesta mesma época, o ouro já era empregado pelos árabes e chineses em suas formulações terapêuticas [45] [48]. É sabido, que os metais de transição, além de serem essenciais em muitas funções vitais, também podem modificar a ação de muitos compostos orgânicos usados na medicina, sendo que muitos fármacos não apresentam um mecanismo de ação baseado puramente na molécula orgânica, sendo ativados ou bio-transformados por íons metálicos presentes no meio biológico [48]. Por isso, o estudo de complexos metálicos que possam apresentar potencialidade biológica tornou-se alvo de grande interesse e estudo [33] [35] [4] [40] [44] [49] [50]. Mesmo com a grande importância da área bioinorgânica e a potencialidade dos metais para aumento da eficácia no tratamento comprovada, os metalofármacos ainda permanecem como uma minoria dentre os fármacos existentes atualmente no mercado [50].

Metalofármacos podem apresentar diversas estruturas devido à variedade de geometrias que podem assumir e também aos diferentes ligantes que podem se coordenar a essas estruturas. Tais propriedades os tornam atraentes no que

se refere ao desenvolvimento de novas espécies, quer sejam como fármacos ou como sinalizadores de sítios-alvo específicos [12] [48] [51].

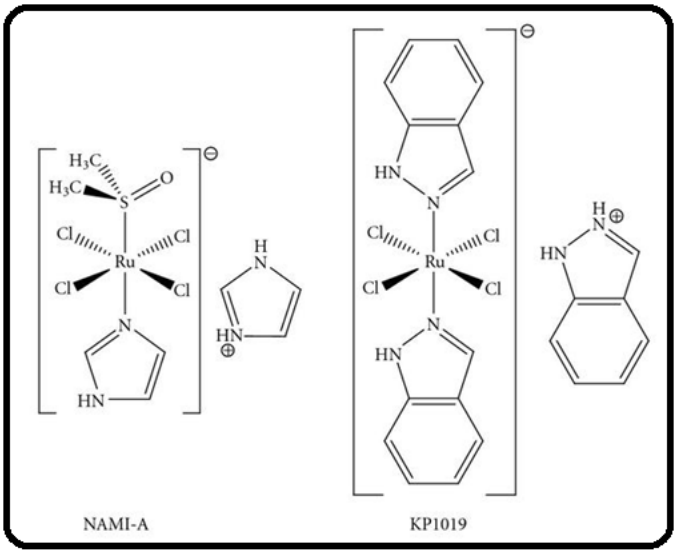
2.3.1 Metalofármacos de rutênio

Um crescente número de estudos está sendo realizado utilizando complexos metálicos de rutênio como sensibilizadores em terapia fotodinâmica, com o objetivo de matar células tumorais com o uso direcionado da luz [52]. Esses complexos se apresentam promissores uma vez que tem uma alta afinidade por biomoléculas, como por exemplo, o DNA [53].

Outros complexos de rutênio têm mostrado habilidade de interferir com a via do óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos [54] [55] [56], indicando um potencial uso terapêutico, uma vez que o óxido nítrico é uma molécula que desempenha importante papel nos processos biológicos, atuando como transmissor em comunicação celular, além de ser um importante segundo mensageiro que tem a habilidade de controlar o ambiente onde é produzido. Essa molécula também foi identificada como sendo um Fator Relaxante Derivada do Endotélio (EDRF, sigla em inglês que significa Endothelium-Derived Relaxing Factor), desempenhando um importante papel no controle dos tônus vasculares [57], como vasodilatador, ação antitumoral e antiplaquetária, e responsável pela neurotransmissão no sistema nervoso periférico [58].

É imprescindível falar de dois candidatos a metalofármacos de rutênio que entraram em fase de estudos clínicos contra o câncer o NAMI-A (*trans*-[$RuCl_4$(DMSO)(Im)]ImH, onde Im - imidazol) e KP1019 (*trans*-[$RuCl_4(Ind)_2$]IndH, onde Ind - indazol) [59] [60] [61], mostrados na figura 8. Esses dois complexos, assim como a *cis*-platina, são considerados pró-drogas, pois a forma administrada não é ativa. Quando em solução o ligante equatorial cloreto do KP1019 e NAMI-A e o ligante axial DMSO (dimetilsulfóxido) do NAMI-A são lábeis, facilitando assim a troca desses ligantes, tornando-se ativos.

Figura 8: Estrutura do NAMI-A (à esquerda) e do KP1019 (à direita).



Fonte: Adaptado [13].

NAMI-A é uma pró-droga antimetastática capaz de reduzir a taxa de metástases e prevenir a disseminação de tumores secundários, em particular para cânceres de pulmão e metástases sólidas [62] [63]. No entanto, o NAMI-A não tem citotoxicidade direta para as células cancerosas aderentes (embora seja tóxico para as células leucêmicas), nem qualquer efeito sobre o crescimento primário do tumor. O KP1019 é uma pró-droga citotóxica eficaz contra tumores primários e em particular tumores colorretais [64].

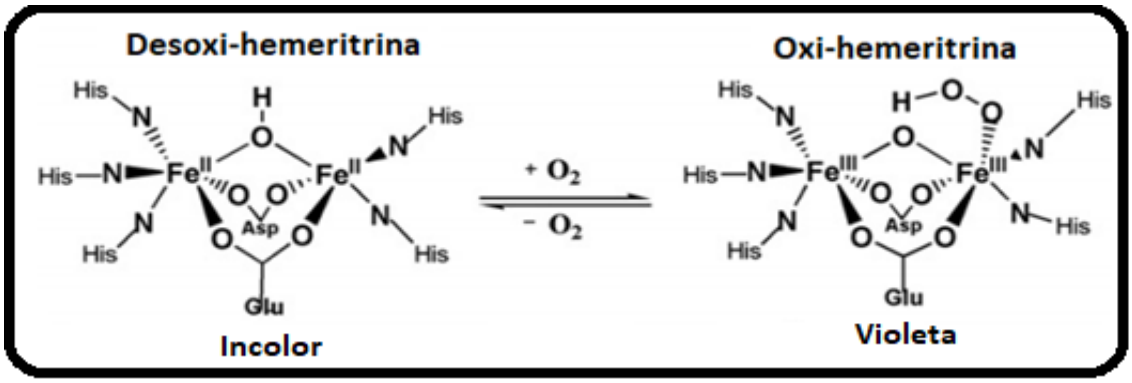
Vale a pena ressaltar, que tanto o NAMI-A quanto o KP1019 tiveram seus testes clínicos descontinuados. O primeiro foi descontinuado após a conclusão da fase II, apesar de ter demonstrado baixa citotoxicidade nos testes *in vitro* e *in vivo*, o NAMI-A apresentou-se tóxico quando realizado testes em humanos. Já o KP1019, mostrou maior citotoxicidade in vitro superior ao NAMI-A, porém apresentou-se pouco tóxico em humanos nos testes clínicos de fase I.

Além de possíveis aplicações contra diferentes tipos de câncer, os complexos de rutênio têm demonstrado grande potencial no tratamento de tuberculose, quando comparados a drogas já utilizadas que apresentam efeitos colaterais severos e a bactéria (*Mycobacterium tuberculosis*) responsável pela doença tem demonstrado resistência [65] [66].

2.4 Complexos binucleares de rutênio com ponte µ-oxo

O estudo de complexos binucleares de rutênio ligados por uma ponte µ-oxo é relativamente recente e foi inspirado em uma metaloproteína encontrada em alguns invertebrados marinhos, a hemeritrina. Essa biomolécula é uma proteína oligomérica de ferro não-heme responsável pela transferência e/ou armazenamento de oxigênio em invertebrados marinhos (sipunculídeos, priapulídeos, braquiópodes e em um verme chamado magelona) [67] [68] [69] [70]. Difere das outras proteínas que apresentam a capacidade de se ligar a molécula de O_2 (hemoglobina e hemocianina) tanto pela cadeia polipeptídica quanto pelo complexo metálico utilizado para ligar de forma reversível ao oxigênio. A hemeritrina tipicamente existe como homo-octâmero ou hetero-octâmero composto por subunidades do tipo α e β de 13-14 kDa, no entanto algumas espécies apresentam hemeritrinas diméricas, triméricas e tetraméricas. Cada subunidade possui uma dobra de quatro α-hélices que liga um centro de ferro binuclear. A hemeritrina é essencialmente incolor quando desoxigenada (Desoxi-hemeritrina), porém, apresenta coloração violeta quando oxigenada (Oxi-hemeritrina) [71] [72] [73] [74].

Figura 9: À esquerda a molécula de Desoxi-hemeritrina, à direita a molécula de Oxi-hemeritrina quando ligada a molécula de O_2.



Fonte: Adaptado [75].

A figura acima resume a reação de oxidação da Desoxi-hemeritrina, que apresenta dois átomos de ferro com estado de oxidação +2 unidos por um grupo µ-hidroxila, à Oxi-hemeritrina que passa a apresentar dois átomos de ferro no

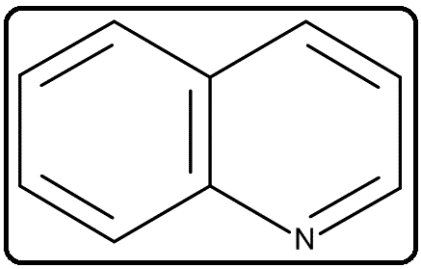
estado de oxidação +3 ligados por uma ponte μ-oxo e um grupo peróxido protonado [72] [75].

Desde a descoberta da hemeritrina, complexos metálicos do tipo $[M_2(\mu\text{-}OH)(\mu\text{-}R\text{-}COO)_2]^{+x}$ e seus análogos $[M_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}R\text{-}COO)_2]^{+x}$, onde M é o metal de transição e R-COO é um ligante carboxilato, vem sendo sintetizados e estudados. Ferro (III) [76] [77] [78] [79] [80], manganês (III) [81] [82] [83] [84], vanádio (III e V) [85] [86] [87] [88], titânio (III) [89] [90] [91] [92], cobre(II) [93] [94] [95] e rutênio (III) [96] [97] [98] são os metais de transição mais utilizados para a síntese desse tipo de complexos. É interessante ressaltar que alguns desses complexos podem apresentar metais com estados de oxidação diferentes [99] [100] e/ou dois metais distintos em sua composição.

2.5 Ligantes azanaftalenos

Ligantes azanaftalenos são compostos orgânicos N-heterocíclicos solúveis em água com estrutura derivada da quinolina, que é uma molécula que apresenta dois anéis de seis membros fundidos onde um desses anéis apresenta um nitrogênio no lugar do carbono, como mostrado na figura 10:

Figura 10: Estrutura da quinolina.



Fonte: Autor.

A literatura sobre esses compostos não é muito extensa, porém essa classe de ligantes apresentam um papel importante contra algumas doenças tropicais. Há registros de que a quinina, um derivado na quinolina, seja utilizada a mais de 400 anos no combate à malária [101].

Além disso, encontra-se na literatura artigos mostrando certa atividade biológica dessa classe de compostos frente ao combate de algumas doenças negligenciadas, como por exemplo, a malária [102] [103] [101] e o mal de chagas [104] [105] [106].

Em 1976 foi publicado um artigo avaliando derivados do 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina no combate a úlceras e possível atividade antissecretora [107].

2.6 Cinética de troca de ligantes

Metalofármacos com taxa de troca de ligantes mais lentas, comparáveis aos processos de divisão celular, no geral apresentam alta eficiência no combate contra determinadas linhagens de células de câncer [108]. Esse fato é particularmente interessante para metalofármacos baseados em platina e rutênio, em geral compostos metálicos contendo a platina apresentam cinética de troca de ligantes na ordem de 10^{-5} s^{-1}, já complexos metálicos de rutênio apresenta uma cinética de troca de seus ligantes consideravelmente maior que a da platina, 10^{-3} s^{-1}.Quando o assunto é troca de ligantes é inescapável não citar o exemplo da cis-platina, que só apresenta potencial atividade anticâncer após ocorrer a substituição dos ligantes Cl^- por moléculas de água. É por esse motivo que a cis-platina é chamada de pró-droga, uma vez que antes de apresentar qualquer atividade contra o câncer precisa ser convertida em um novo complexo, o cis-diaminodiaquoplatina (II) ou cis-diaminoacquocloroplatina (II) [109]. Mostra-se que, embora muito se saiba sobre o mecanismo molecular de ação da cisplatina, muitas questões ainda não foram respondidas. Para complexos de rutênio com potencial atividade anticancerígenas, os estudos mecanísticos moleculares estão apenas no começo.

Os mecanismos de troca dos ligantes dependem tanto do ligante já coordenado quanto do ligante que vai assumir sua posição, e sobretudo depende da natureza do íon metálico central. Compostos de Pt(II), que apresentam geometria quadrado planar e se apresentam coordenados a 4 ligantes, geralmente trocam seus ligantes através de um mecanismo associativo. Nesse tipo de mecanismo primeiro ocorre a entrada do novo ligante – etapa lenta da reação – para posteriormente haver a saída do ligante abandonador, em determinando instante há um complexo intermediário com 5 ligantes. Já para complexos de Ru(III), de geometria octaédrica, o mecanismo que determina a substituição é o dissociativo. Nesse caso, ocorre a perda de um ligante gerando

um intermediário penta-coordenado, e posteriormente ocorre a ligação com o ligante de entrada [110] [111].

2.7 Biomoléculas e suas interações com complexos de coordenação

É sabido que íons metálicos exercem papéis fundamentais no sistema biológico, além de estarem presentes na formação de estruturas moleculares [112]. Esses compostos apresentam uma certa capacidade em perder elétrons formando espécies carregadas positivamente que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos [48]. É, sobretudo, nessa forma catiônica que os complexos desempenham seu papel biológico. Essa deficiência em elétrons facilita a interação com biomoléculas, como por exemplo o ácido desoxirribonucleico (DNA) e albumina séria humana (HSA), uma vez que a maioria delas sãos ricas em elétrons. Com cargas opostas, biomoléculas e complexos metálicos tem uma tendência natural em interagirem e se ligarem. O mesmo ocorre com moléculas pequenas cruciais à vida, como o O_2. Deste modo, não é surpreendente que a natureza utilize complexos metálicos para desempenhar funções essenciais aos organismos vivos [113].

Os complexos metálicos realizam uma ampla variedade de tarefas biológicas, como o transporte e armazenamento de oxigênio no sangue através do centro ferro-heme da hemoglobina, transporte de elétrons no processo final do metabolismo. O zinco, por exemplo, forma estruturas chamadas *dedos de zinco* que são domínios proteicos que se ligam ao DNA regulando a função dos genes nos núcleos das células, além disso é componente natural da insulina, uma substância essencial mantenedora do metabolismo do açúcar [48]. Íons metálicos como sódio e potássio são responsáveis pelo transporte de impulsos nervosos. Um outro exemplo que pode ser citado é o caso do cobalto (Co) encontrado na composição da vitamina B12. Já o cobre, zinco, ferro e manganês são incorporados em proteínas catalíticas (enzimas), que facilitam uma infinidade de reações químicas necessárias à vida [48] [113].

2.7.1 Albumina Sérica Humana

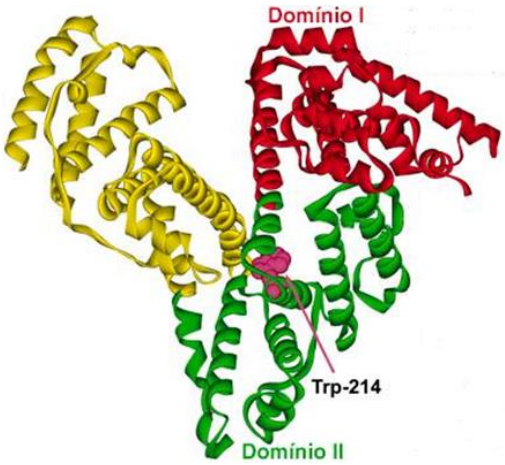
A albumina sérica humana, representada na figura 11, é a proteína mais abundante no plasma, representando 50 a 60% do total das proteínas séricas. Esta proteína de 66 kDa é bastante versátil, podendo transportar diferentes compostos por todo o corpo [114]. Cada molécula de HSA pode transportar até 7 moléculas de ácidos graxos de cadeia longa que são insolúveis no soro. A HSA apresenta um tempo de meia-vida relativamente grande, aproximadamente 19 dias e possui uma capacidade única de se ligar, covalentemente ou reversivelmente, a um grande número de compostos endógenos (bilirrubina e íons metálicos, por exemplo) e exógenos (metalofármacos, por exemplo) [115].

A ligação reversível desta a metalofármacos é uma estratégia incrível frente ao aumento do tempo de meia-vida bem como a possibilidade de distribuição dos metalofármacos em todo o corpo [114] [116] [117]. Devido a essas características, é possível supor que qualquer metalofármaco administrado apresentará algum tipo de interação com a HSA, o que fundamentalmente poderia determinar a sua biodisponibilidade e toxicologia. No entanto, relativamente poucos estudos mecanísticos detalhados foram realizados sobre tais interações, em comparação com os estudos com o DNA [118].

A natureza e a intensidade das interações metalofármaco-albumina influenciam significativamente a farmacocinética e os parâmetros de ligação são úteis no estudo da ligação fármaco-proteína à medida que interferem grandemente na absorção, distribuição, metabolismo e excreção, propriedades típicas de drogas [118]. A HSA também contribui para a regulação da pressão osmótica sanguínea e é a maior responsável pelo controle do pH do sangue [115].

É importante, para esse trabalho, saber que a HSA possui um único resíduo de triptofano na posição 214 (Trp, posição 214) e resíduos de tirosina (Tyr), que conferem a ela propriedades fluorescentes, que possibilitam o estudo de interação da HSA com os compostos de interesse através de medidas de espectroscopia de fluorescência [119].

Figura 11: Estrutura da HSA.

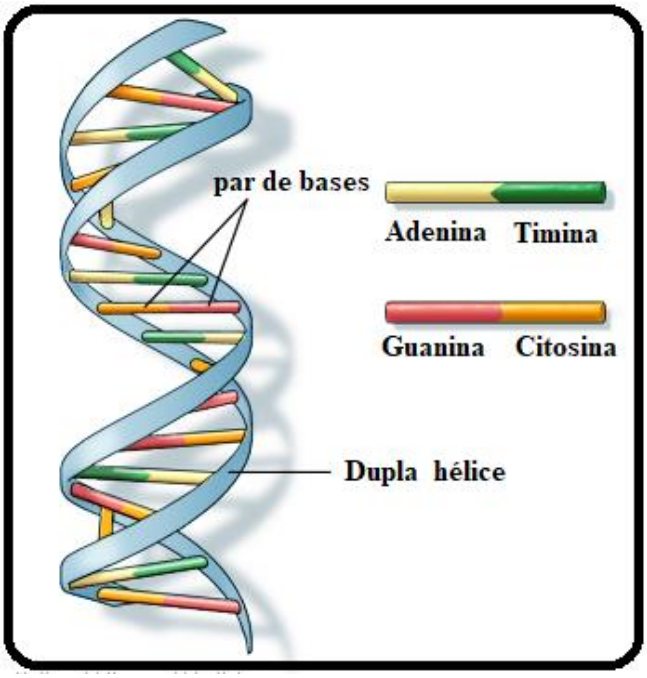


Fonte: Imagem de domínio público coletada da internet, adaptada.

2.7.2 DNA

O ácido desoxirribonucleico ou simplesmente DNA, é uma macromolécula extremamente complexa. Teve sua estrutura em dupla hélice proposta há mais de meio século, por Watson e Crick [120]. É composto por duas cadeias de nucleotídeos que se ligam através de ligação de hidrogênio entre as bases complementares, adenina (A) se ligando a timina (T) (A-T) e a guanina (G) se ligando a citosina (C) (G=C), de cada fita [121], como mostrado na figura 12.

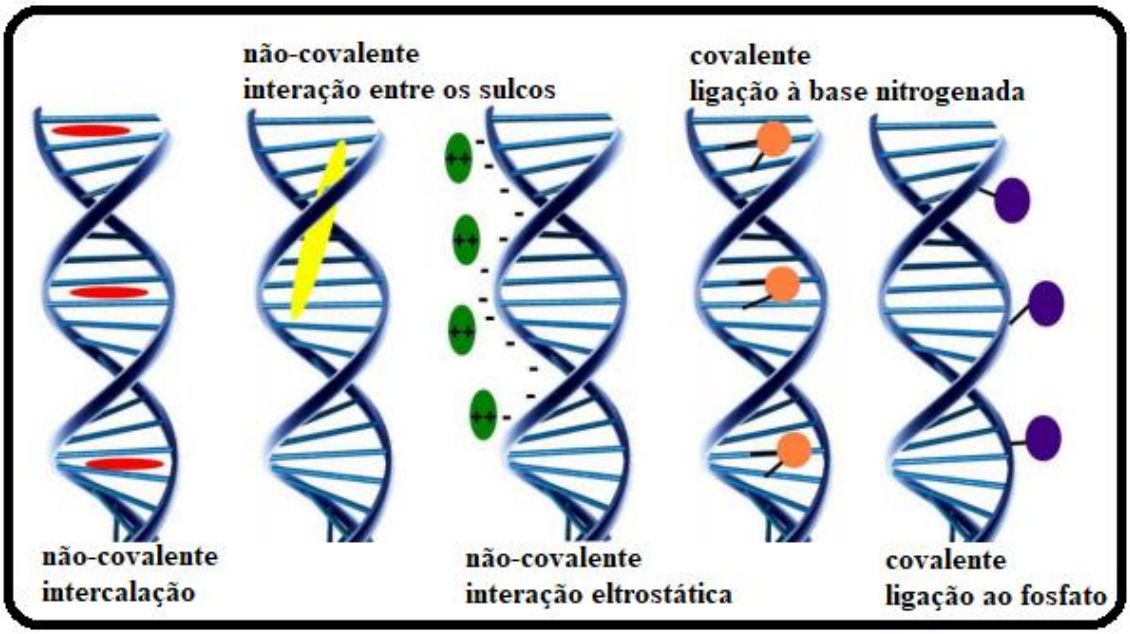
Figura 12: Representação da estrutura do DNA.



Fonte: Imagem de domínio público coletada da internet, adaptada.

Assim como a HSA, o DNA também é uns dos alvos principais no estudo de interação entre possíveis candidatos a metalofármacos. A ideia de interação DNA-metalofármaco está relacionada ao fato do DNA regular funções celulares, a partir da modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação. Visto a complexidade da estrutura do DNA é de se esperar que sua interação com complexos metálicos ocorra de várias maneiras. São observadas interações não-covalente que ocorrem majoritariamente por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, forças hidrofóbicas e/ou eletrostáticas. Pode ainda ocorrer interações covalentes através da ligação direta às bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato, como resumido na figura abaixo [122].

Figura 13: Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA**.**



Fonte: Adaptado de [123].

A intercalação ocorre preferencialmente com complexos que apresentam pelo menos um ligante heterocíclico aromático – estrutura planar – ocorrendo assim um “empilhamento” desse ligante entre as bases nitrogenadas do DNA. De um modo geral, compostos que se ligam aos sulcos menores do DNA apresentam anéis aromáticos com determinada liberdade rotacional e estrutural curvadas que facilitam as interações de van der Waals e/ou ligações de hidrogênio. Já as ligações não-covalente externas as fitas de DNA são de natureza puramente eletrostática [124] [125].

Então, através espectroscopia eletrônica de absorção pode-se estudar e compreender melhor como ocorre a ligação/interação entre o composto metálico e o DNA.

2.8 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças provenientes do crescimento descontrolado e desorganizado de células anormais (células que sofreram algum tipo de mutação), com potencial para invadir e espalhar-se para outras partes do corpo, processo chamado de metástase. Pode surgir de qualquer tipo de célula e de qualquer tecido do organismo, apresentando um período de evolução longo, podendo muitas vezes, levar anos para evoluir até ser descoberto [126].

Fatores externos e/ou fatores internos ao organismo podem ser responsáveis pelo aparecimento do câncer. Por fatores externos entende-se os hábitos pessoais de cada indivíduo – alcoolismo, uso indiscriminado de medicamentos, tabagismo, tipo de alimentação, hábitos sexuais – e aqueles relacionados ao meio ambiente – poluição, radiação, fatores ocupacionais. Já os fatores internos estão diretamente ligados as mutações genéticas relacionadas a hereditariedade [127]. A mutação das células saudáveis gerando células cancerígenas pode ser do tipo genética que provoca alterações na sequência do DNA; pode ocorrer através de radiações que quebram o DNA nos cromossomos ou ainda através de vírus que introduzem DNAs “estranhos” nas células saudáveis.

Quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica são os métodos clássicos de combate ao câncer. O primeiro deles é baseado na utilização de fármacos citotóxicos que impede a multiplicação celular, sobretudo das células tumorais que apresentam uma velocidade de proliferação alta. No entanto, é sabido que tratamentos com esses fármacos causam morte celular de células saudáveis desencadeando uma série de efeitos adversos ao organismo. A radioterapia freia o crescimento e proliferação celular através de radiações ionizantes, que podem ser eletromagnéticas – Raios-X ou gama – ou particuladas – partículas α e β, prótons e nêutrons – mais uma vez, tem-se como problema que ao mesmo tempo que combate as células do câncer também atinge os tecidos normais,

causando reação inflamatória local. Por último tem-se a cirurgia que é indicada na remoção de tumores localizados, não indicada para casos de metástases. No entanto, todos os tratamentos citados são demorados e causam muita dor – física e psicológica – aos pacientes [128].

Pautado no que foi dito até agora, fica clara a necessidade do desenvolvimento de processos, bem como medicamentos, que permitam uma ação apenas contra as células tumorais, de modo a permitir que os tecidos saudáveis não sofram nenhum tipo de alteração, diminuindo assim os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento.

2.9 Alergias

As alergias podem ser desencadeadas por diversos fatores, como: medicamentos, alimentação, insetos, fungos, látex, animais, pólen e tecidos, além disso podem ser causadas por stress ou ainda terem uma razão genética [129].

São um grupo de condições médicas promovidas pela hipersensibilidade do sistema imunológico a determinadas substâncias – chamadas de alergenios – que no geral causam pouco ou nenhum problema na maioria das pessoas [130]. Em termos técnicos, segundo a Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI), *"um alergenio é um antígeno capaz de estimular uma reação de hipersensibilidade tipo I em indivíduos atópicos por meio de respostas da imunoglobulina E (IgE). A maioria dos seres humanos apresentam respostas significativas da IgE apenas como uma defesa contra infecções parasitárias. No entanto, alguns indivíduos podem responder a muitos antígenos ambientais comuns. Essa predisposição hereditária é chamada de atopia. Em indivíduos atópicos, os antígenos não parasitários estimulam a produção inapropriada de IgE, levando à hipersensibilidade do tipo I."* [131]

Após as respostas das IgE a determinando alergenio, ocorre a ligação das mesmas aos receptores de afinidade, chamado de FcεRI, que estão localizados nas membranas dos mastócitos – células presentes nas mucosas, pele e vias respiratórias, que liberam histamina e outras substâncias químicas que auxiliam no combate a alergia – o que leva à sensibilização destas células [132]. Caso ocorra um novo encontro com o mesmo alergenio, uma "memória celular" é

ativada, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, que terminam com a produção da histamina, serotonina e outras substâncias química pelos mastócitos e consequente auxílio ao combate da alergia [133] [134].

Então, as buscas por complexos metálicos capazes de atuar nessa cascata de eventos intracelulares em busca de melhores respostas alérgicas representam uma área de estudo muito importante.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma rota sintética para obtenção de um complexo binuclear de rutênio com ponte µ-oxo inédito, posteriormente caracterizá-lo, avaliar sua atividade biológica, estudar a cinética de troca de ligantes bem como compará-lo com complexo trinuclear de rutênio análogo.

Para isso, algumas etapas foram traçadas:

1. Síntese e purificação do complexo binuclear de rutênio com ponte µ-oxo com o ligante azanaftaleno 5,6,7,8 tetraisoquinolina;
2. Elucidação estrutural do composto através da Espectrometria de Massas, Análise Elementar e Difração de Raios-X em monocristal;
3. Caracterização desse composto através da Espectroscopia de Absorção na região do Uv-Visível, Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H, Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho e Voltametria Cíclica;
4. Estudo de cinética de troca de ligantes THIQ;
5. Estudo da interação com biomoléculas alvo – DNA de esperma de peixe e Albumina Sérica Humana.
6. Comparação da atividade biológica entre o complexo binuclear e seu análogo trinuclear;
7. Avaliação do potencial biológico frente a células de câncer de pele e mama e também seu potencial anti-alérgico,

4 MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes, em grau analítico, foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia. Os reagentes e sua procedência estão mostrados na tabela abaixo:

Tabela 1: Reagentes utilizados.

Nome	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol^{-1})	Procedência
5,6,7,8- tetraisoquinolina	$C_9H_{11}N$	133,19	Aldrich
Cloreto de Rutênio	$RuCl_3.nH_2O$	207,43	Aldrich
Piridina	C_5H_5N	79,1	Aldrich
Acetona	CH_3COCH_3	58,08	Neon
Acetonitrila	CH_3CN	41,05	J.T. Baker
Acetonitrila-d_3	CD_3CN	42,05	Aldrich
Ácido acético	CH_3COOH	60,05	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	HCl	34,46	Panreac
Ácido trifluoroacético	CF_3CO_2H	114,02	Aldrich
Albumina sérica humana (HSA)	-	66 kDa	Sigma
Alumina	Al_2O_3	-	Aldrich
Cloreto de rutênio (III)	$RuCl_3.nH_2O$	207,43	Aldrich
Diclorometano	Cl_2CH_2	84,93	Merck
Dimetilamina	$(CH_3)_2NH$	45,08	Aldrich
DNA de esperma de peixe *fs* – DNA	-	-	Sigma
Etanol	CH_3CH_2OH	46,07	Synth
Hexafluorofosfato de amônio	NH_4PF_6	163,00	Sigma-Aldrich
Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio	$C_{16}H_{36}F_6NP$ ($TBAPF_6$)	387,43	Aldrich
Metanol	CH_3OH	32,04	Vetec
Peneira Molecular	-	-	Aldrich
Tris base	$NH_2(CH_2OH)_3$	109,12	Merck

Fonte: Autor.

4.2 Rota Sintética

4.2.1 Síntese do precursor $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_6](PF_6)_2$;

O complexo percursor foi sintetizado adaptando-se a rota descrita por Sasaki e colaboradores [96] [135].

Pesou-se 1,00 g (4,84 x10^{-3} mols) de $RuCl_3.nH_2O$. Essa massa foi transferida para um balão contendo 120,0 ml de água, 80,0 ml de ácido acético e 40,0 ml de etanol. Iniciou-se o aquecimento a 70 ^oC e agitação por 10 minutos, nesse ponto observou-se mudança da coloração de marrom escuro para vermelho.

Em seguida, adicionou-se 6,00 ml (7,50 x10^{-2} mols) de piridina e sob agitação e refluxo a reação prosseguiu por 1 hora. A solução passou de vermelha para azul escura, resfriou-se a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 6,00 g NH_4PF_6 (3,70 x10^{-2} mols).

Rotaevaporou-se até um volume de aproximadamente 1/6 do inicial (40,0 ml), em seguida adicionou-se o mesmo volume de água. O balão foi mantido sob refrigeração por 13 horas. Houve então a formação de um precipitado azul que foi filtrado e lavado com água gelada por 5 vezes.

Esse mesmo sólido azul foi novamente solubilizado em 50,0 ml de acetonitrila com 10 gotas de piridina, a solução foi aquecida até 80 ^oC por 20 minutos. Adicionou-se a mesma quantidade de água e deixou-se o meio na geladeira aproximadamente 12 horas. Assim como descrito na literatura, esperava-se uma nova precipitação do sólido azul, porém isso não ocorreu. Então rotaevaporou-se a solução por completo. O sólido obtido foi seco em dessecador a vácuo e utilizado como percussor para próxima etapa de síntese.

4.2.2 Síntese do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$;

Adicionou-se 0,900 g (8,18 x10^{-4} mols) do complexo percursor sintetizado na etapa anterior, $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_6](PF_6)_2$, em 80,0 ml de acetonitrila. Em seguida adicionou-se 0,440 ml do ligante THIQ (1,63 x10^{-3} mols). A solução foi mantida sob aquecimento controlado, importante ressaltar que a temperatura nunca passou de 65 ^oC, por exatamente 75 minutos.

Essa solução foi resfriada à temperatura ambiente e rotaevaporada até reduzir seu volume pela metade, completou com o mesmo volume de água. O balão foi posto sob refrigeração por exatos 7 dias. Observou-se a formação de uma grande quantidade de precipitado azul formado no fundo do balão. Fez-se a filtração e lavou-se o sólido com água gelada por 5 vezes.

Após algumas caracterizações notou-se traços de algum subproduto indesejado e fez-se cromatografia em coluna. Fase estacionária: alumina neutra empacotada com diclorometano (DCM). O complexo foi solubilizado em diclorometano. O complexo de interesse eluiu em fase móvel 47 % DCM e 53 % de ACN (acetonitrila). Rotaveporou-se e secou à massa constante, obtendo-se então o complexo desejado $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(C_9H_{11}N)_2](PF_6)_2$. (η= 89,0%, equivalente a 0,888 g).

4.3 Análise Elementar

A análise elementar (CHN) foi realizada no Instituto de Química da USP, campus São Paulo. As amostras envidas (aproximadamente 6,0 mg) são sujeitas à combustão em atmosfera de oxigênio puro e posteriormente quantificadas em um detector TCD (detector de condutividade térmica) utilizando-se o equipamento Perkin Elmer 2400 series II.

4.4 Difração de Raios-X em monocristal (DRX)

A aquisição dos dados de Difração de Raios-X de monocristal foi realizada em um difratrômetro Bruker Apex II CCD usando radiação monocromática com comprimento de onda igual a 0,71703 Å (Mo Kα). Os dados foram indexados e escalonados usando o conjunto de softwares ApexII Suite, SAINT V8.34A e Olex2. A estrutura foi resolvida com o programa ShelXT usando métodos diretos e refinada usando o programa ShelXL.

4.5 Espectrometria de Massas – Ionização por spray eletrolítico (ESI)

A análise ESI-Q-TOF-MS/MS foi realizada utilizando o equipamento microTOF QII da Bruker. O sólido foi diluído em um acetonitrila e o modo de detecção foi positivo

4.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização estrutural do complexo, foi realizada através de medidas de 1H-RMN. Os espectros de 1H-RMN e COSY foram obtidos no espectrômetro Bruker DRX-500 de 500 MHz, adquiridos em acetonitrila-d_3 em solução de 10^{-2}M.

4.7 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros de absorção na região UV-vis-NIR foram registrados em um espectrofotômetro Agilent HP8453 com resolução de ±1 nm, na região de 190 a 1100 nm, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absortividade molar (ε) obtidos a partir da Lei de Beer-Lambert.

4.8 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em um Espectrofotômetro Prestige 21 Schimadzu 02190, na região de 400 a 4000 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1}. As amostras foram feitas no estado sólido utilizando-se pastilha de brometo de potássio previamente seco (KBr). Foram pesadas aproximadamente 3,00 mg de complexo para 200 mg de KBr.

4.9 Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos através de potenciostado BAS CV-27. Os dados foram registrados em um gravador Omnigraphic® 100 Recorder - Houston Instruments. Utilizou-se eletrodos de platina (trabalho e auxiliar) e Ag/AgCl como eletrodo de referência, em uma solução de acetonitrila seca e 0,1 M do eletrólito suporte tetrafluoroborato de tetrabutilamônio, TBA(BF_4), em acetonitrila. Uma cela eletroquímica de 5,0 ml foi utilizada nesse experimento. Os dados obtidos foram exportados para o Adobe Photoshop® onde foram tratados e plotados no Origin 8.0®.

4.10 HPLC (High-perfomance liquid chromatography)

Para o estudo de cinética de troca de ligantes foi empregado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kioto, Japão), composto por detector Uv-Vis SPD – M20A, bombas de duplo pistão modelo LC – 10AD e uma controladora SIL – 20ª, todos também da marca Shimadzu. Foi utilizado um injetor manual CTO – 10A da ainda da Shimadzu. O software utilizado para adquirir os dados foi o LabSolutions. Em todo o experimento utilizou-se uma coluna Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4.6 x 250 mm). Como fase móvel utilizou-se um gradiente de concentração variando a porcentagem de acetontrila em água, e 0,1 % de DEA (dimetilamina) e 0,2 % de TFA (ácido trifluoroacético).

A amostra injetada foi preparada solubilizando-se previamente a massa de complexo pesado no mínimo de acetontrila possível, em seguida completou-se o volume do balão com água. O conteúdo foi transferido para um tubo *Falcon* que foi mantido no banho nas temperaturas de 25, 37 e 49 ^{o}C. Alíquotas foram coletadas de tempos em tempos até a observação do consumo total do complexo intermediário (ausência do primeiro pico), esse tempo variou entre as temperaturas.

4.11 Espectroscopia de Luminescência – Interação com HSA

Primeiramente, para realização das medidas de espectroscopia de luminescência, foi feita uma solução estoque de albumina sérica humana em tampão tris(pH – 7,2), com concentração final 1,000 x10^{-4} mol L^{-1}. Transferiu-se 0,0660 g de HSA para um balão de 10 ml e completou-se o volume com solução tampão, aguardou-se a solubilização total da HSA. Em seguida, transferiu-se 0,0500 ml da solução estoque para um balão volumétrico de 5,00 ml e completou-se com solução tampão, resultando em uma concentração final de HSA de 1,000 x10^{-6} mol L^{-1}. Pesou-se 0,00229 g (1,89 x10^{-6} mols) do complexo binuclear de rutênio e solubilizou-se em 300 µL de acetonitrila.

Os espectros de luminescência foram obtidos a partir de um espectrofluorímetro da marca Shimadzu. 3,0 ml dessa nova solução de HSA foi adicionada à uma cubeta de quartzo, onde posteriormente adicionou-se sucessivas alíquotas de 2,0 µL do complexo supressor. É importante ressaltar que foram realizadas 15 adições do complexo supressor, resultando um total de 30,0 µl desse complexo, equivalente a 1,00% de solvente orgânico no sistema contendo 3,0 ml de HSA em tampão tris. As medidas foram realizadas em cinco temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49 ^{o}C) a fim de se entender como se dá o mecanismo de supressão desse sistema. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 280 nm e em 295 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa entre 300 e 550 nm. O primeiro espectro foi retirado apenas com a solução de albumina, com o tempo de incubação de 5 minutos, após isso, adicionaram-se alíquotas sucessivas do complexo com tempo de incubação de 5 minutos. A largura das fendas de excitação e emissão utilizadas foi de 5 nm.

Para o estudo da supressão de luminescência fez-se necessário à correção das leituras da intensidade de fluorescência devido ao efeito filtro. A fórmula abaixo foi utilizada:

Equação 3

$$F_{corrigido} = F_{observado} . 10^{\frac{(\boldsymbol{A_{emissão}} + \boldsymbol{A_{excitação}})}{2}}$$

onde, $F_{observado}$ é a fluorescência obtida experimentalmente para dada concentração, $A_{emissão}$ é a absorbância no valor de comprimento de onda máximo de fluorescência e $A_{excitação}$ é a absorbância para o valor de excitação do sistema (280 nm ou 295nm) [136].

4.11.1 Estudo da interação do complexo binuclear de rutênio com a HSA

A supressão de fluorescência está relacionada a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma amostra [137] [138]. Essa diminuição da intensidade de fluorescência pode ocorrer através de diversos processos. Tais processos são: reações no estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia, supressão estática e supressão colisional (ou dinâmica). Para ocorrer supressão colisional e/ou estática é necessário que haja um encontro entre o fluoróforo – nesse caso a HSA – e o agente supressor – o complexo binuclear de rutênio –, como resultado consegue-se extrair informações importantes a respeito dessa interação [139].

O processo não radiativo mais simples de transferência de energia é a supressão colisional (ou dinâmica) de fluorescência, que ocorre quando o agente supressor se difunde ao fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado. Após breve contato, o fluoróforo volta ao estado fundamental sem emissão de fóton. Via de regra, a supressão dinâmica ocorre sem nenhuma modificação permanente na molécula, isto é, sem nenhuma reação fotoquímica. Em termos quantitativos, a supressão de fluorescência é dada pela seguinte equação de Stern-Volmer:

Equação 4

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

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente; k_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão de fluorescência; τ_0 e τ é o tempo de vida do fluoróforo na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente; [Q] é a concentração do agente supressor e K_{sv} é constante de Stern-Volmer,

relacionada ao tipo de supressão de fluorescência. k_q informa a eficiência da supressão e a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores [139].

As deduções mostradas abaixo foram baseadas nas referências [137] [138] [139].

MECANISMO DINÂMICO DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

O mecanismo de supressão ocorre a partir de um estado excitado. A presença de um supressor introduz uma via adicional e não-radiativa para supressão desse estado excitado. Portanto, o tempo de vida (τ_0) de fluorescência é diminuído.

Mecanismos envolvidos no processo de supressão de fluorescência dinâmica:

HSA + *hv* → HSA* (k_{abs} – constante de absorção) excitação

HSA* → HSA + calor (k_{ic} – constante de conversão interna) conversão interna

HSA* → HSA + *hv´* (k_f – constante de fluorescência) fluorescência

HSA* + [Complexo] → HSA + [Complexo]* (k_q - constante de velocidade bimolecular de supressão de fluorescência) supressão

O rendimento quântico de fluorescência Φ é dado pelo quociente entre os fótons emitidos (I_{em}) e absorvidos (I_{abs}):

Equação 5

$$\Phi = \frac{I_{em}}{I_{abs}}$$

O número de fótons emitidos depende da concentração do fluoróforo (HSA) no estado excitado e da constante de fluorescência (k_f):

Equação 6

$$I_{em} = k_f . [HSA^*]$$

O número de fótons absorvidos depende da concentração do fluoróforo e da constante de absorção (k_{abs}):

Equação 7

$$I_{abs} = k_{abs}[HSA]$$

É muito complicado medir a taxa do processo de absorção de fótons devido à sua alta velocidade. Porém, em condições de estado estacionário, a população do estado excitado e a sua supressão (desativação) se equilibram.

Visto isso, pode-se expressar I_{abs} como:

Equação 8

$$I_{abs} = k_f[HSA^*] + k_{ic}[HSA^*] + k_q[HSA^*][Complexo]$$

A expressão do rendimento quântico (equação 5) pode ser reescrita, da seguinte maneira:

Equação 9

$$\Phi = \frac{k_f.[HSA^*]}{k_f.[HSA^*] + k_{ic}.[HSA^*] + k_q.[HSA^*][Complexo]}$$

[HSA*] aparece em todos os termos da equação acima, podendo então ser cancelado, tem-se:

Equação 10

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_q.[Complexo]}$$

Agora, não é mais necessário mensurar a concentração de fluoróforos no estado excitado ([HSA*]).

Na ausência do supressor de fluorescência ([Complexo]) o rendimento quântico de fluorescência (Φ_0) é dado pelo quociente das constantes, então:

[Complexo] = 0 (zero)

Equação 11

$$\Phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_{ic}}$$

O efeito do supressor na fluorescência pode ser expresso pela razão entre as equações 11 e 10, assim:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{k_f}{k_f + k_{ic}} . \frac{k_f + k_{ic} + k_q[Complexo]}{k_f} =$$

$$\frac{k_f + k_{ic} + k_q[Complexo]}{k_f + k_{ic}} =$$

$$\frac{k_f}{k_f + k_{ic}} + \frac{k_{ic}}{k_f + k_{ic}} + \frac{k_q[Complexo]}{k_f + k_{ic}} =$$

$$\frac{1}{k_{ic}} + \frac{1}{k_f} + \frac{k_q[Complexo]}{k_f + k_{ic}} =$$

Equação 12

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + \frac{k_q[Complexo]}{k_f + k_{ic}}$$

A equação acima apresenta diversas constantes que não podem ser mensuradas através dos experimentos realizados. Porém, pode-se utilizar o tempo de vida do estado excitado para continuar a análise.

O tempo de vida do estado excitado (τ) é praticamente o inverso das somas das constantes de fluorescência (k_f), de conversão interna (k_{ic}) e de supressão (k_q).

Equação 13

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_q[Complexo]}$$

Considerando que a concentração do supressor seja zero, o tempo de vida do estado excitado (τ_0) é:

Equação 14

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_{ic}}$$

Resgatando-se as equações 10 e 11, fazendo-se a substituição necessárias utilizando-se das equações 13 e 14, tem-se que:

Equação 15

$$\Phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_{ic}} = \frac{k_f}{\frac{1}{\tau_0}} = k_f.\tau_0$$

Equação 16

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_q.[Complexo]} = \frac{k_f}{\frac{1}{\tau_0} + k_q.[Complexo]}$$

Dessa forma, a razão entre o rendimento quântico de supressão na ausência e presença do supressor é dado por:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\frac{k_f}{\frac{1}{\tau_0}}}{\frac{k_f}{\frac{1}{\tau_0}+k_q[Complexo]}} = 1 + k_q.\tau_0.[Complexo]$$

Equação 17

$$= 1 + K_{sv}[Complexo]$$

onde, K_{sv} é constante bimolecular de supressão de Stern-Volmer.

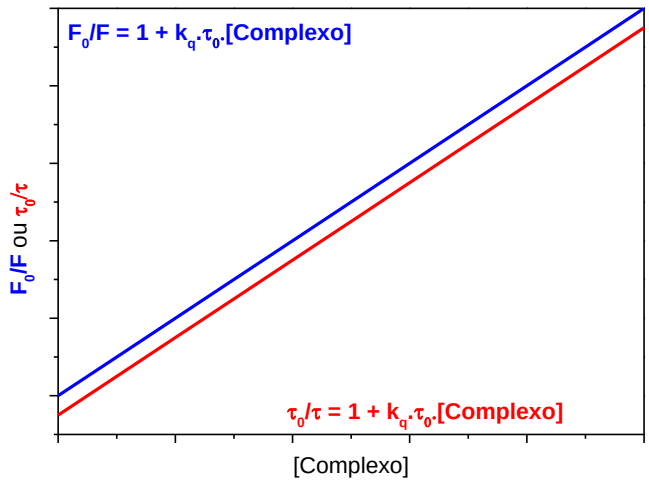
Por fim, sabe-se que os valores de rendimento quântico de fluorescência são proporcionais as intensidades de fluorescência do sistema na ausência (F_0) e na presença do supressor (F):

Equação 18

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Complexo]$$

Graficamente o mecanismo puramente dinâmico de supressão de fluorescência é representado conforme mostrado abaixo:

Figura 14: Perfil do gráfico obtido para um mecanismo de supressão de fluorescência puramente dinâmico.



Fonte: Autor.

A constante bimolecular de supressão (k_q) está relacionada com a constante difusional (k_{dif}) que limita o processo e com a eficiência dos choques que promovem a supressão (γ), através da equação:

Equação 19

$$k_q = \gamma k_{dif}$$

Os valores típicos de k_{dif} para fluoróforos e supressores livres é aproximadamente $2x10^{10}$ $M^{-1}s^{-1}$.

Para processos de supressão de fluorescência do tipo dinâmico, os valores de k_q serão obrigatoriamente menores que os valores da constante difusional, uma vez que a eficiência de choques que promovem a supressão (γ) sempre será menor que 1 (entende-se 1 como 100% dos choques entre supressor e fluoróforo levando a supressão de fluorescência)

Quanto ao mecanismo estático de supressão de fluorescência, sabe-se que este não reduz o tempo de vida da amostra, uma vez que o fluoróforo e o supressor formam um novo complexo estável não fluorescente, o qual absorve luz mas retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton. Nesse caso, a supressão de fluorescência ocorre devido à redução do número de moléculas

fluorescentes, contrariamente ao que ocorre no processo de supressão dinâmico. [154] [139]. Para este tipo de mecanismo a equação da supressão de fluorescência é dada a partir da equação abaixo:

Equação 20

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_a[Q]$$

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente; $[Q]$ é a concentração de agente supressor e K_a é constante de associação do complexo [139].

As deduções mostradas abaixo foram baseadas nas referências [137] [138] [139].

MECANISMO ESTÁTICO DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

Mecanismos envolvidos no processo de supressão de fluorescência estática:

Equação 21

$$[HSA] + [Complexo] \xrightarrow{\boldsymbol{K_a}} [HSA - Complexo]$$

Equação 22

$$[HSA - Complexo] \xrightarrow{\boldsymbol{h\nu}} [HSA - Complexo]^*$$

A partir da equação 21, tem-se que a constante de associação (K_a), deste processo é:

Equação 23

$$K_a = \frac{[HSA - Complexo]}{[HSA].[Complexo]}$$

$$[HSA - Complexo] = K_a.([HSA].[Complexo])$$

Considerando que a concentração total de $[HSA]_0$ seja:

Equação 24

$$[HSA]_0 = [HSA] + [HSA - Complexo]$$

Substituindo-se as concentrações pelas intensidades de fluorescência, têm-se:

Equação 25

$$F_0 = [HSA]_0 = [HSA] + [HSA - Complexo]$$

Equação 26

$$F = [HSA]$$

Dessa forma, a razão entre as equações 25 e 26 é dada por:

Equação 27

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[HSA] + [HSA - Complexo]}{[HSA]}$$

Utilizando-se a equação 23 para substituir um termo da equação 27, tem-se:

Equação 28

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[HSA] + K_a.([HSA].[Complexo])}{[HSA]}$$

Fazendo as modificações, obtém-se:

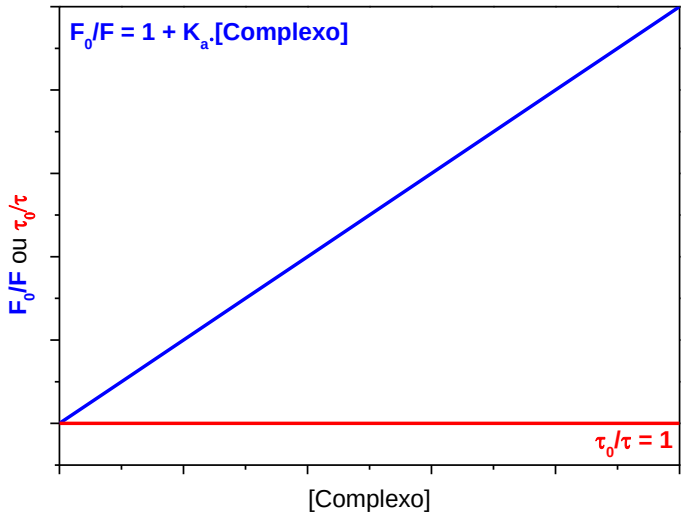
Equação 29

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_a.[Complexo]$$

onde, K_a é constante de associação do complexo ao fluoróforo.

Graficamente o mecanismo puramente estático de supressão de fluorescência é representado conforme mostrado abaixo:

Figura 15: Perfil do gráfico obtido para um mecanismo de supressão de fluorescência puramente estático.



Fonte: Autor

Nem sempre ocorre apenas um mecanismo de supressão de fluorescência, em alguns sistemas poderão coexistir os dois tipos de processos de supressão simultaneamente. Nesses casos a equação de supressão será:

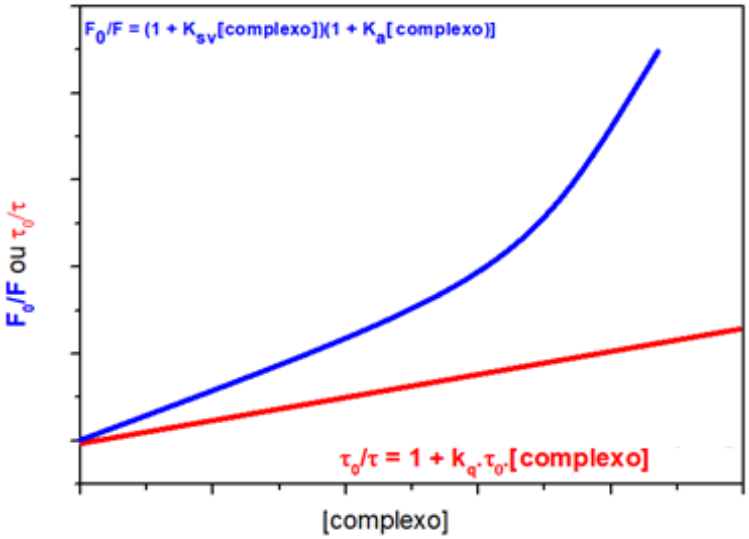
Equação 30

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{sv}[Complexo]).(1 + K_a.[Complexo])$$

É importante ressaltar que a existência dos dois tipos de mecanismos de supressão de fluorescência num sistema, resulta em um ajuste não linear e um desvio positivo da equação de Stern-Volmer [140].

Graficamente quando os dois mecanismos são representados tem-se o perfil abaixo:

Figura 16: Perfil do gráfico obtido para supressão de fluorescência a partir dos dois mecanismos: estático e dinâmico.



Fonte: Autor.

Porém, quando se analisa um sistema inédito, como apresentado a seguir, não se sabe por qual mecanismo (ou quais) a supressão de fluorescência está ocorrendo, por isso alguns parâmetros devem ser estudados a fim de se obter tal informação.

A melhor forma de se fazer a distinção entre os mecanismos estático e dinâmico é através de medidas de tempo de vida: a supressão de fluorescência estática retira uma fração dos fluoróforos observados, uma vez que, os fluoróforos complexados não apresentam fluorescência, observando-se assim somente a fluorescência dos fluoróforos não complexados. A fração de fluoróforos não complexada não é perturbada, e o tempo de vida permanecerá constante e igual a τ_0. Então para supressão estática tem-se $\tau_0/\tau = 1$. Em contraste para a supressão dinâmica $\tau_0/\tau = F_0/F$ [139] [140].

A diferenciação entre os dois processos também pode ser feita através da relação da dependência de K_{sv} em função da temperatura. O processo de supressão dinâmico depende da colisão entre o fluoróforo e o supressor resultando na diminuição de fluorescência do sistema. Este processo é controlado pela difusão, que aumenta com a temperatura. Por outro lado, no processo estático, tem-se a formação de um complexo entre o supressor e o fluoróforo, que tem sua formação favorecida ou desfavorecida com o aumento da temperatura, devido a maior ou menor, respectivamente, estabilidade do novo

complexo formado entre o supressor e o fluoróforo. Portanto, quando K_{sv} aumenta com a elevação da temperatura tem-se um processo de supressão de fluorescência predominantemente dinâmico, já quando ocorre diminuição nos valores da constante de K_{sv} com o aumento da temperatura tem-se um processo de supressão do tipo estático [140].

Outra forma de distinção entre a supressão estática e dinâmica envolve a análise dos espectros de absorção do fluoróforo e supressor. A supressão dinâmica tem influência apenas sobre os estados excitados dos fluoróforos, ou seja, não se observa mudança alguma no espectro de absorção. Já no processo estático a formação do complexo no estado fundamental geralmente resulta em diferenças no espectro de absorção do fluoróforo [139].

4.1 Medidas de Tempo de Vida

Os experimentos de tempo de vida foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

O sistema utilizado para excitação consiste na utilização de um conjunto de lasers: no início do processo, um laser de diodo, com dois feixes emitindo em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de estado sólido ($Nd:YVO_4$ - MilleniaXs - SpectraPhysics) que emite em 1064 nm. Em seguida o feixe passa por um cristal dobrador de frequências e o feixe final, com potência máxima de 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira (Tsunami - SpectraPhysics). O cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro birefringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída. Passando por um sistema selecionador de frequências, esses pulsos de laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequências entre 0,01 e 8 MHz, que são mais adequadas ao método de contagem de fótons únicos.

Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundos e terceiros harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação de nossas amostras, 295 nm. O sinal detectado

como pulso de excitação, chamado IRF (*instrument response function*), possui largura total à meia altura igual a 60 ps.

Foi utilizada uma cubeta de quartzo, fez-se uma solução estoque de HSA em tampão tris (pH - 7,2) de concentração conhecida, onde se adicionou alíquotas de uma solução contendo o complexo (supressor). O experimento foi realizado em 3 temperaturas diferentes (25, 37 e 49 ºC).

4.2 Dicroísmo Circular

As medidas de espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira.

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram adquiridos numa faixa entre 200-260 nm na temperatura de 25 ºC através de um espectropolarímetro JASCO-810. Cada espectro acumulou 4 varreduras, à 50 nm/min com uma fenda de 1 nm de largura e 1 segundo de resposta. As medidas foram realizadas utilizando uma cubeta de 1 mm de caminho óptico, com uma concentração de albumina de $1x10^{-6}$ mol/L, e a concentração dos complexos variou de 0 a 5,0 $x10^{-5}$ mol/L, em tampão tris 50 mM, pH – 7,2. Todos os espectros foram corrigidos para as contribuições do tampão e convertidos para MRE (elipsidade média do resíduo) em $deg.cm^2.dmol^{-1}$, segundo a equação abaixo:

Equação 31

$$MRE = \frac{M.\theta}{10.d.c.r}$$

onde, M é a massa molecular da proteína; θ é a elipsidade; d é o caminho óptico; c é a concentração da proteína na amostra em mg/mL e r é o número estimado de resíduos da proteína.

Para o cálculo da porcentagem de α-hélice na proteína utiliza-se a Equação 32:

Equação 32

$$\%\alpha - hélice = \frac{\theta_{208} - 4000}{33000 - 4000} x100$$

onde, θ_{208} corresponde a elipsidade molecular em 208 nm; 33000 é a elipsidade para 100 % de estrutura α-hélice e 4000 é a elipsidade para 0 % de estrutura α-hélice na proteína [141] [142].

4.3 Titulação Espectrofotométrica na Região do UV-visível – Interação com DNA

Esse experimento tem como objetivo avaliar o modo de interação do complexo de interesse ao DNA, esse experimento foi realizado de acordo com protocolo já definido [143] [144]. Para tanto, utilizou-se o DNA de esperma de peixe (*fs*-DNA) que é economicamente mais vantajoso que o DNA de timo de carneiro e apresenta resultados igualmente satisfatórios.

Primeiramente preparou-se uma solução do tampão tris (50 mM, com 5mM de NaCl, pH - 7,2). O *fs*-DNA é um pó de coloração amarelada e pode ser pesado de acordo com a concentração desejada para realização do experimento. Foi pesado 10,0 mg do DNA que foi dissolvido em 10,0 mL da solução tampão tris. Agitou-se a solução com cuidado até que todo DNA estivesse totalmente solubilizado. Após o preparo e durante todo o experimento, essa solução foi mantida em banho de gelo, para evitar a degradação do *fs*-DNA. Além disso, a solução foi feita e utilizada no mesmo dia. A concentração da solução de *fs*-DNA foi calculada de acordo com a Lei de Lambert Beer (equação 6):

Equação 33

$$c = \frac{A}{\varepsilon b}$$

onde, c é a concentração em $mol.L^{-1}$; A é absorção em 260 nm; ε é o coeficiente de absortividade molar do DNA em 260 nm, que equivale a 6600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ [143]; e b é o caminho óptico, que vale 1 cm.

Segundo o protocolo, o *fs*-DNA está livre de proteínas (desenovelado das histonas) e consequentemente apto para uso quando a razão entre a absorbância em 260 e 280 nm é maior que 1,50. Para o presente experimento essa relação apresenta um valor de 1,78 [144].

As titulações foram acompanhadas pelo registro de espectros de absorção na região UV-vis. O experimento foi realizado em cinco temperaturas

(25, 31, 37, 43 e 49 ºC). À cubeta adicionou-se uma solução do complexo de concentração 4,2 x10^{-5} mol.L^{-1} e em seguida foram sendo adicionadas alíquotas da solução recém preparada de DNA. Utilizando-se do tratamento matemático baseado no método de Benesi-Hildebrand, foi possível obter a constante de ligação K_b de formação do complexo binuclear de rutênio com o *fs*-DNA.

As deduções mostradas abaixo foram baseadas nas referências [143] [144].

MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND

O objetivo aqui é o estudo da interação entre o DNA e o [Complexo]:

Equação 34

fs-DNA + [Complexo] $\rightleftharpoons$ DNA-[Complexo]

Para se observar a ligação ou interação entre o DNA e o [Complexo] utiliza-se a espectroscopia eletrônica na região do UV-vís. A base por trás desse método baseia-se no fato de que absorbância adquirida deve ser uma mistura do DNA, [Complexo] e do novo complexo formado DNA-[Complexo].

Equação 35

$$A^{total} = A^{\mathrm{DNA}} + A^{[Complexo]} + A^{\mathrm{DNA-[Complexo]}}$$

onde, A^{total} é a absorbância total do sistema; A^{DNA} é a absorbância do DNA; $A^{[Complexo]}$ é a absorbância do complexo binuclear de rutênio livre; $A^{DNA\text{-}[Complexo]}$ é a absorbância da nova espécie formada.

Assumindo-se que a concentração inicial do complexo ($[Complexo]_0$) é muito maior que a concentração inicial do DNA ($[DNA]_0$), pode-se desconsiderar o valor da absorbância do DNA, então:

Equação 36

$$A^{total} = A^{[Complexo]} + A^{\mathrm{DNA-[Complexo]}}$$

A absorbância pode ser medida antes e depois da formação da nova espécie (DNA-[Complexo]). Essa variação na absorbância (ΔA) é obtida experimentalmente, sendo A_0 a absorbância da cubeta contendo apenas o

[Complexo], ou seja, antes da formação da nova espécie e A é a absorbância em qualquer ponto da reação:

Equação 37

$$\Delta A = A - A^0$$

Usando a lei de Lambert-Beer, a equação 37 pode ser reescrita em termos de coeficiente de absorção e concentração de cada componente:

Equação 38

$$\Delta A = \varepsilon_{[DNA-[Complexo]]}.b.\left[\mathrm{DNA} - [[Complexo]\right] + \varepsilon_{[Complexo]}.b.[[Complexo]] - \varepsilon_{[Complexo]}.b.[[Complexo]_0]$$

Como dito anteriormente $[\text{Complexo}]_0$ >>> $[\text{DNA}]_0$, então espera-se que o valor da $[\text{Complexo}]_0$ seja igual o valor da [Complexo], com isso pode-se simplificar a Equação 38, tem-se então:

Equação 39

$$\Delta A = \varepsilon_{[fs-DNA-[Complexo]]}.b.\left[\mathrm{DNA} - [[Complexo]\right]$$

Uma isoterma de ligação pode ser descrita como a *"diferença teórica de concentração de um componente em função da concentração de outro componente à temperatura constante".* Como descrito na equação abaixo:

Equação 40

$$[DNA - [Complexo]] = \frac{K_b.[Complexo]_0.[DNA]}{1 + K_b[DNA]}$$

Antes de continuar a análise do método de Benesi-Hildebrand, vale a pena elucidar a dedução da Equação 40. Considerando-se a Equação 34 tem-se:

Equação 41

$$K_b = \frac{[DNA - [Complexo]}{[DNA].[Complexo]}$$

onde, K_b é constante de ligação.

Pode-se substituir a concentração do complexo binuclear de rutênio pela concentração inicial do mesmo subtraindo a concentração da nova espécie formada, como mostrado abaixo:

Equação 42

$$K_b = \frac{[DNA - [Complexo]}{[DNA].([Complexo]_0 - [DNA - [Complexo])}$$

Fazendo-se os devidos desenvolvimentos matemáticos, tem-se:

Equação 43

$$K_b = \frac{[DNA - [Complexo]}{[DNA].[Complexo]_0 - [DNA].[DNA - [Complexo]]}$$

$$K_b.[DNA].[Complexo]_0 - K_b.[DNA].[DNA - [Complexo]] = [DNA - [Complexo]]$$

$$K_b.[DNA].[Complexo]_0 = [DNA - [Complexo]] + K_b.[DNA].[DNA - [Complexo]]$$

$$K_b.[DNA].[Complexo]_0 = [DNA - [Complexo].(1 + K_b[DNA])$$

$$[DNA - [Complexo]] = \frac{K_b.[DNA].[Complexo]_0}{1 + K_b[DNA]}$$

Voltando-se a análise do método de Benesi-Hildebrand, pode-se substituir a Equação 40 na Equação 39:

Equação 44

$$\Delta A = \frac{\varepsilon.b.K_b.[DNA].[Complexo]_0}{1 + K_b[DNA]}$$

Importante ressaltar que nesse ponto assume-se que a concentração de DNA para determinado tempo sempre será igual a concentração inicial de DNA, uma vez que se acredita que todo o DNA esteja interagindo com o complexo binuclear de rutênio.

Fazendo-se as devidas modificações da Equação 44, tem-se:

Equação 45

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\varepsilon . b . K_b . [DNA]_0 . [Complexo]_0} + \frac{K_b . [DNA]_0}{\varepsilon . b . [Complexo]_0 . K_b . [DNA]_0}$$

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\varepsilon . b . K_b . [DNA]_0 . [Complexo]_0} + \frac{1}{\varepsilon . b . [Complexo]_0}$$

A Equação final obtida pode ser comparada com uma equação de reta do tipo y = a.x + b. Onde a partir de uma representação gráfica é possível obter os valores da constante de ligação, K_b.

A partir do gráfico de 1/ΔA (eixo y) *versus* 1/[DNA] (eixo x), tem-se:

Equação 46

$$coeficiente\ linear = \frac{1}{\varepsilon . b . [Complexo]_0}$$

$$coeficiente\ angular = \frac{1}{\varepsilon . b . [DNA]_0 . [Complexo]_0 . K_b}$$

Portanto, K_b é:

Equação 47

$$K_b = \frac{coeficiente\ linear}{coeficiente\ angular}$$

Além disso, através da equação de van't Hoff (Equação 48), é possível determinar os parâmetros termodinâmicos desse sistema.

Equação 48

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

onde, K_b é a constante de ligação na temperatura T, ΔH é a variação da entalpia, R é a constante dos gases ideais (8,31447 J mol^{-1} K^{-1}) e ΔS é a variação da entropia do sistema.

Através de um gráfico de ln(K_b) (eixo y) versus 1/T (em Kelvin), obtém-se a variação entalpia do sistema através do coeficiente angular da reta e através

do coeficiente linear a variação de entropia. E através da equação abaixo fica possível cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG) para cada temperatura:

Equação 49

$$\Delta G = -RTlnK_b$$

4.4 Atividade Antialérgica

Os ensaios de atividade antialérgica foram realizados, em colaboração com a Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela especialista de laboratório Maria Perpétua Freire de Morais Del Lama.

4.4.1 Preparação das Células

As células RBL-2H3 [134] cresceram em frascos de cultura de células, com capacidade para 250,0 mL, em meio mínimo essencial de cultura (MEM): CellGro: foi preparado pela mistura de 800 mL MEM, suplementado com sal de Eagles, 200 mL de soro fetal bovino, 20 mL de L-glutamina e 1 mL de gentamicina. As células aderidas em monocamadas foram coletadas 2 a 4 dias após a repicagem e tratadas com tripsina-EDTA, durante 10 minutos, a 37 °C. Em seguida foram centrifugadas, ressuspensas com densidade igual a 5 x10^5 células/mL e sensibilizadas pela adição de anti-DNP-IgE. Por fim, 100 μL da suspensão de células foram colocados em uma placa de cultura com 96 compartimentos e incubadas durante toda a noite a 37 °C e 5 % de CO_2.

4.4.2 Ensaio de potencial antialérgico: quantificação da enzima β-hexosaminidase (β-hex)

As células RBL sensibilizadas pela IgE e aderidas em microplacas foram lavadas em tampão de Tyrode pH 7,4 a temperatura ambiente e incubadas após a adição de 100 µL dos complexos (concentrações finais na faixa de 2 a 300 µM) por 20 min à 37 °C e 5 % de CO_2. Em seguida, foram estimuladas pela adição de 100 μL do antígeno (DNP-BSA na concentração final de 0,1 µg/mL) e incubadas por 1 h a 37 °C e 5 % de CO_2. Em seguida foram adicionados 100 μL do substrato fluorimétrico para β-hex (3,6 mM) e as amostras incubadas por mais

30 minutos, à 37 °C. A liberação espontânea e a liberação total da β-hex (100 %), foram determinadas para as células em tampão e em 0,1% de Triton X-100, respectivamente. A atividade de β-hex no sobrenadante foi quantificada por fluorescência em um leitor para microplacas com λ_{exc} e λ_{em} iguais a 360 e 450 nm, respectivamente. A β-hex liberada foi expressa como uma porcentagem da β-hex total, determinada pelas células destruídas com Triton-X-100.

A liberação espontânea de β-hexosaminidase foi medida para eliminar componentes não-específicos da degranulação. A reação enzimática foi realizada na presença de tampão de Tyrode para eliminar as interferências causadas pela fluorescência do mesmo. A contribuição da amostra teste para a fluorescência foi avaliada separadamente e subtraída. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows, empregando-se a análise de variância ANOVA ONE-WAY.

4.5 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais

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

4.5.1 Cultivo de células B16-F10, MCF7 e L929

Os estudos biológicos foram conduzidos nas linhagens tumorais B16-F10 (melanoma murino), adquirida do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) e também em células não-tumorais L929 (fibroblasto murino).

Para o cultivo das células de melanoma e fibroblasto murino utilizou-se o meio de Cultura RPMI-1640 (fornecido pela Sigma-Aldrich® com 25 mM de HEPES, com L-glutamina, acrescido de 2,0 g de bicarbonato de sódio. O pH da solução foi ajustado em 7,4, sendo acrescentados 1,0 % (v/v) de solução antibiótico/antimicótico e 10,0 % (v/v) de soro fetal bovino, e o volume completado para 1,0 L. O meio foi esterilizado por meio de um sistema de filtração à vácuo. A linhagem MCF7 foi cultivada em em meio de cultura

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) acrescido de 3,7 g de bicarbonato de sódio, suplementado com 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

As linhagens foram cultivadas em garrafas para cultura celular de 75 cm^2 e mantidas em estufa a 37 °C, 5,0 % (v/v) de CO_2 e 99,0% de umidade relativa, com troca de meio em média a cada 2 dias.

4.5.2 Ensaios de Viabilidade Celular

Ao atingir aproximadamente 90 % de confluência nas garrafas de cultura, as células foram soltas. Retirou-se o meio e adicionou-se a solução de Tripsina/EDTA, as garrafas foram mantidas na estufa por 5 minutos e após esse período avaliou-se com auxílio do microscópio se as mesmas se encontravam de fatos soltas.

À suspensão celular obtida foi recolhida, foi adicionado meio de cultivo completo e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 1200 r.p.m., após esse processo o sobrenadante foi descartado, um novo meio adicionado e as células suspensas novamente.

O número de células foi determinado em microscópio invertido, com o auxílio da câmara de Neubauer. Após a contagem, calculou-se a densidade celular da amostra através da equação 50.

Equação 50

$$Número\ de\ células = \frac{\mathbf{\Sigma\ n°\ de\ células}}{4} x10^4 x Fator\ de\ diluição$$

Após o cultivo e determinação do número de células, as mesmas foram aplicadas em placas de cultura com 96 poços de modo a se obter 1 x 10^5 células/poço e mantidas em estufa por 24 horas para adesão. Em seguida, o meio foi retirado e a cada um dos poços adicionados os tratamentos contendo os complexos em diferentes concentrações, juntamente com o meio de cultivo. As células tratadas foram mantidas em estufa por 24 horas.

Após o período de incubação avaliou-se a viabilidade celular através do uso do ensaio colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)] [145].

Para o ensaio de MTT após o período de incubação, foi retirado o meio e adicionados 0,18 mL do mesmo meio, porém sem o indicador vermelho de fenol e 0,02 mL de solução de MTT a cada um dos poços, em seguida da adição do MTT, as células foram mantidas em estufa por 3 horas. Posteriormente, o conteúdo foi removido, sendo adicionados 0,2 mL de DMSO para solubilizar o precipitado formado, após 1 hora e 30 minutos foi feita a leitura da absorbância em 490 nm, em leitor de microplacas e a porcentagem de viabilidade celular calculada de acordo com a equação 51, dado que os valores foram expressos em percentuais em comparação ao grupo controle (sem adição do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2)$.

Equação 51

$$\%\ células\ viáveis = \frac{absorbância\ do\ tratado}{absorbância\ do\ controle} x100$$

Os experimentos foram realizados em triplicata sendo a análise estatística realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0. One-way ANOVA - Newman-Keuls Multiple Comparison Test foi usado para comparar os resultados para os diferentes tratamentos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, com valor de significância de $P<0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sínteses

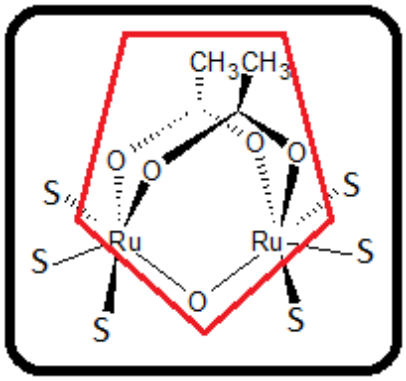
Os reais problemas de desenvolvimento deste projeto estão diretamente ligados a dificuldade em obtenção de complexos binucleares de rutênio com grau de pureza e rendimento suficientemente altos para que fossem feitas as demais análises/caracterizações. Como descrito no primeiro item apresentado nesta tese, os complexos binucleares de rutênio são percursores para formação de complexos trinucleares de rutênio análogos, por isso o monitoramento rigoroso por espectroscopia eletrônica é muito importante durante toda etapa de síntese. A princípio seriam sintetizados quatro complexos binucleares de rutênio e então suas propriedades seriam comparadas em função da variação dos ligantes, como isso não foi possível e em busca de um enriquecimento deste trabalho, serão feitas comparações entre complexos trinucleares e binucleares de rutênio análogos, quando pertinente.

A síntese desenvolvida para a obtenção do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, foi adaptada de dois artigos principais publicado por Sasaki e colaboradores [96] [135].

A primeira etapa dessa síntese compreende a formação do complexo percursor de fórmula molecular $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$.

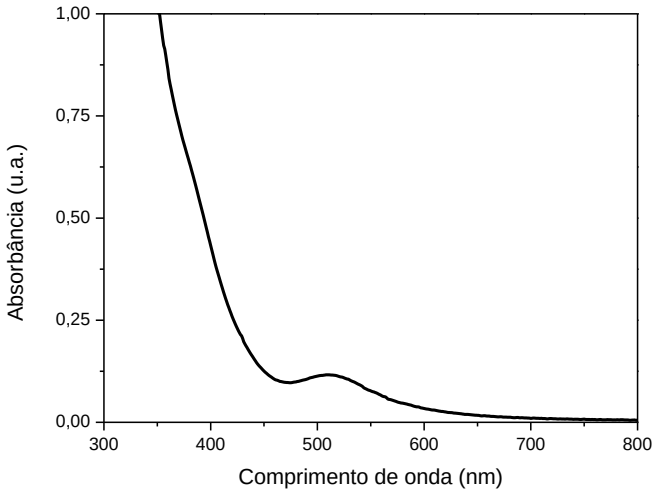
A partir do cloreto de rutênio (III) ($RuCl_3.nH_2O$) em solução com ácido acético, água e etanol sob aquecimento de 70 ^oC por 10 minutos forma-se a unidade $[Ru_2O]$. Por unidade $[Ru_2O]$ entende-se a formação da estrutura mostrada abaixo, onde há dois rutênios ligados em ponte por um átomo de oxigênio (ponte μ-oxo). Observa-se ainda dois carboxilatos provenientes do ácido acético ligados em ponte. É importante ressaltar dois indícios principais de formação da estrutura mostrada na figura 17, o primeiro diz respeito a coloração da solução que passa de marrom para vermelho intenso, com a formação de uma banda característica na região de 500 nm, mostrada na figura 18.

Figura 17: Estrutura do complexo percursor sintetizado evidenciando a chamada unidade [Ru_2O].



Fonte: Autor.

Figura 18: Espectro de absorção na região do UV-vis evidenciando a formação da unidade [Ru_2O], em acetonitrila.



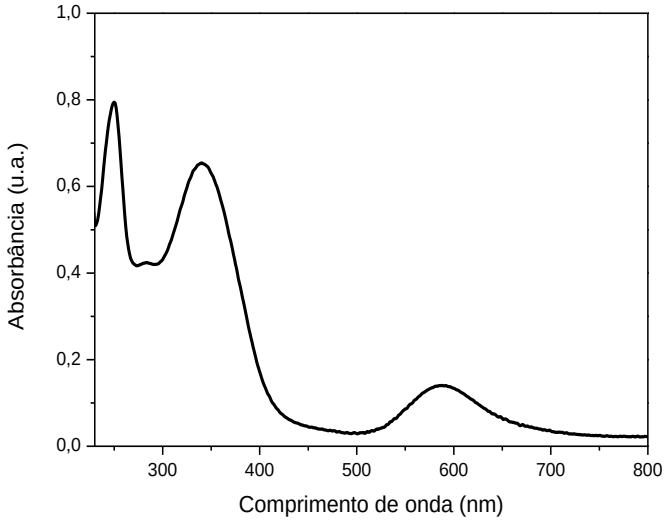
Fonte: Autor.

Conforme mostrado na figura 18, tem-se o aparecimento de uma banda característica em 508 nm. É relevante apontar que a formação da unidade [Ru_2O] é considerada uma reação de automontagem e que o controle da temperatura é extremamente importante, uma vez que essa estrutura pode colapsar e se dissociar, voltando a se apresentar como um complexo mononuclear de rutênio ou então evoluir e formar complexos trinucleares de rutênio.

Posteriormente a essa etapa adicionou-se 6,0 ml de piridina e manteve-se a reação sob refluxo e agitação por 1 hora. Nesse ponto há dois indícios de que a reação esteja procedendo conforme o planejado. Primeiramente nota-se

uma mudança de coloração da reação de vermelho para azul escuro e também um deslocamento da banda em 500 nm para região entre 580-600 nm. Um novo espectro de UV-vis foi adquirido e está mostrado na figura 19.

Figura 19: Espectro de absorção na região do UV-vis do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$.



Fonte: Autor.

Observa-se ainda, a existência de duas bandas em comprimentos de onda menores, que estão diretamente relacionadas aos ligantes piridínicos coordenados aos átomos de rutênio.

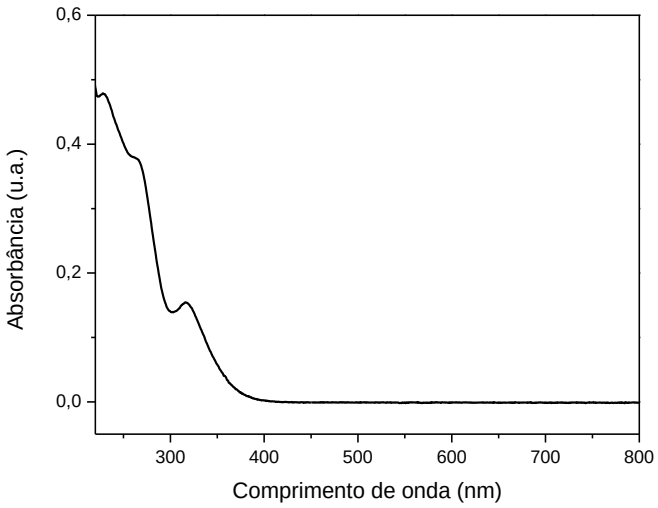
Dessa forma, o perfil eletrônico é muito parecido ao observado por Sasaki e colaboradores, evidenciando a formação do complexo percursor de interesse.

Partindo-se do complexo percursor, a ideia agora é substituir as duas piridinas que estão localizadas na posição *trans* a ligação Ru-O-Ru. A substituição ocorre preferencialmente nessa posição devido, sobretudo, ao Efeito Trans. Esse efeito é responsável por um enfraquecimento da ligação Ru-py que decorre do fato da alta eletronegatividade do átomo de oxigênio ligado em ponte deslocar a densidade eletrônica dos átomos de metais para si, fazendo com o que o compartilhamento de elétrons do rutênio com o ligante piridínico seja menor e consequentemente essa ligação terá um comprimento maior sendo mais fácil de ser quebrada.

Então, adicionou-se uma quantidade estequiométrica do ligante THIQ e procedeu-se a reação como descrito anteriormente. O composto foi seco à vácuo em um dessecador contendo sílica e por fim purificado.

Procurando entender melhor como ocorre a formação da ponte μ-oxo investigou-se de onde seria proveniente o oxigênio ligado aos dois átomos de rutênio. Para tanto, realizou-se uma síntese mantendo-se a temperatura em 70 ºC e tempo de reação de 10 minutos, porém todos os solventes foram secos previamente e não se utilizou água no meio reacional. Essa simples abordagem nos mostrou que na ausência de água não ocorre a formação da unidade binuclear de rutênio, decorre desse fato um forte indício que o oxigênio ligado em ponte aos íons metálicos seja proveniente da água utilizada no meio reacional. Abaixo mostra-se o espectro eletrônico do produto obtido na síntese realizada na ausência de água.

Figura 20: Espectro eletrônico do produto obtido na ausência de água.



Fonte: Autor.

5.1 Análise Elementar

A análise elementar é uma ferramenta importante em termos de concordar com toda caracterização feita até agora. Consegue-se verificar se as análises estão corretas e verificar a composição e pureza do complexo binuclear de rutênio obtido. A tabela 2 compara os valores obtidos através do método e sua comparação com o valor teórico.

Tabela 2: Valores teóricos e obtidos para análise elementar do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$.

Elemento	Valor teórico (%)	Valor obtido (%)	Erro (%)
H	**4,00**	**4,11**	**2,7**
C	**41,7**	**43,4**	**4,1**
N	**6,95**	**6,74**	**3,0**

Fonte: Autor.

Quando analisada sozinha, a análise elementar é uma técnica que oferece poucos resultados, porém quando usada com os demais métodos de caracterização é uma ferramenta importante que corrobora com os resultados já obtidos. Pela análise dos dados acima, conclui-se que a proposição estrutural do complexo está de acordo com o que foi elucidado. Pode-se então, prosseguir estudos com biomoléculas alvo.

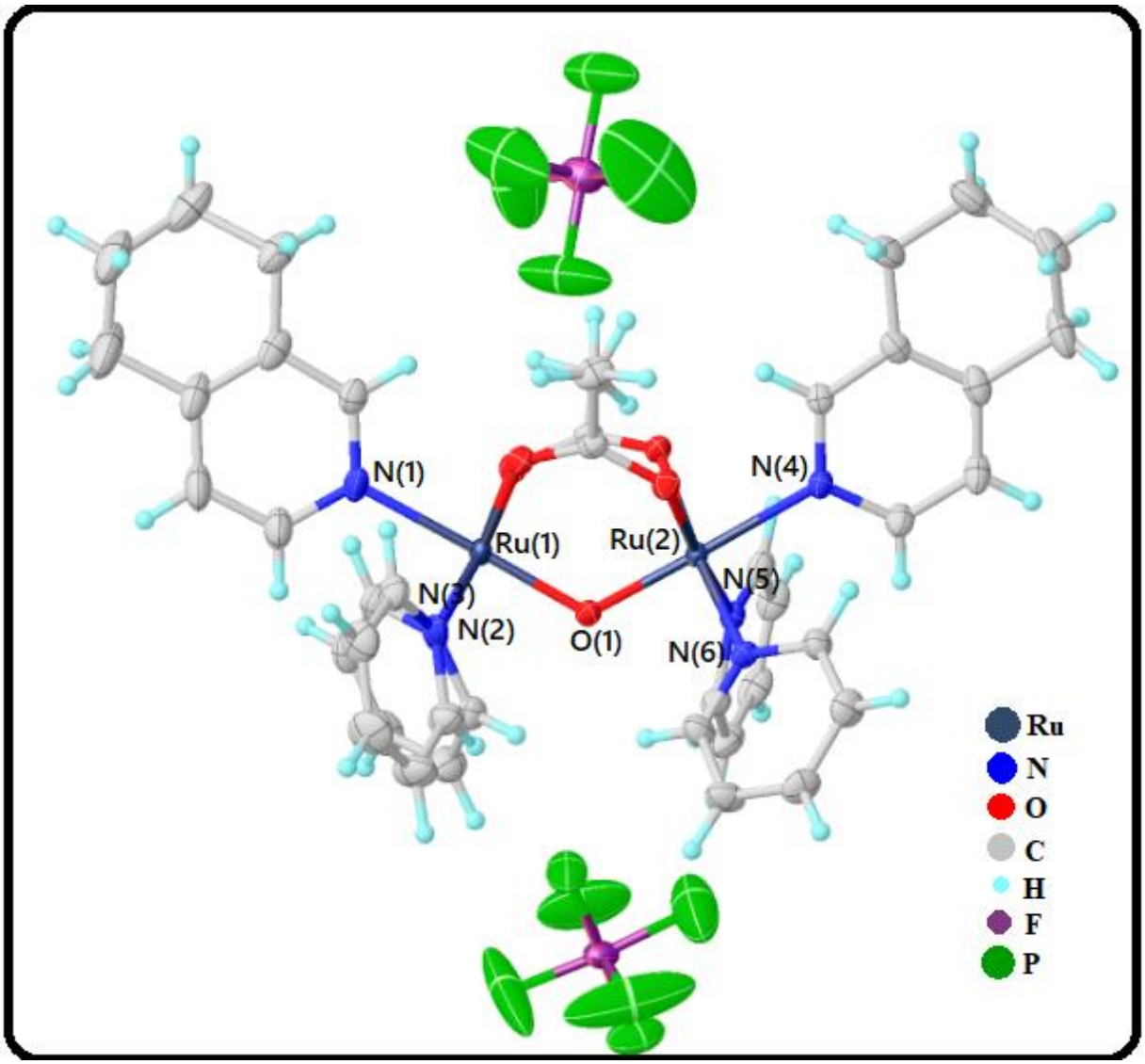
5.2 Raios-X

Felizmente foi possível a obtenção de cristais para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ após a purificação por coluna cromatográfica, sendo realizada então a análise de DRX. Os cristais foram crescidos por evapoaração lenta do solvente acetonitrila em um tubo de RMN.

A figura 21 mostra o complexo sintetizado e purificado. Nota-se claramente a presença de dois contra-íons $(PF_6)^-$. Através dessa informação pode-se afirmar que os dois átomos de rutênio apresentam estado de oxidação +3. Esse valor é obtido considerando-se que o complexo seja formado por dois acetatos (CH_3COO^-) com 1 carga negativa cada um, um íon de óxido (O^{2-}) ligado em ponte a dois átomos de rutênio com carga +3 cada um. A somatória total das cargas mencionadas previamente é +2, que é zerada com dois íons PF_6^-.

O complexo cristalizou em um sistema ortorrombico, grupo espacial Pbca (Tabela 3) e os íons Ru^{3+} estão em um arranjo triangular no complexo.

Figura 21: Estrutura do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ a partir de medidas de Raios-X.



Fonte: Autor.

A tabela 3, resume os dados cristalográficos obtidos pelo refinamento da estrutura do complexo.

Tabela 3: Dados cristalográficos obtidos pelo refinamento da estrutura do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$	
Fórmula empírica	$C_{42}H_{48}F_{12}N_6O_5P_2Ru_2$
Massa molecular	1208,94 $g.mol^{-1}$
Temperatura	150 K
Comprimento de onda de radição	0,71073 Å
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	P*bca*
Dimensões da cela unitária	*a* = 18.2949 (13) Å *b* = 13.9856 (10) Å *c* = 37.686 (3) Å
Volume	9642.5 (12) $Å^3$
Z	8

Fonte: Autor.

Já a tabela abaixo resume os comprimentos e ângulos das ligações que ocorrem na unidade $[Ru_2O]$ e também nas ligações Ru-py e Ru-THIQ.

Tabela 4: Comprimentos e ângulos das ligações da unidade $[Ru_2O]$, Ru-py e Ru-THIQ.

Comprimento das ligações (Å)		Ângulos de ligação (º)	
O(1)—Ru(1)	1.865 (2)	Ru**(1)**—O**(1)**—Ru**(2)**	121.77 (11)
O(1)—Ru(2)	1.867 (2)		
N(1)—Ru(1)	**2.151 (3)**	O(1)—Ru(1)—N(1)	177.02 (10)
N(2)—Ru(1)	2.086 (3)	O(1)—Ru(1)—N(2)	88.33 (10)
N(3)—Ru(1)	2.087 (3)	O(1)—Ru(1)—N(3)	89.45 (10)
N(4)—Ru(2)	**2.145 (3)**	O(1)—Ru(2)—N(4)	177.23 (11)
N(5)—Ru(2)	2.087 (3)	O(1)—Ru(2)—N(5)	91.35 (10)
N(6)—Ru(2)	2.084 (3)	O(1)—Ru(2)—N(6)	88.30 (10)

Fonte: Autor.

Os dados apresentados acima concordam com artigos encontrados na literatura para complexos análogos. Esses artigos dizem que o ângulo das ligações Ru-O-Ru está entre 120 e 125º, para o caso do complexo mostrado nessa tese o ângulo é de aproximadamente 122º.

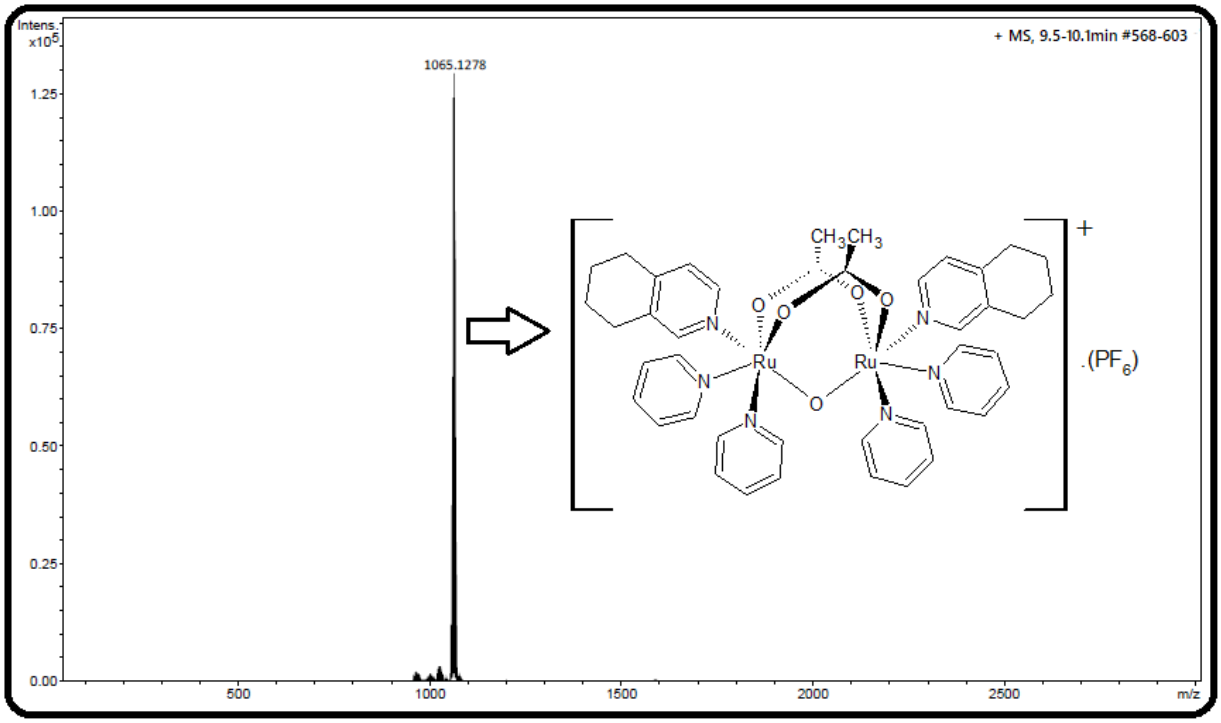
Uma outra informação bastante importante diz respeito ao comprimento das ligações dos ligantes THIQ à unidade [Ru_2O]. Como pode ser visto na tabela 4, têm-se duas ligações com comprimentos maiores (2.151 e 2.145 (Å)) correspondente aos ligantes THIQ *trans* a ligação Ru-O. Os demais comprimentos de ligação estão relacionados aos ligantes piridínicos também ligados aos átomos de rutênio (2,086, 2087, 2087 e 2,084 (Å)).

5.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é bastante utilizada na caracterização e elucidação estrutural de diversas moléculas, incluindo compostos de coordenação e organometálicos [146]]. Análises em equipamentos de alta resolução, como o utilizado para a caracterização do complexo mostrado nesta tese, fornecem informações importantes quanto a massa exata dos fragmentos dos íons, é possível a observação da distribuição isotópica característica do íon metálico presente no complexo e por fim, utilizando a separação da razão *m/z* (massa/carga) fica fácil determinar a carga do íon ou fragmento observado [147] [148].

A espectrometria de massas é uma ferramenta de confirmação quando se tem dados de Raios-X. Como pode ser vista na figura 22, o complexo apresenta-se com uma pureza bastante significativa pois observa-se basicamente um sinal de *m/z* 1065,1278. Observa-se alguns outros picos pequenos que correspondem a menos de 3 % em relação ao pico base.

Figura 22: Espectro de massas do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$.



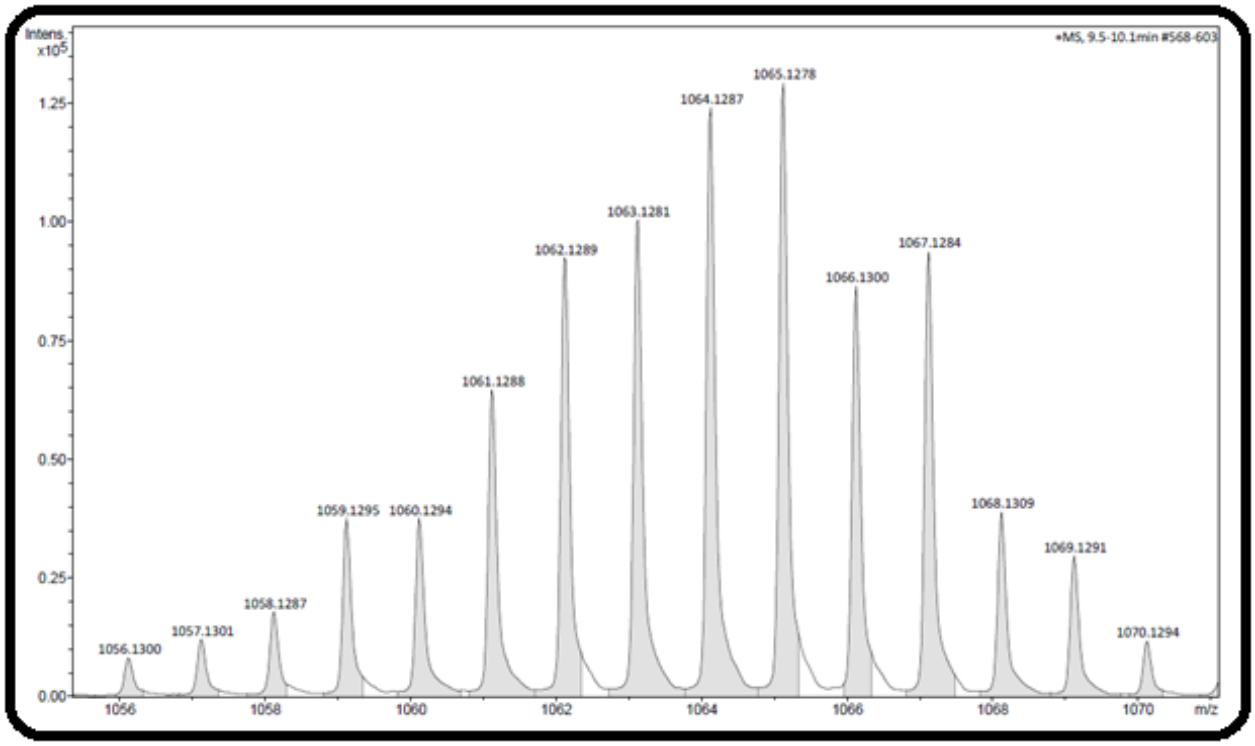
Fonte: Autor.

O pico de 1065,1278 *m/z* está relacionado ao íon $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2]^+(PF_6)$. Observa-se a perda de um contra-íon PF_6^-.

Pela ampliação do pico 1065,1278 atribui-se como sendo +1 a carga deste íon, uma vez que a diferença entre os valores de m/z no padrão isotópico é de uma unidade. Fato esse, que corrobora com o que já foi dito anteriormente através da análise de Raios-X, para que o fragmento mostrado acima apresente carga +1 cada um dos íons rutênios deve admitir carga 3^+.

Outra informação importante a respeito do espectro mostrado abaixo está relacionado a distribuição isotópica característica para dois átomos de rutênio, que apresenta sete isótopos (^{96}Ru(5.51%), ^{98}Ru (1.87%), ^{99}Ru (12.72%),^{100}Ru (12.62%), ^{101}Ru (17.07%),^{102}Ru (31.61%) e ^{104}Ru(18.58%)).

Figura 23: Distribuição isotópica obtida para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$.

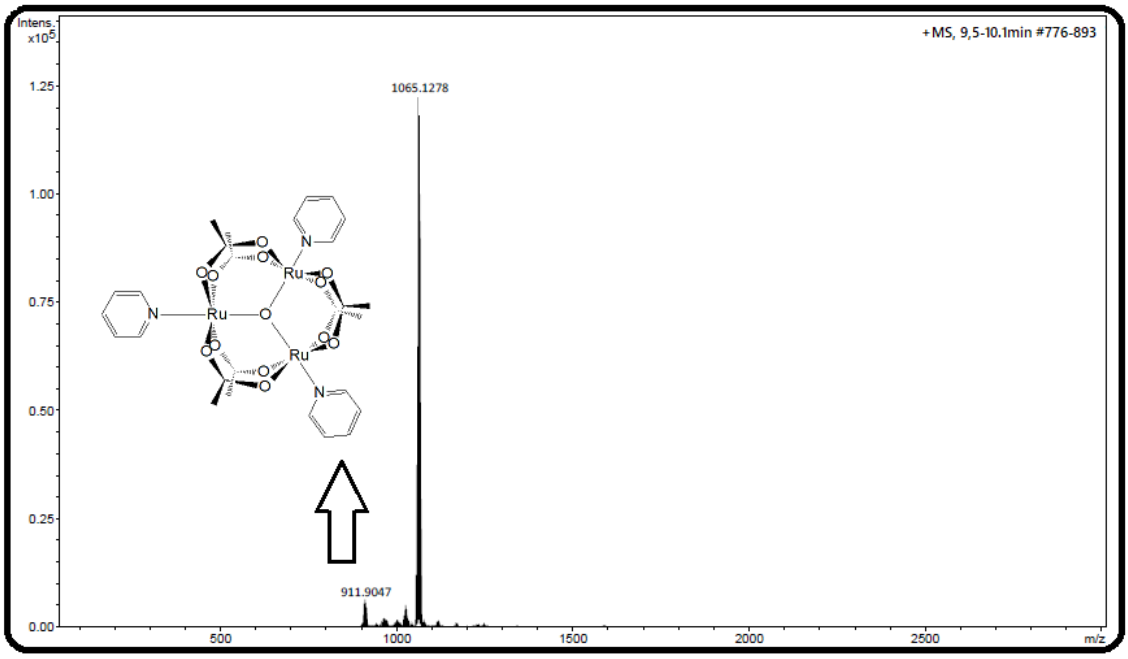


Fonte: Autor.

Seria interessante observar uma maior fragmentação do complexo binuclear de rutênio. Esperava-se ver a perda dos ligantes, principalmente THIQ que estão *trans* a ponte µ-oxo e se apresentam mais lábeis que a piridina. Porém, os dados mostrados acima foram adquiridos utilizando um potencial de voltagem aplicada no capilar de 1500 V para que não houvesse colapso total do complexo. Entretanto, quando se aumenta o potencial de voltagem aplicada para 2500 V, o complexo se fragmenta na fonte, impossibilitando assim a análise.

Vale a pena destacar também que antes da purificação observou-se um pico de baixa intensidade com *m/z* de 911,9047 atribuído ao complexo trinuclear de rutênio com 3 ligantes piridínicos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(C_5H_5N)_3]^+$, mostrado na figura 24. Mesmo após o controle rigoroso de diversos parâmetros durante a síntese a reação apresentou um baixo teor de impureza, felizmente após a purificação esse problema foi resolvido.

Figura 24: Espectro de massas do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, antes da purificação.



Fonte: Autor.

5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica amplamente empregada para determinação e elucidação estrutural de moléculas orgânicas e inorgânicas, simples e complexas. Essa técnica fornece informações importantes sobre o número de átomos magneticamente diferentes do isótopo estudado em determinada molécula, nesse estudo foi realizado medidas de RMN do ^1H.

A condição básica para a análise de um isótopo é que este apresente propriedade de *spin,* ou seja, que apresente massa e/ou número atômico ímpar. A frequência da radiação de radiofrequência absorvida pelo átomo de hidrogênio é totalmente influenciada pelo ambiente químico adjacente, ou seja, por elétrons e núcleos próximos [149]. Usualmente, os espectros de RMN são ordenados em termos do deslocamento químico em parte por milhão (ppm), com os valores aumentando da direita para esquerda. Esse fato norteia a análise dos espectros, uma vez que os prótons mais blindados estarão mais deslocados para direita e menos blindados serão encontrados mais à esquerda do espectro [149].

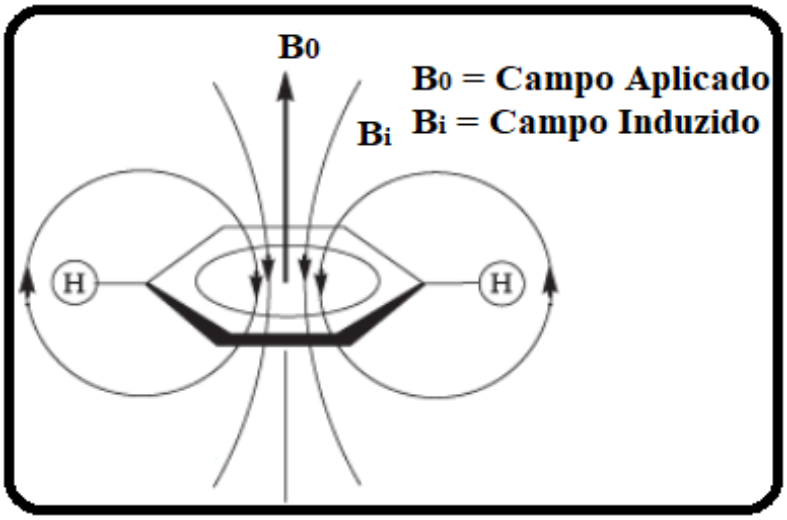
O efeito de blindagem está intimamente relacionado à carga eletrônica existente em torno do núcleo de determinado átomo, que ao sofrer influência de

um campo magnético terá seus elétrons em volta do núcleo forçados a girar na direção oposta ao campo aplicado gerando o efeito de blindagem que apresenta intensidade diretamente proporcional à densidade eletrônica em volta do núcleo [149]. Na ausência de um campo magnético, todos os estados de *spin* apresentam mesma energia.

As atribuições dos sinais de ^{1}H foram feitas por comparações com complexos análogos bem como o ligante livre, levando-se em consideração os efeitos magnéticos presentes [3] [150] [151].

Sabe-se que os prótons ligados diretamente a anéis aromáticos apresentam maiores valores de deslocamento químico, ou seja, se apresentam menos blindados. Isso ocorre devido ao fenômeno chamado "efeito de corrente de anel". Esse efeito é muito conhecido e está representado na figura abaixo:

Figura 25: Correntes de anel e linhas de força induzidas para a molécula do benzeno.



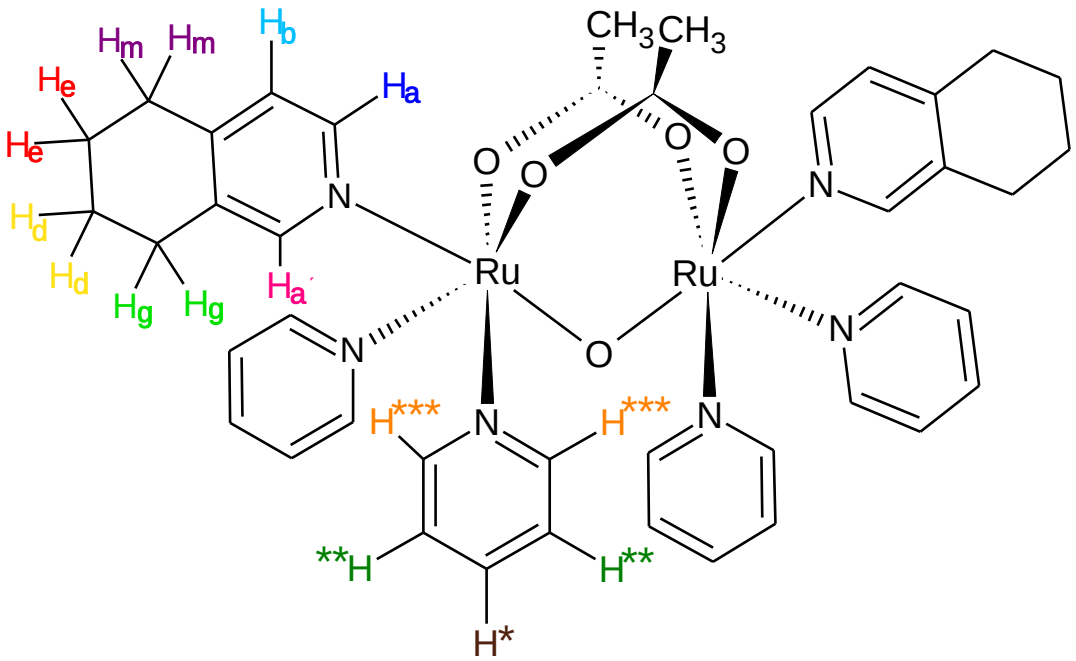
Fonte: Adaptado [152].

Os elétrons π não estão presos fortemente pelo núcleo quando comparados aos elétrons σ, sendo os elétrons π mais livres para se moverem em resposta a um campo magnético externo. Quando se aplica um campo magnético (B_0) em uma molécula que apresenta elétrons π, estes passam a circular de modo a gerar um campo magnético induzido (B_i), em reposta à perturbação externa. Então, em função do campo magnético induzido, a região acima do anel sofre efeito de blindagem, visto que o campo magnético local é contrário ao B_0. Por outro lado, na região lateral do anel aromático ocorre a desblindagem, nesse casso o campo magnético local soma-se ao campo

magnético externo. Deste modo, os prótons aromáticos apresentam-se em regiões de campo baixo, na região entre 7,0 e 9,0 ppm [153].

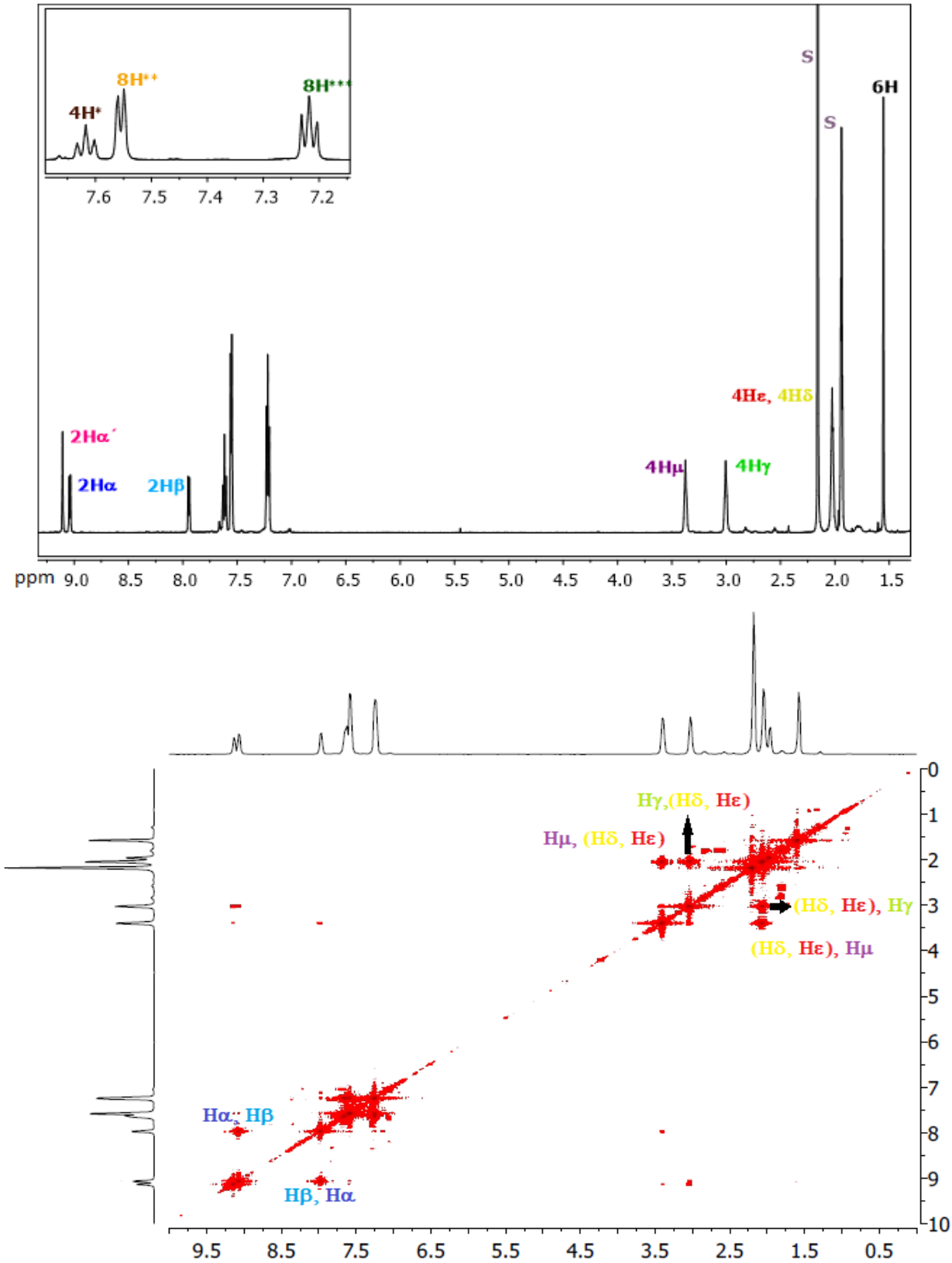
A seguir está representada a molécula do complexo em análise, figura 26, destacando-se os hidrogênios que serão atribuídos em cores diferentes, para melhor elucidação. Em seguida o espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$, é apresentado na figura 27.

Figura 26: Complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$, com destaque para os hidrogênios em cores diferentes



Fonte: Autor.

Figura 27: Espectro de ^{1}H-RMN (acima) e COSY (abaixo) do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$, obtido de uma solução 10^{-2} M em acetonitrila-d_3.



Fonte: Autor.

Devido ao efeito de corrente de anel observa-se, na região compreendida entre 7,0 e 9,0 ppm, deslocamentos químicos característicos de prótons ligados diretamente ao anel aromático.

Para o ligante THIQ, observa-se em 9,11 ppm um singleto bem definido atribuído ao Hα´ (em rosa). Em 9,04 ppm nota-se um dubleto, cuja integral é 2,00, relativo ao Hα (em azul escuro). Por fim, em 7,94 ppm identifica-se um dubleto atribuído ao Hβ (azul claro) do ligante THIQ. Vale a pena ressaltar, que a molécula apresenta um grupo de ponto C_{2v} podendo considerar os dois ligantes THIQ como equivalentes.

Em valores de deslocamentos químicos menores observa-se um dubleto em 3,37 atribuído aos Hμ (em roxo) dos ligantes THIQ, em seguida pode-se observar um dubleto em 3,00 ppm relativo aos Hγ. Identifica-se também, um quintupleto relativo a junção de dois tripletos dos Hε e Hδ.

Prosseguindo-se a análise, observa-se deslocamentos químicos característicos de piridinas ligadas na posição *cis* a ponte μ-oxo [154] [151] [150]. Em 7,62 ppm atribui-se um tripleto relacionado aos H* na posição –*para*, representados pela cor marrom. Um dubleto é identificado em 7,55 ppm atribuídos aos H*** (em laranja) na posição –*orto*. Por fim, observa-se em 7,22 ppm um tripleto característico de prótons (H**, representado pela cor verde escura) na posição –*meta* do ligante piridínico. É válido destacar que essa análise permite concluir que as piridinas não estão coordenadas na posição *trans*, pois teriam deslocamentos químicos na região entre 9,5 e 8,0 ppm [154].

Usando-se como referência os artigos mostrados no parágrafo acima, pode-se caracterizar um singleto intenso, cuja integral foi definida com o valor de 6,0, referentes aos 6 prótons dos ligantes acetatos.

A tabela abaixo resume o que foi dito até agora.

Tabela 5: Relação entre os sinais do espectro de RMN e suas atribuições

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$			
Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	Integração
α´	**9,11**	Singleto	2,07
α	**9,04**	Dubleto	2,00
β	**7,94**	Dubleto	2,05
*	**7,62**	Tripleto	3,95
**	**7,55**	Dubleto	8,06
***	**7,22**	Tripleto	8,07
μ	**3,37**	Dubleto	4,01
γ	**3,00**	Dubleto	3,90
ε,δ	**2,03**	Quintupleto	8,10
CH_3	**1,55**	Singleto	6,00

Fonte: Autor.

A comparação dos valores tabelados acima com os resultados obtidos para o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]^+$ é bastante interessante. Complexos trinucleares de rutênio apresentam um fenômeno chamado de anisotropia paramagnética. Esse fenômeno ocorre devido à presença de um elétron desemparelhado – ($3Ru^{3+}$ + $1O^{2-}$ = $3x5e^-$ +$1x2e^-$ = $17e^-$) – que modifica as propriedades magnéticas do sistema, deslocando os sinais de alguns hidrogênios para campos mais altos ou mais baixos. Em contrapartida o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$ não apresenta elétrons desemparelhados, sendo assim diamagnético [155].

O efeito de anisotropia paramagnética gera um campo magnético através da rotação desse elétron desemparelhado que interage com o campo magnético aumentando-o ou diminuindo-o. Esse efeito está diretamente relacionado a distância ao núcleo paramagnético e posição angular, então, núcleos mais próximos sentem mais o efeito do elétron desemparelhado frente a núcleos mais afastados [155] [156].

Pelo motivo explicado acima, os deslocamentos químicos dos prótons dos acetatos e dos ligantes THIQ são bastantes diferentes dos apresentados para o complexo binuclear análogo, esses valores são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 6: Comparação entro os deslocamentos químicos dos complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$ e $[Ru_2O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]^{+}$.

Hidrogênio	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$	$[Ru_2O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]^{+}$
α´	**9,11**	**-0,16**
α	**9,04**	**0,12**
β	**7,94**	**5,89**
μ	**3,37**	**1,46**
γ	**3,00**	**1,74**
ε,δ	**2,03**	**1,39 e 3,93**
CH_3	**1,55**	**4,35**

Fonte: Autor e adaptado [3].

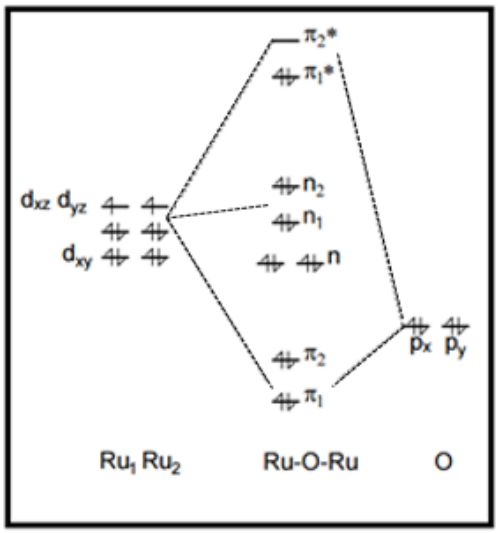
Como pode ser visto, os hidrogênios mais próximos ao núcleo $[Ru_3O]^{+}$, α e α´, são os que sofrem uma maior influência da anisotropia paramagnética e por isso seus deslocamentos químicos encontram-se bastante deslocados para regiões de baixo ppm. A diferença entre os deslocamentos químicos dos prótons dos dois complexos diminui conforme os prótons estão localizados mais afastados do centro $[Ru_3O]^{+}$.

A partir da comparação entre o complexo binuclear e trinuclear pode-se concluir que não há sinais com intensidades significativas no espectro mostrado na figura 27 que pudessem ser atribuídos à presença de um complexo trinuclear como contaminante.

5.5 Espectroscopia Eletrônica

Geralmente, complexos formados entre dois íons metálicos rutênio unidos por uma ponte μ-oxo, apresentam diagrama de orbitais moleculares construído em relação à contribuição dos orbitais dπ dos íons rutênio e pπ do ânion óxido. Os dois íons Ru^{3+} (d^5) contribuem com 10 elétrons, cada um exibindo um ambiente pseudo-octaédrico [157]. Weaver e colaboradores [158] propuseram um diagrama de orbitais moleculares geral para este tipo de compostos, mais especificamente para o complexo linear $[Cl_5Ru\text{-}O\text{-}RuCl_5]^{6-}$.

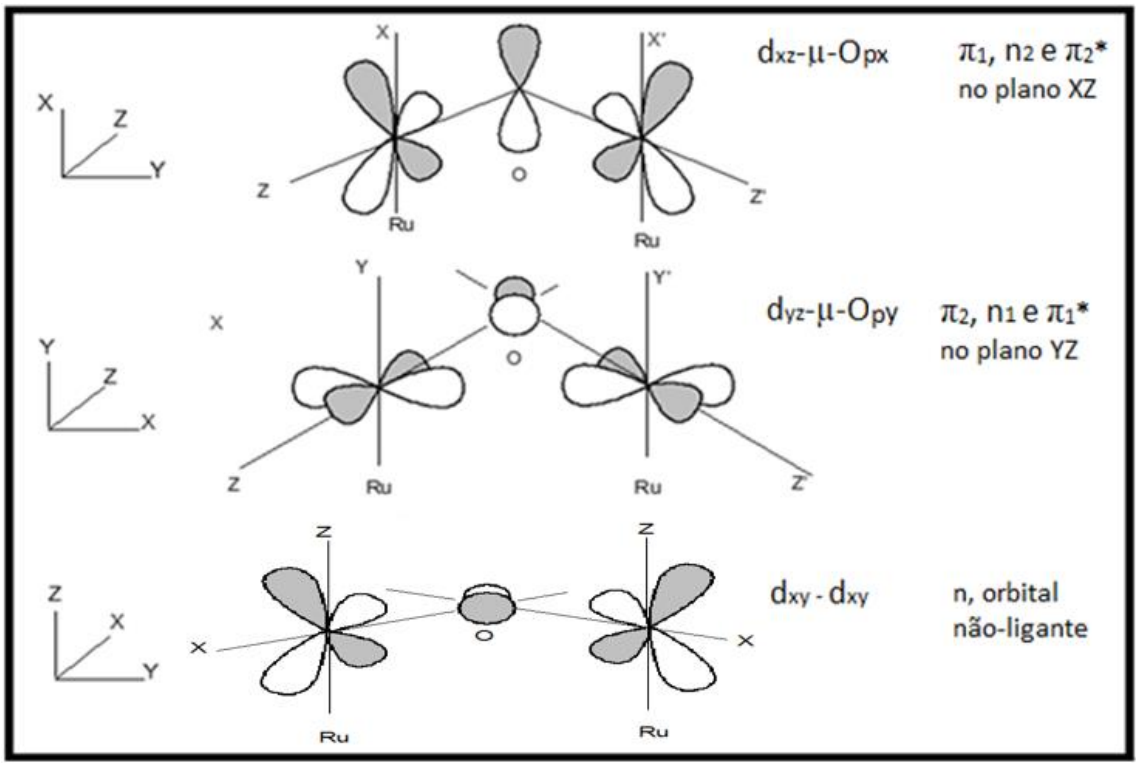
Figura 28: Esquema qualitativo dos orbitais moleculares para as interações Ru-O-Ru.



Fonte: Adaptado de **[158]**.

A forte interação dπ(Ru)-pπ(μ-O) que envolve os orbitais Ru_{dxz} e μ-O_{px}, perpendiculares ao plano do núcleo Ru_2(μ-O), forma o orbital ligante π_1, o orbital não-ligante n_2 e o orbital antiligante π_2* . As interações no plano entre os orbitais μ-O_{py} e Ru_{dyz} são mais fracas e produzem o orbital ligante π_2, o orbital não-ligante n_1 e o orbital antiligane π_1*. O orbital d_{xy} puro do metal permanece essencialmente não-ligante (n) no complexo. Essas interações estão resumidas na figura 29. Visto isso, esses compostos exibem uma banda de absorção típica entre 580-600 nm atribuída a uma transição de transferência de carga centrada no metal envolvendo orbitais dπ(Ru) e pπ(μ-O) ($n_1 \rightarrow \pi_2$* or $n_2 \rightarrow \pi_2$*) [135] [159] [150] [160] [154].

Figura 29: Esquema qualitativo dos orbitais moleculares envolvidos nas interações entre Ru(dπ)-O-(pπ) em relação a formação curvada da unidade Ru-O-Ru.



Fonte: Autor.

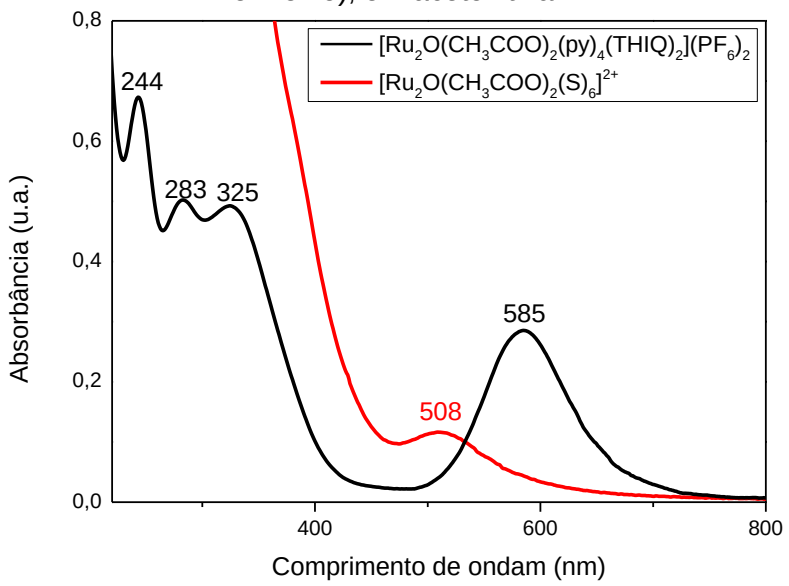
Comparando-se o exemplo linear $[Cl_5Ru\text{-}O\text{-}RuCl_5]^{6-}$ com a classe de complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2]^n$, percebe-se diferenças importantes quanto à conformação curvada da ligação Ru-O-Ru com um ângulo de aproximadamente 122º como mostrado pela análise de Raios-X e a presença das pontes de acetato. A contribuição entre as misturas orbitais dπ dos metais e dos orbitais dos ligantes acetatos é negligenciada pois é considerada pequena demais para ser relevante. De fato, um trabalho recente focado na modelagem DFT desta classe de complexos não mostrou contribuição significativa dos ligantes acetatos nos orbitais HOMO e LUMO. Mesmo para os níveis baixos, a contribuição máxima desses ligantes é de cerca de 20 %, para os níveis mais altos essa contribuição chega a ser menor que 4 % [159].

Em relação à conformação curvada, trabalhos descritos na literatura simplesmente adotaram um paralelismo entre a estrutura eletrônica de uma unidade linear e curvada $[Ru_2O]$, com ângulo de ligação Ru-O-Ru próximo de 90º, apesar de uma enorme quantidade de dados cristalográficos sobre os compostos $[Ru_2O(CH_3COO)_2]$ mostrando que o ângulo da ligação Ru-O-Ru está

entre 120 e 125º. A ressalva a ser feita nesse ponto é que o esquema de Orbitais Moleculares, como mostrado na figura 29, considera dois orbitais p puros do oxigênio interagindo com os orbitais d dos íons metálicos rutênio. No entanto, para fornecer um ângulo de Ru-O-Ru entre 120º e 125º, é preciso considerar o ânion óxido com uma hibridização sp^2 [159] [161] [162]. Neste caso, haverá exclusivamente um orbital p puro disponível para interagir e dois elétrons a menos para preencher o diagrama de orbital molecular resultante. Portanto, conclui-se que, embora este esquema qualitativo de OM pareça funcionar corretamente para atribuir o espectro eletrônico de compostos $[Ru_2O(CH_3COO)_2]$, ele deve ser usado com cautela.

Feito essa ressalva, a figura abaixo mostra os espectros eletrônicos do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ após a purificação por cromatografia em coluna (em preto) e $[Ru_2O(CH_3COO)_2(S)_6]^{2+}$ onde S são moléculas do solvente (em vermelho).

Figura 30: Espectro eletrônico para o os complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (em preto) e $[Ru_2O(CH_3COO)_2(S)_6]^{2+}$ (em vermelho), em acetonitrila.



Fonte: Autor.

Durante o início da reação com a formação da unidade $[Ru_2O]$, observa-se uma banda característica em 508 nm relacionada às transições entre os orbitais $n_1 \rightarrow \pi_2^*$ ou $n_2 \rightarrow \pi_2^*$. Nesta fase, a solução apresenta-se vermelha escura. Ao adicionar o ligante piridínico e o THIQ, a banda em 508 nm é deslocada para uma região de menor energia (585 nm). De acordo com Abe e colaboradores

[150], sabe-se que a unidade [Ru_2O] é um doador de elétrons π pobre e, pelo menos para o caso em que os ligantes auxiliares são CN^-, o núcleo metálico atua como um receptor π ácido. Assim, a mudança para uma região de menor energia pode ser explicada pelo fato dos ligantes que são σ-doadores, tanto a piridina quanto o THIQ, estarem doando densidade eletrônica à unidade [Ru_2O], desestabilizando o orbital π_1* aumentando então a repulsão intereletrônica entre este o orbital e o orbital anterior preenchido (n_2), reduzindo a diferença de energia entre os orbitais π_1* e π_2*. Em termos de atribuição, a forte banda observada em 585 nm está relacionada a transição de transferência de carga que ocorre predominantemente dentro da unidade [Ru_2O], entre um orbital n_1 ou n_2 ocupado e um orbital π* vazio [151] [96].

A região abaixo de 400 nm é dominada pelas transições de TCLM e IL (TCLM- transição de transferência de carga ligante metal e IL – transição intraligante ou π-π*). A tabela abaixo traz a atribuição das bandas deste complexo.

Tabela 7: Atribuições tentativas das transições observadas no espectro UV-vis do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$.

$\lambda_{máx}$ (nm)	log ε ($mol^{-1}L^{-1}cm^{-1}$)	Atribuição
244	4,23	Intraligante (IL)
283	4,04	TCLM THIQ →[Ru_2O]
325	4,02	TCLM py→ [Ru_2O]
585	3,70	Intra [Ru_2O]

Fonte: Autor.

De modo geral a maioria dos artigos de complexos binucleares de rutênio com ponte μ-oxo descreve as transições na região de 350 nm e 250 nm como transições de transferência de carga metal ligante (TCML) [96] [98] [151] [151], Porém, quando se considera o fato da unidade [Ru_2O], com dois íons rutênio no estado de oxidação +3, possuir um caráter π-doador de elétrons pobre, associado aos ligantes serem σ-doadores, espera-se que essas bandas sejam atribuídas a transições de transferência de carga ligante metal (TCLM). Então, baseando-se no trabalho de Masuda e colaboradores [163] e na explicação

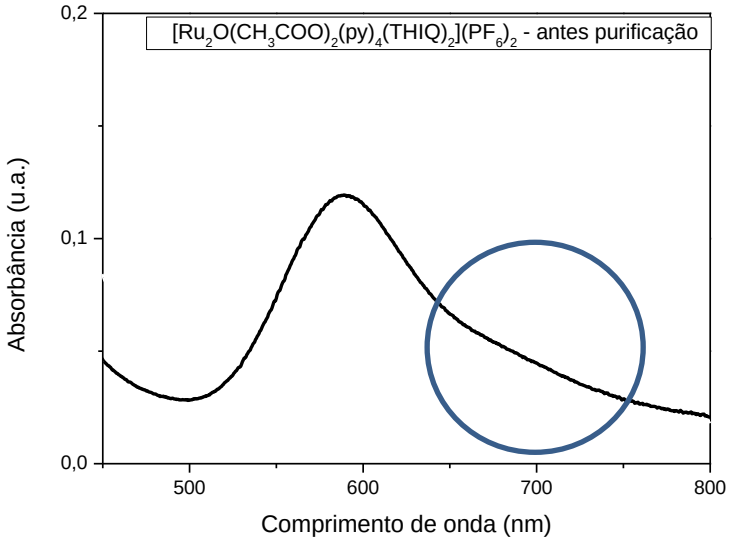
descrita acima para esse trabalho assume-se que a transição de transferência de carga ocorre do ligante para o metal. A banda em 283 nm está associada à transição de transferência de carga dos ligantes THIQ à unidade [Ru_2O], enquanto a banda em 325 nm está associada à TCLM das piridinas à unidade [Ru_2O].

A atribuição mostrada acima foi feita baseando-se no fato de que as bandas de transferência de carga envolvem o mesmo nível metálico e níveis π cheios dos ligantes piridínicos. De modo geral, por que a conjugação é maior devido ao sistema π-estendido do ligante THIQ em comparação com a piridina, os níveis π do THIQ devem ser mais estabilizados do que os níveis π da piridina. Então a diferença de energia π ligante-metal é maior para THIQ do que para piridina, por isso a transição em 283 (maior energia) é atribuída ao THIQ e a de menor energia para a piridina.

Por fim, a banda 244 nm está relacionada a uma transição de transferência de carga centrada apenas nos ligantes (π-π* (IL)).

É interessante ressaltar que antes da purificação, observa-se uma banda com máximo na região de 585 nm, porém ocorre absorção na região de 700 nm, como mostrado na figura 31.

Figura 31: Espectro eletrônico do $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ antes purificação, em acetonitrila.



Fonte: Autor.

A partir da literatura e do que já foi discutido neste texto, sabe-se que espécies [Ru_2O] são precursoras dos acetatos trinucleares [Ru_3O] [135] [164]. As

espécies trinucleares, por sua vez, apresentam a transição interna da unidade [Ru_3O] entre 600 e 700 nm. Assim, a presença de uma mistura de [Ru_2O] e [Ru_3O] explicaria a ocorrência do ombro observado. Mesmo com o controle rigoroso da temperatura bem como o tempo de reação, um pouco do equilíbrio é deslocado em direção da formação de complexos trinucleares. No entanto, a purificação se mostrou eficaz e tem-se como produto final complexo binuclear com pureza adequada.

Complexos trinucleares de rutênio apresentam uma banda característica em aproximadamente 700 nm atribuída à formação da unidade [Ru_3O], chamada de transição intracluster (IC). Em relação à banda característica da unidade [Ru_2O] (585 nm) tem-se um deslocamento para região de menor energia. Isso ocorre, pois, a unidade [Ru_3O] apresenta uma menor diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, necessitando assim de uma menor energia para promoção do elétron desemparelhado para um nível mais energético.

As demais bandas atribuídas não sofrem alterações significativas, como pode ser visto na tabela comparativa abaixo.

Tabela 8: Comparação e atribuições tentativas das transições observadas no espectro UV-vis do complexo [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e [$Ru_3O(CH_3COO)_2(THIQ)_3](PF_6)$

$\lambda_{máx}$ (nm)	log ε ($mol^{-1}L^{-1}cm^{-1}$)	Atribuição	$\lambda_{máx}$ (nm)	log ε ($mol^{-1}L^{-1}cm^{-1}$)	Atribuição
[$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$			***[$Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$***		
244	4,23	Intraligante (IL)	240	4,33	Intraligante (IL)
283	4,04	TCLM THIQ →[Ru_2O]	283	4,31	Transferência de Carga do Cluster para o Ligante (TCCL)
325	4,02	TCLM py→ [Ru_2O]	-	-	-
585	3,70	Intra [Ru_2O]	693	3,82	IC

Fonte: Autor.

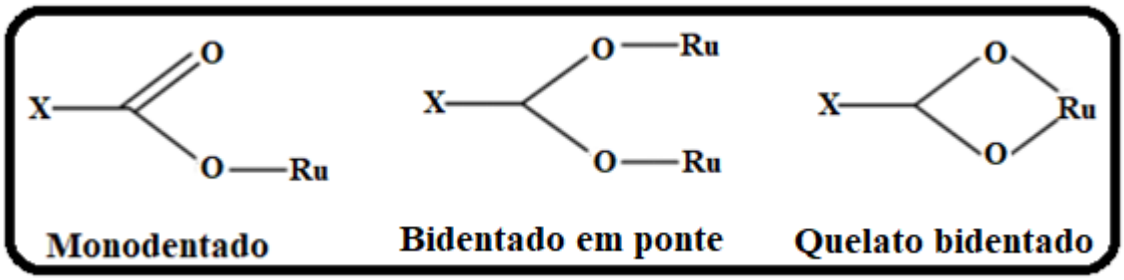
5.6 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho, técnica baseada na Lei de Hooke, é uma poderosa ferramenta frente a caracterização estrutural de determinada molécula de interesse. É amplamente utilizada na análise de vários compostos, inorgânicos e orgânicos, fornecendo informações sobre a presença de grupos funcionais nas estruturas devido à interação dos átomos ou moléculas frente a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A absorção de fótons da radiação eletromagnética incidente por uma molécula, a promove a um estado vibracional excitado, fazendo com que átomos e/ou grupos de átomos dessa molécula vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações que os une, sendo possível quantizar esse processo e analisar os movimentos rotacionais e vibracionais desses átomos e/ou grupo de átomos.

A primeira informação importante retirada do espectro vibracional mostrada na figura 33, diz respeito aos estiramentos relativos aos carboxilatos coordenados aos átomos metálicos de rutênio.

Sabe- se que em 1725 cm^{-1} temos o estiramento referente ao carboxilato não coordenado, υ(COOH), do ácido carboxílico. Esse estiramento bem característico não é observado no espectro apresentado na figura 33, mostrando que a purificação foi eficiente e eliminou-se totalmente o ácido acético em excesso. Outro ponto interessante, ainda relacionado aos carboxilatos, é pertinente ao modo de coordenação deste aos átomos metálicos centrais. Há três tipos principais de coordenação: monodentado, bidentado em ponte ou quelato bidentado, como mostrado na figura abaixo.

Figura 32: Modos de coordenação do íon carboxilato.



Fonte: Adaptado [165]

Quando coordenado ao metal ou metais, o íon carboxilato apresenta dois modos vibracionais distintos. Segundo a literatura, para complexos binucleares de rutênio com ponte μ-oxo e ligantes carboxilatos [98], na região entre 1648 – 1550 cm^{-1} tem-se o estiramento assimétrico ($\upsilon_{as(COO^-)}$) e entre 1450 – 1401 cm^{-1} o estiramento simétrico ($\upsilon_{s(COO^-)}$).

Segundo Nakamoto [165], quando $\Delta\upsilon = [\upsilon_{as(COO^-)} - \upsilon_{s(COO^-)}]$ for maior que 164 cm^{-1} têm-se carboxilatos monodentados, já os carboxilatos quelatos bidentados apresentam valores de $\Delta\upsilon_{(COO^-)}$ menor que 164 cm^{-1}. Os carboxilatos iônicos e os bidentados em ponte apresentam $\Delta\upsilon_{(COO)}$ em torno de 164cm^{-1}.

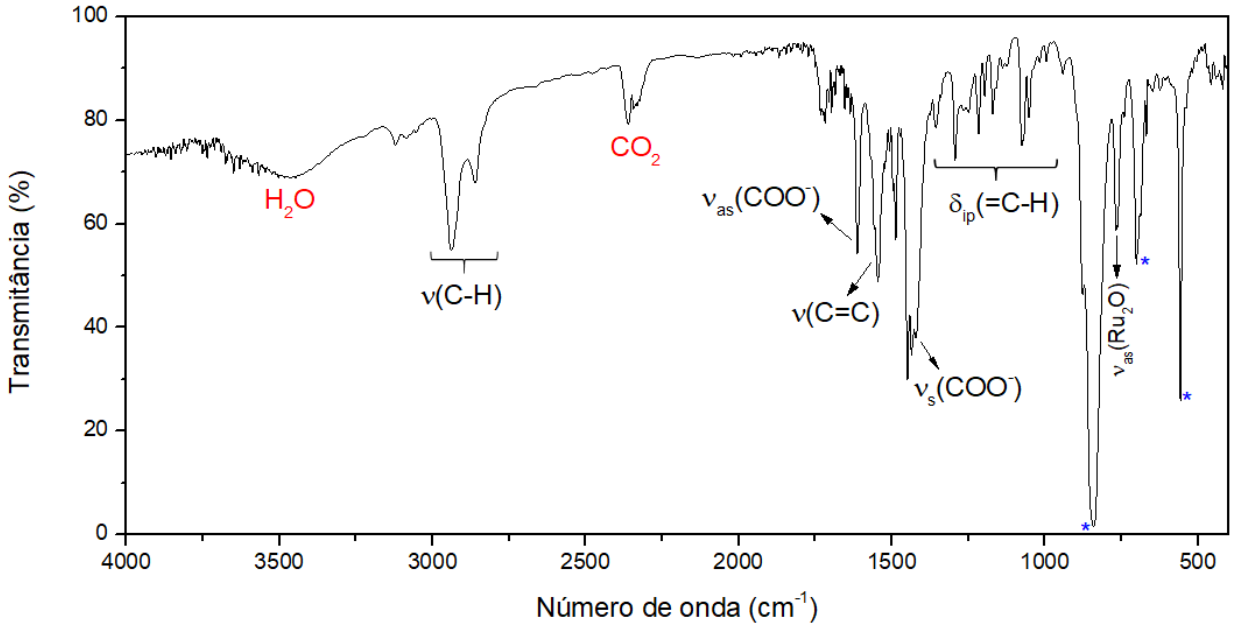
O espectro vibracional do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(C_9H_{11}N)_2](PF_6)_2$, apresentado na figura 33, mostra em 1613 cm^{-1} um banda de intensidade mediana atribuída ao estiramento assimétrico do acetato e em 1435 cm^{-1} observa-se uma banda intensa atribuída ao estiramento simétrico do acetato. Então, a diferença entre esses estiramentos ($\Delta\upsilon$= 1613 – 1435 = 178 cm^{-1}) nesse caso é maior que 164 cm^{-1} e, segundo Nakamoto, o carboxilato estaria ligado aos íons rutênio de modo monodentado. No entanto, resgatando o que foi apresentado na espectrometria de massas e medidas de Raios-X, vê-se que o modo de coordenação do carboxilato aos íons rutênios é bidentado em ponte.

No entanto, esse “número mágico” proposto por Nakamoto, com valor de 164 cm^{-1}, é um número genérico que não leva em consideração o(s) metal(ais) onde ocorre a coordenação do carboxilato. A simples mudança do estado de oxidação de um mesmo metal, pode (e vai) mudar o comprimento de ligação entre esse metal e oxigênio do íon carboxilato. Essa variação de tamanho de ligação, mesmo que pequena, irá mudar a intensidade da vibração dessa ligação quando houver absorção da radiação, e consequentemente haverá deslocamentos, quanto ao número de onda dessas bandas.

Para o complexo análogo usado comparativamente para o desenvolvimento dessa tese, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$, complexo este muito bem caracterizado, mostra-se carboxilatos coordenados aos metais de forma bidentada em ponte, com um valor de $\Delta\upsilon$ = 189 cm^{-1}, muito próximo do valor obtido aqui. Então, arrisco-me a dizer que $\Delta\upsilon$ é particular para cada metal e deve ser analisada caso a caso [166].

Continuando a análise, a banda de estiramento do ânion PF_6^-, usado como contra-íon, na região de 840 cm^{-1} é observada. Em geral, este ânion apresenta simetria octaédrica (Oh) e seis modos normais de vibração, mas apenas três estão ativos na região IV [167]. Os modos vibracionais do ânion estão destacados com um *.

Figura 33: Espectro de infravermelho do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(C_5H_5N)_4(C_9H_{11}N)_2](PF_6)_2$ obtido em pastilha de KBr, na região de 4000 - 400 cm^{-1}. As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do PF_6^-



Fonte: Autor.

Observa-se ainda bandas relativas aos ligantes periféricos, 5,6,7,8 tetraidroisoquinolina e piridina. Por terem estruturas muito parecidas é inviável tentar fazer a distinção entre as bandas de um ou outro ligante. Então, as principais bandas atribuídas aos ligantes periféricos são: υ(C-H) do anel saturado, na região de 3000 – 2800 cm^{-1}, υ(C=C) anel aromático, na região de 1500 cm^{-1}; δ_{ip}(=C-H) anel aromático, entre 1300 – 1000 cm^{-1}, como mostradas na tabela abaixo.

É possível observar também uma banda de intensidade mediana relacionada ao estiramento assimétrico da ligação Ru-O-Ru em 770 cm^{-1}.

Comparando-se as atribuições do complexo análogo ao complexo em estudo aqui, observa-se de um modo geral bandas localizadas nos mesmos lugares, com pouca ou nenhuma variação. A banda em 770 cm^{-1} não aparece para o complexo trinuclear de rutênio, como esperado, visto que essa banda é

relativa a unidade [Ru_2O]. Muito provavelmente a banda relativa a unidade [Ru_3O], por possuir uma massa reduzida elevada, encontra-se em números de onda menores que 400 cm^{-1}, que é o limite de detecção do equipamento.

Tabela 9: Atribuição tentativa das bandas do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e comparação ao complexo análogo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$.

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$	$[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$	
Número de onda (cm^{-1})		**Atribuição**
2938m e 2860m	2936m e 2862m	υ(C-H) anel saturado
1613m	1616m	$\upsilon_{as}(COO^-)$ acetato bidentado em ponte
1558br e 1496br	1556br e 1496m	υ(C=C) anel aromático
1435s	1427s	$\upsilon_s(COO^-)$ acetato bidentado em ponte
1282w, 1216w, 1170w e 1076w	1290w, 1244w, 1200w, 1170w e1080w	δ_{ip}(=C-H) anel aromático
770m	-	$\upsilon_{as}(Ru_2O)$ [98]
-	708w e 620w	δ_{oop}(=C-H) anel aromático
m=*medium, intensidade média;* ***br***=*branched, ramificado;* ***s***=*strong, muito intensa;* ***w***=*weak, pouco intensa;* $\boldsymbol{\delta_{ip}}$= *in plane, deformação angular no plano;* $\boldsymbol{\delta_{oop}}$= *out of plane, deformação angular fora do plano;* $\boldsymbol{\upsilon_s}$= *estiramento simétrico;* $\boldsymbol{\upsilon_{as}}$= *estiramento assimétrico.*		

Fonte: Autor e adaptada [3].

5.7 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica, como apresentada a seguir, é uma técnica muito importante para investigação do comportamento eletroquímico de complexos binucleares de rutênio, sobretudo no estudo de seus processos oxidativos e redutivos.

A voltametria cíclica foi realizada em acetontrila previamente seca, por três principais motivos: primeiramente a solubilidade do complexo é alta nesse solvente, o que facilita a medida; além disso a janela de trabalho da acetronilia é grande, indo de 2,0 a -2,0 V *vs* EPH, aproximadamente; por fim, o estudo

cinético de troca de ligantes, que será discutido adiante, mostra que o complexo apresenta grande estabilidade frente a esse solvente, não havendo substituição dos ligantes *trans* a ponte μ-oxo por moléculas do solvente no tempo e temperatura em que foi realizado o experimento.

Muitos processos biológicos importantes ocorrem a partir de reações de transferência de elétrons. Por esse motivo é de muita valia o estudo desse comportamento para complexos com possível ação farmacológica [168].

Estudos descritos na literatura para complexos binucleares de rutênio com ponte μ-oxo mostram diferentes perfis nos voltamogramas. De modo geral, o comportamento eletroquímico mais observado apresenta 3 processos monoeletrônicos reversíveis atribuídos aos processos sequenciais $Ru^{II}Ru^{II}/Ru^{II}Ru^{III}$, $Ru^{II}Ru^{III}/Ru^{III}Ru^{III}$ e $Ru^{III}Ru^{III}/Ru^{III}Ru^{IV}$ [169] [170] [171]. Há artigos que mostram a existência de apenas dois processos monoeletrônicos, sendo um reversível e um irreversível [172]. Há ainda sistemas mais complexos, como descrito por Doppelt e Meyer [173], o complexo $[(bpy)_2(py)Ru^{III}ORu^{III}(H_2O)(bpy)_2]^{4+}$ em que a redução é um processo bieletrônico seguido de um rearranjo estrutural com clivagem da estrutura em ponte e formação de dois equivalentes complexos mononucleares de rutênio.

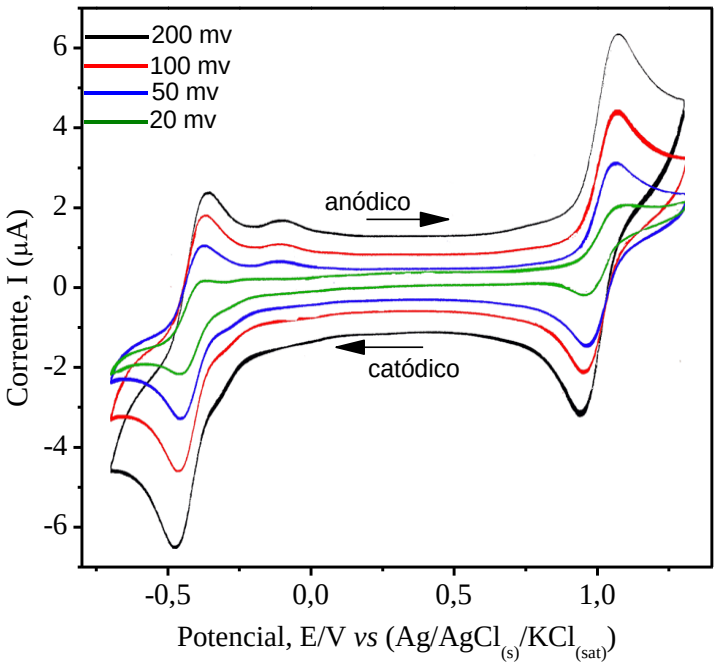
A figura 34 mostra o voltamograma do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em diferentes velocidades de varredura. A partir desses voltamogramas observa-se dois processos reversíveis monoeletrônicos atribuídos aos pares redox $Ru^{IV}Ru^{III}/Ru^{III}Ru^{III}$ e $Ru^{III}Ru^{III}/Ru^{III}Ru^{II}$ [159] [172]. O processo ser reversível refere-se à cinética de transferência de elétrons entre o eletrodo e o complexo em estudo. Quando a barreira de transferência de elétrons é baixa, o equilíbrio de Nernst é estabelecido imediatamente após qualquer mudança no potencial aplicado, ou seja, são processos rápidos. Em contraste, quando a barreira de transferência de elétrons é alta, tem-se um processo irreversível. Neste caso as reações de transferência de elétrons são lentas e são necessários potenciais mais negativos (positivos) para observar as reações de redução (oxidação), dando origem a maiores $E_{1/2}$.

Os processos estão mostrados no esquema abaixo:

$$[Ru^{III}Ru^{IV}(\mu\text{-}O)(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{3+} + e^- \rightleftharpoons [Ru^{III}Ru^{III}(\mu\text{-}O)(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+}$$

$$[Ru^{III}Ru^{III}(\mu\text{-}O)(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{2+} + e^- \rightleftharpoons [Ru^{II}Ru^{III}(\mu\text{-}O)(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]^{+}$$

Figura 34: Voltamograma cíclico do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]$ em acetonitrlia, solução 0,1 mol L^{-1} hexafluorofosfato de amônio à temperatura ambiente.



Fonte: Autor.

A tabela abaixo traz os valores de $E_{1/2}$ para esse complexo.

Tabela 10: Valores de $E1_{/2}$ para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$

$E_{1/2}$ (V *vs* Ag/AgCl)	
$Ru^{III}Ru^{III}/Ru^{III}Ru^{II}$	-0,42
$Ru^{III}Ru^{III}/Ru^{III}Ru^{IV}$	1,01

Fonte: Autor.

Foram realizadas também varreduras apenas no sentido positivo e apenas no sentido negativo e em todos os casos houve o aparecimento do mesmo perfil, indicando então que os processos redox apresentados pelo

complexo são totalmente independentes. Além disso, fixou-se uma velocidade de varredura e realizou-se 20 ciclos, após não se observou nenhuma diferença qualitativa nos voltamogramas, indicando que o potencial aplicado não forma uma outra espécie química, sobretudo não ouve perda ou troca dos ligantes na posição *trans* à ponte µ-oxo.

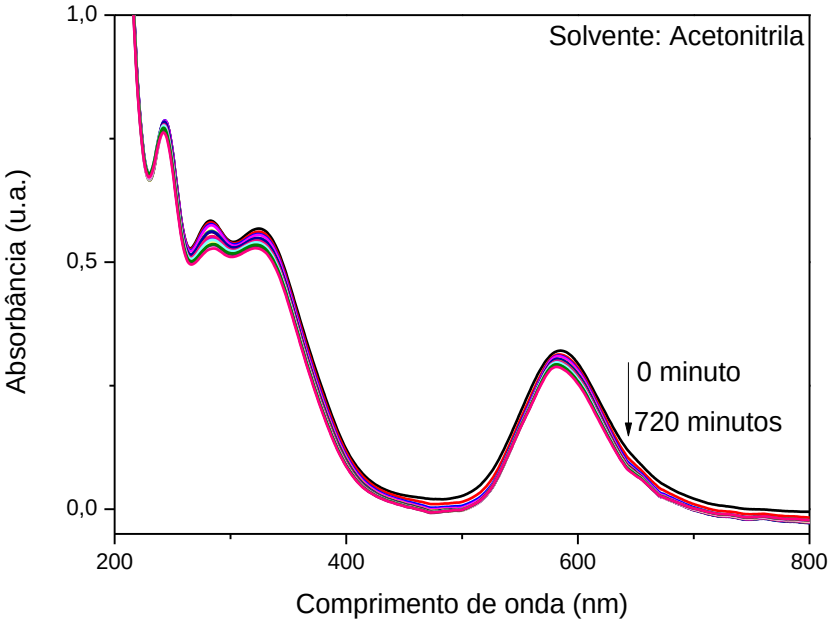
5.8 Cinética de troca de ligantes

Complexos binucleares de rutênio com ponte µ-oxo apresentam uma característica interessante quando se estuda o comportamento dos ligantes coordenados na posição *trans* à ponte µ-oxo, o chamado *efeito trans*.

Esse efeito ocorre quando um átomo com determinada eletronegatividade, nesse caso o oxigênio, ligado ao metal exerce uma influência pronunciada sobre a ligação metal-ligante aumentando a labilidade, sobretudo, dos ligantes *trans* a essa ligação [174] [175]. De uma maneira mais sucinta o *efeito trans* foi definido como *"efeito de um grupo (ligante) coordenado na taxa de reação de substituição dos ligantes trans a ele mesmo"* [174]. Trata-se, portanto, de um efeito cinético. Nessa seção serão mostrados estudos cinéticos de trocas de ligantes em diferentes temperaturas e solventes. Para isso, foram realizados experimentos de Uv-Vís, HPLC e RMN.

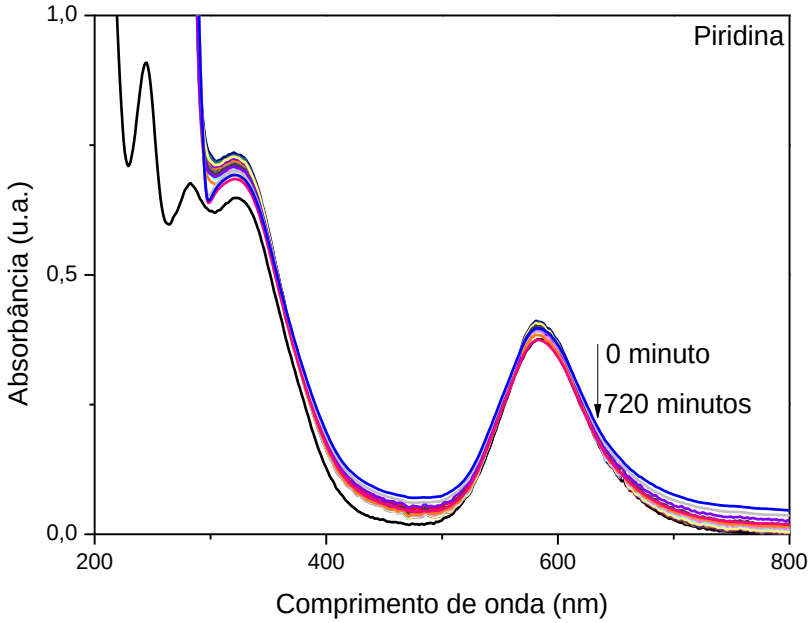
Primeiramente foram realizados experimentos testes em 3 diferentes solventes (acetonitrila, metanol e água) e um quarto experimento teste foi realizado utilizando um grande excesso de piridina, para garantir que todos os testes sejam de pseudo-primeira ordem, esses experimentos foram realizados à 37 ^{o}C. O objetivo principal foi inferir por qual mecanismo está ocorrendo a troca dos ligantes THIQ por moléculas do solvente e piridina e também para selecionar os ligantes (acentonitrila, metanol, água e piridina) com maior capacidade de se coordenar na posição *trans* à ponte µ-oxo, ou seja, substituir o ligante THIQ e aprofundar esse estudo. As figuras 35 à 38 mostram os resultados obtidos.

Figura 35: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (6,40 x10^{-5} mol.L^{-1}) em acetonitrila, à 37 ºC.



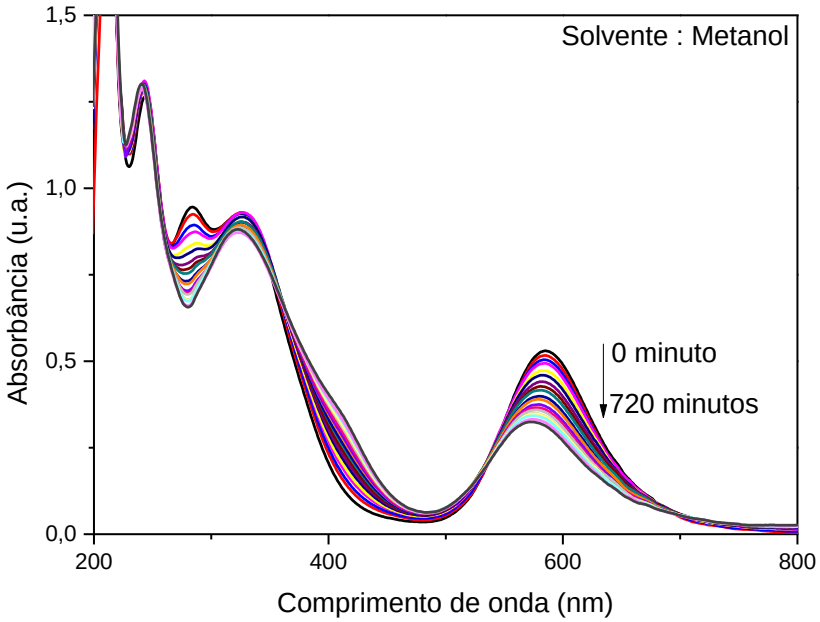
Fonte: Autor.

Figura 36: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (1,16 x10^{-4} mol.L^{-1}) pela piridina em acetonitrila, à 37 ºC.



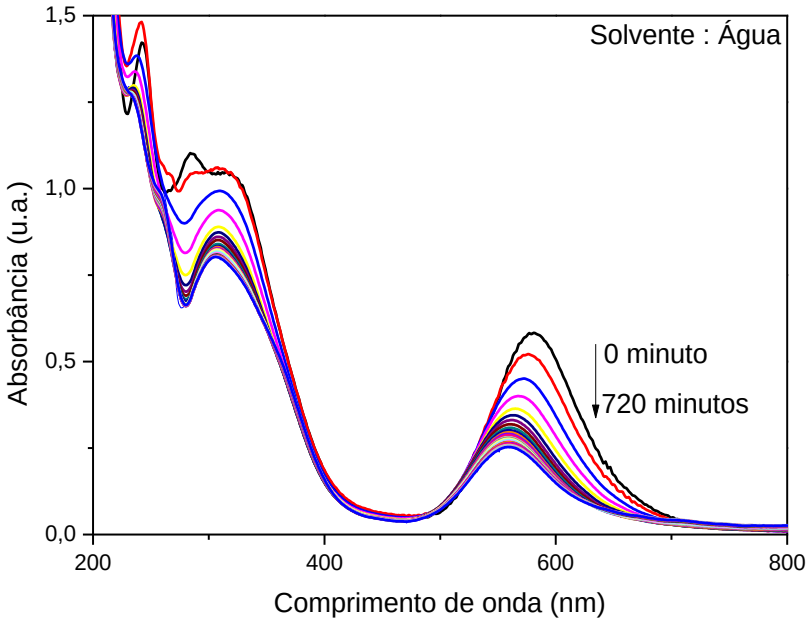
Fonte: Autor.

Figura 37: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (1,06 x10^{-4} mol.L^{-1}) em metanol, à 37 ºC.



Fonte: Autor.

Figura 38: Espectro eletrônico para o experimento teste de troca do(s) ligante(s) THIQ a partir do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (1,16 x10^{-4} mol.L^{-1}) em água, à 37 ºC.



Fonte: Autor.

Os resultados experimentais mostrados na figura 35 foram realizados adicionando-se 3,0 ml de acetonitrila em uma cubeta e em seguida adicionou o

complexo obtendo-se uma concentração final de 6,40 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. A cubeta foi mantida fechada durante todo o experimento e sob temperatura de 37 ^{o}C. Espectros de absorção foram registrados de forma automática de 20 em 20 minutos.

Como pode ser visto, não há diferenças significativas nos espectros de absorção do complexo após 12 horas de experimento. Observa-se uma pequena variação na intensidade da absorção da banda na região de 585 nm, porém, isto está relacionado a uma pequena flutuação na linha da base. Quando se compara o primeiro espectro de absorção obtido para o tempo zero tem-se um máximo de banda em 584 nm, o último espectro obtido, em 720 minutos, apresenta um máximo em 582 nm. Esse deslocamento de apenas 2 nm não pode ser considerado e nem discutido em termos de mudança de perfil espectral, pois está embutido no erro do equipamento.

Visto a boa solubilidade e que o complexo se mostrou inerte em acetonitrila após 12 horas à 37 ^{o}C, ou seja, não houve indícios de que os ligantes THIQ *trans* à ponte µ-oxo foram substituídos por moléculas de acetonitrila em até 12 horas, utilizou-se esse mesmo solvente para realizar o experimento teste envolvendo a piridina. O procedimento foi o mesmo descrito acima, porém adicionou-se um excesso de 200 vezes de piridina em relação ao número de mols de complexo (1,33 $x10^{-1}$ $mol.L^{-1}$).

A figura 36 mostra os espectros obtidos para essa análise. Mais uma vez não foi observado mudanças espectrais significativas que sugerissem a formação de um novo complexo com os ligantes piridínicos na posição antes ocupada pelos ligantes THIQ. O espectro eletrônico inicial apresenta um máximo de banda em 581 nm e o espectro no tempo de 720 minutos apresenta um máximo de banda em 583 nm, uma variação não significativa. Na região de menores comprimentos de onda observa-se uma mudança espectral, porém está relacionada apenas ao grande excesso de piridina no meio.

A figura 37 traz os resultados obtidos para o experimento realizado utilizando-se 3,0 ml de metanol adicionados a uma cubeta e uma concentração final de complexo de 1,06 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ a 37 ^{o}C. Vale a pena ressaltar que a solubilidade do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ é baixa em metanol, por esse motivo solubilizou-se o complexo em acetonitrila e em seguida

transferiu-se para a cubeta contendo metanol (2,0 % de acetonitrila em metanol v/v).

Em contraste com os resultados mostrados até agora, quando se utilizou como solvente o metanol percebeu-se claramente um deslocamento hipsocrômico. O primeiro espectro obtido no tempo zero apresenta um máximo de banda em 585 nm, ao final do experimento esse máximo de banda desloca-se para 572 nm, sugerindo que está de fato ocorrendo a troca do ligante THIQ por moléculas de metanol. A solução inicialmente se apresentava azul e ao término do experimento apresenta-se esverdeada.

Por fim, têm-se os resultados obtidos para o experimento realizado em água. O complexo também não apresenta uma boa solubilidade em água, por esse motivo solubilizou-se o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em acetonitrila (2,0 % de acetonitrila em água v/v) e transferiu-se para a cubeta contendo 3,0 ml de água. Nesse caso a concentração final do complexo foi de 1,16 $x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$, a cubeta foi mantida fechada durante todo o experimento, a temperatura também foi mantida em 37 ^oC e os espectros adquiridos automaticamente de 20 em 20 minutos.

A análise da figura 38 mostra um deslocamento hipsocrômico pronunciado. O primeiro espectro adquirido apresenta máximo de banda em 581 nm, após 860 minutos esse máximo avança para 557 nm, um deslocamento de quase 25 nm. Há fortes indícios de que a água apresenta capacidade de substituir os ligantes THIQ formando o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$. A solução inicialmente se apresentava azul e ao término do experimento apresenta-se roxa.

De modo sucinto, os resultados mostraram que a água apresenta uma capacidade de substituir os ligantes THIQ consideravelmente mais alta que os demais solventes, em seguida vem o metanol. Para a piridina e acetonitrila não se observa essa capacidade.

Os experimentos descritos acima permitem a seguinte conclusão: a acetonitrila e a piridina tem em comum o fato de se coordenarem à unidade $[Ru_2O]$ através do azoto enquanto metanol e água se coordenam através do átomo de oxigênio. É consolidado que o átomo de oxigênio é mais eletronegativo que o nitrogênio, e lembrando-se que a unidade $[Ru_2O]$ é ácida, é totalmente

esperado que a ligação do oxigênio a esse centro seja favorecida para átomos mais eletronegativos, explicando os resultados obtidos anteriormente.

Além disso, sabe-se que a unidade [Ru_2O] é formada por dois átomos de rutênio no estado de oxidação +3, considerados ácidos duros. Entre os solventes utilizados sabe-se que a água e o metanol apresentam uma maior dureza quando comparados a piridina e acetonitrila. Consultando-se qualquer livro de química da graduação sabe-se que ácidos duros preferem se ligar a bases duras e ácidos moles preferem se ligar a bases moles. Esse comportamento é observado nos experimentos acima, onde a unidade [Ru_2O] tem preferência em se ligar as bases duras (água e metanol) ao invés de manter o THIQ coordenado, havendo então a troca dos ligantes *trans* a ponte μ-oxo por moléculas de água e metanol.

Ainda, sabe-se que o pKa do ligante THIQ é 7,0, enquanto o pKa da piridina é 5,1. O THIQ apresenta um caráter menos ácido quando comparado à piridina. A unidade [Ru_2O] apresenta um caráter ácido significativo, tendo uma maior afinidade por ligantes doadores de elétrons. Então, o THIQ apresenta uma maior capacidade de doação de densidade eletrônica que estabiliza melhor a unidade [Ru_2O] e consequentemente a ligação [Ru_2O]-THIQ é favorecida quando comparada a ligação [Ru_2O]-piridina. Por esse motivo não se observa variações espectrais, mesmo em um grande excesso de piridina. A troca dos ligantes é energeticamente desfavorável.

Uma outra informação importante diz respeito à natureza dos ligantes que substituem o THIQ. Como pode ser visto pelos resultados acima diferentes ligantes apresentam diferentes comportamentos frente a substituição dos ligantes THIQ. Essa informação é um forte indício de que o mecanismo de substituição é do tipo associativo, uma vez que a natureza do ligante de entrada determina a velocidade de substituição dos ligantes THIQ. Os ligantes de entrada se coordenam ao complexo binuclear de rutênio e só após ocorre a saída do ligante THIQ.

Como mencionado acima, o complexo metálico apresenta uma ótima solubilidade em acetonitrila e por isso este é o solvente utilizado para solubilização do composto em todos os experimentos. Visto isso, realizou-se um experimento através do RMN que mostra a estabilidade desse complexo em

acetonitrila, com o intuito de eliminar o viés de que a substituição dos ligantes THIQ pudessem estar ocorrendo no momento do preparo da amostra.

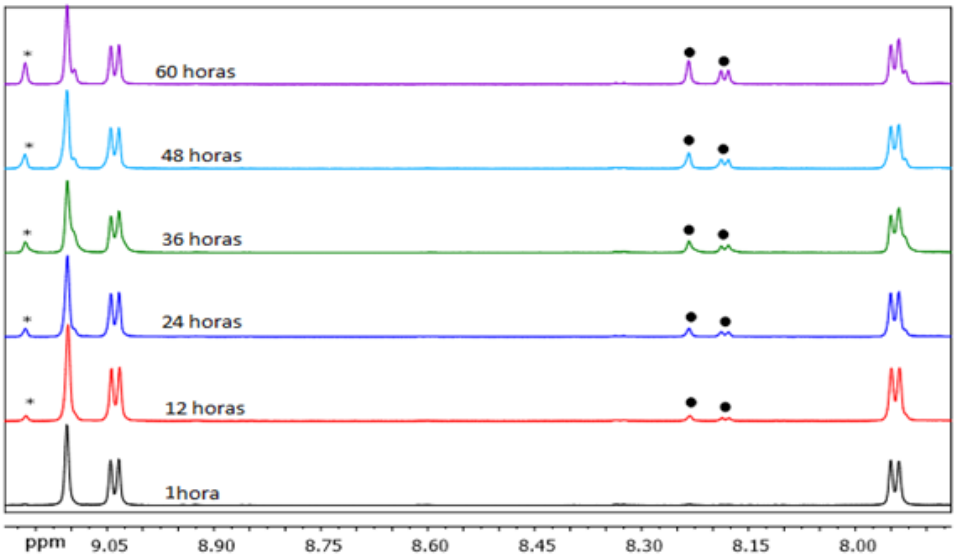
Dados apresentados nos espectros de ^{1}H-RMN abaixo, mostram que em até 1 hora do complexo em acetonitrila não se observa os picos assinalados nos demais espectros. Então, pode-se concluir que o preparo dos experimentos em acetonitrila não acarretará mudanças significativas que impactarão os estudos em metanol e água.

Além disso, os demais espectros mostram o aparecimento de três novos picos. Os picos assinalados por • foram atribuídos aos deslocamentos químicos característicos dos hidrogênios α´ (8,21 ppm) e α (8,19 ppm) do ligante THIQ quando livre.

Uma informação bastante importante está relacionada ao não aparecimento de um pico em aproximadamente 8,6 ppm, este pico é bastante característico de piridinas livres [150]. Há também o aparecimento de um singleto assinalado por * que não foi possível sua atribuição

Os dois parágrafos apresentados acima nos permitem uma conclusão, mesmo que parcial, importante que corrobora com o que foi dito até agora: os ligantes THIQ estão sendo substituídos por moléculas do solvente por estarem ligados *trans* a ponte μ-oxo, evidenciando a labilidade da posição *trans* a ponte μ-oxo. Já as moléculas de piridina que estão coordenadas nas demais posições não estão sendo substituídas.

Figura 39: Espectro de ^{1}H-RMN do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, obtido de uma solução 10 mM em acetonitrila-d_3 em diferentes tempos de análise.

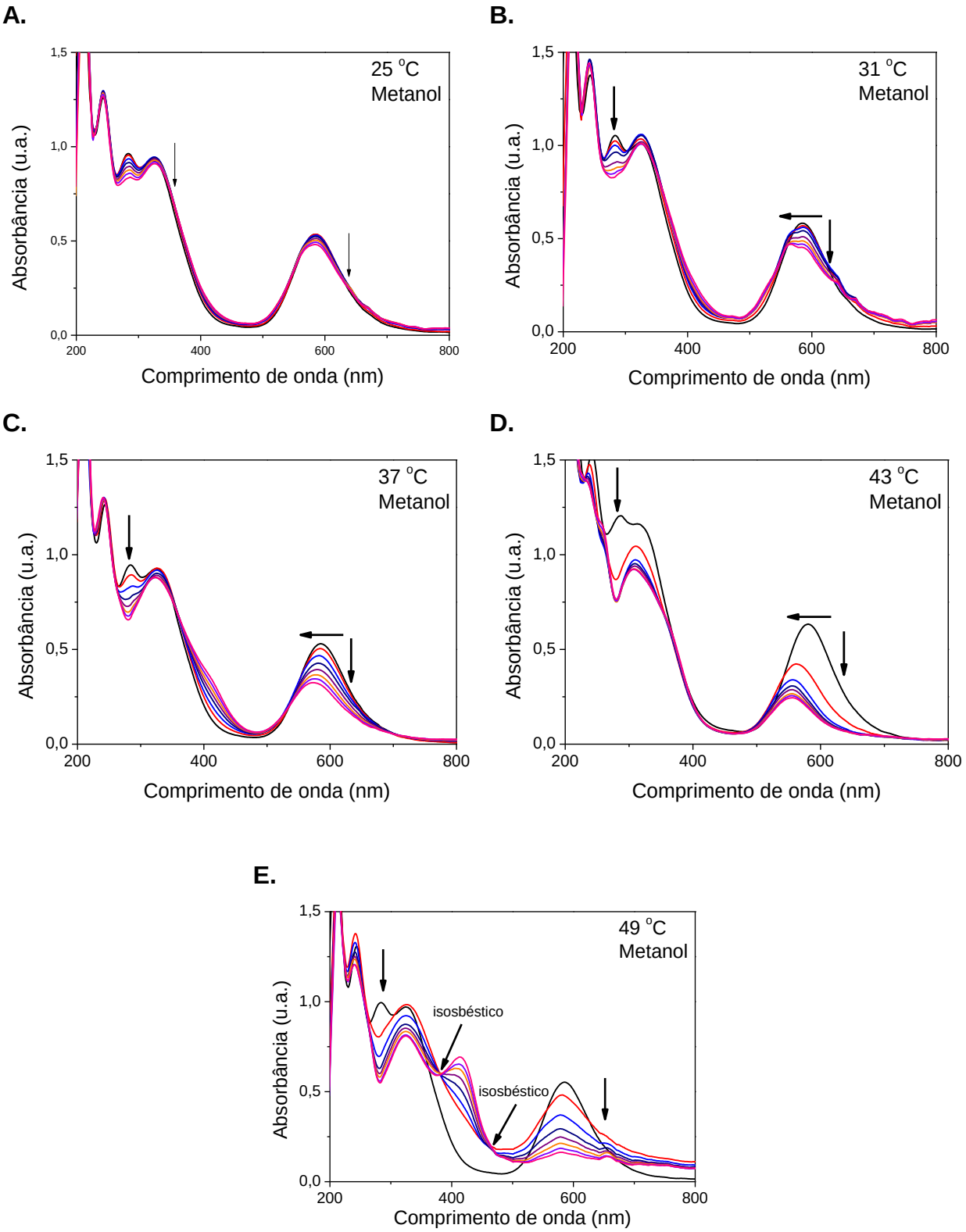


Fonte: Autor.

Em vista dos bons resultados apresentados para a troca dos ligantes por moléculas de água e metanol, foram realizados estudos que relacionam a dependência da cinética de troca dos ligantes THIQ com a temperatura para esses dois solventes.

Primeiramente serão mostrados os dados obtidos para o metanol. A figura 40, apresenta os resultados para as 5 diferentes temperaturas.

Figura 40: Estudo da influência da temperatura na troca dos ligantes THIQ, em metanol. A. 25 ºC (1,07 x10^{-4} mol.L^{-1}), B. 31 ºC (1,16 x10^{-4} mol.L^{-1}), C. 37 ºC (1,06 x10^{-4} mol.L^{-1}), D. 43 ºC (1,26 x10^{-4} mol.L^{-1}), E. 49 ºC (1,10 x10^{-4} mol.L^{-1}).



Fonte: Autor.

Antes de prosseguir com as análises dos espectros apresentados na figura 40, vale a pena dedicar um espaço para os espectros eletrônicos obtidos para 49 ºC. Como pode ser visto esses espectros não apresentam deslocamentos hipsocrômico para 554 nm característico como nas demais temperaturas (para 25 ºC esse deslocamento é bastante discreto). Observa-se um efeito de hipocroísmo da banda na região em 585 nm e o surgimento de uma nova banda na região de 415 nm. Muito provavelmente, devido a elevada temperatura, a unidade [Ru_2O] esteja sofrendo colapso e sendo desmontada formando uma mistura de complexos mononucleares, vide o surgimento da banda em menores comprimentos de onda característico de complexos mononucleares de rutênio [176].

Além disso, observa-se claramente um ponto isosbéstico em 466 nm e outro em 381 nm. Extrapolando-se as ideias desenvolvidas até aqui, possivelmente o isosbético em 466 nm esteja relacionado a mistura de complexos mono e binucleares de rutênio.

Visto isso, a partir desse ponto o estudo será realizado utilizando-se apenas as temperaturas de 25, 31, 37 e 43 ºC.

Muito provavelmente, a troca dos ligantes ocorre através de duas reações sucessivas de substituição, onde o produto da primeira etapa da reação é consumido para a reação subsequente, como pode ser visto na equação abaixo:

Equação 52

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2 + MeOH \xrightarrow{k1} [Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(MeOH)](PF_6)_2 + THIQ$$

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(MeOH)](PF_6)_2 + MeOH \xrightarrow{k2} [Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2 + THIQ$$

Reação Global:

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2 + 2\,MeOH \xrightarrow{kobs} [Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2 + 2\,THIQ$$

Através dos experimentos realizados e descritos adiante, não será possível calcular as constantes cinéticas k_1 e k_2 de modo independente, porém

a constante cinética da reação global (k_{obs}, constante de velocidade observada) que é a resultante dessas duas constantes foi interpretada e calculada.

Os espectros eletrônicos mostrados na figura 40, apontam uma tendência de diminuição de intensidade da banda na região em 590 nm juntamente com um deslocamento hipsocrômico. Com o aumento da temperatura essa tendência é pronunciada. O decaimento da absorção na região de 590 nm está diretamente relacionada a diminuição da concentração da espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e formação das espécies $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(MeOH)](PF_6)_2$ e/ou $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2$.

Infelizmente, não foi possível isolar as espécies formadas após substituição dos ligantes THIQ, por isso não se sabe exatamente onde encontram-se seus máximos de absorção. Porém, em busca de refinar os resultados obtidos atribuiu-se o comprimento de onda de 550 nm (comprimento de onda com maior intensidade de absorção encontrado para temperatura de 43 ^{o}C após 12 horas de experimento) como o máximo de banda para a nova espécie formada, pois pensa-se que o máximo de banda obtido nesse caso seja o mais próximo possível para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2$. Não pode-se esquecer do complexo intermediário $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(MeOH)](PF_6)_2$ que ao que tudo indica, apresenta um máximo de banda em 570 nm.

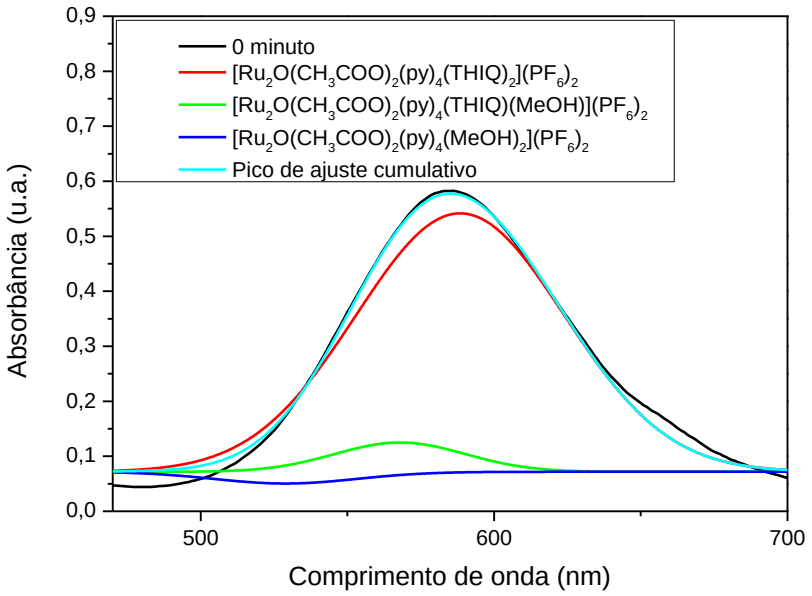
Visto isso, foi realizada a deconvolução do espectro inicial e final (após 12 horas), para todas as temperaturas, com o intuito de verificar uma tendência de consumo do complexo inicial e formação dos novos complexos. A deconvolução é uma ferramenta interessante que permite evidenciar bandas que estão sobrepostas por serem energeticamente parecidas, como o caso das bandas na região de 590, 570 e 550 nm.

Como esperado a deconvolução para o espectro obtido no tempo inicial, em todas as temperaturas, apresenta o mesmo perfil. O espectro em vermelho mostra que a banda com máximo na região de 590 nm é quase que exclusivamente responsável pela intensidade da banda deconvoluída, mostrando que o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ é predominante nessa etapa. Em verde está evidenciada a banda com máximo na região de 570 nm, atribuída ao complexo intermediário

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(MeOH)](PF_6)_2$ que nesse caso está contribuindo de forma pouco significativa, porém percebe-se que troca dos ligantes, mesmo que discreta, ocorre desde o tempo zero. A banda na região de 550 nm atribuída ao complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2$ no tempo inicial não apresenta contribuição relevante para formação da banda, uma vez que para ocorrer a formação deste complexo é necessário que exista uma quantidade significativa do complexo intermediário que funcionará como reagente para a formação do complexo final.

Optou-se por mostrar apenas a deconvolução para a temperatura de 37 ºC, pois para o tempo zero todos os espectros apresentam o mesmo perfil de deconvolução.

Figura 41: Deconvolução do espectro obtido para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, em metanol, tempo zero, a 37 ºC.



Fonte: Autor.

Prosseguindo-se as análises, serão mostradas a seguir a deconvolução após 12 horas de experimento para as temperaturas de 25, 31, 37 e 43 ºC.

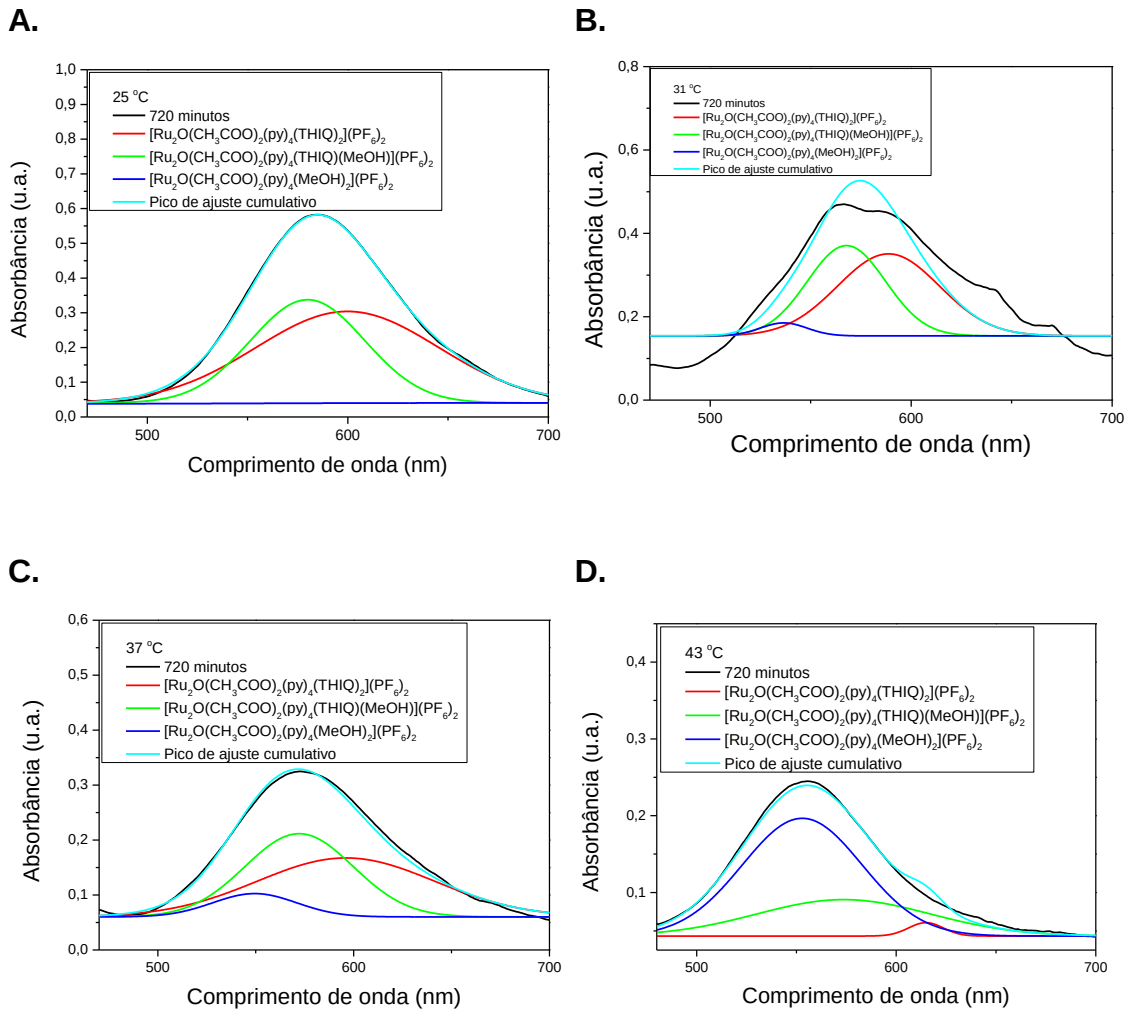
As deconvoluções apresentadas na figura 40 mostram uma evolução de formação dos produtos, tanto intermediário ($[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(MeOH)](PF_6)_2$) quanto final $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2$.

Após 12 horas de reação à 25 ºC não houve a formação do complexo final, porém observa-se a banda característica do complexo intermediário. Esse fato comprova que para haver a formação do complexo final obrigatoriamente deve haver a formação de determinada quantidade do complexo intermediário. Após 12 horas de experimento não observou-se a formação da espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(MeOH)_2](PF_6)_2$, mostrando que a reação de substituição do primeiro ligante THIQ por metanol é bastante lenta.

Com o aumento da temperatura nota-se uma diminuição gradativa da banda do complexo inicial (em vermelho) até quase sua extinção para temperatura de 43 ºC. Consequentemente, as bandas assinaladas em verde e azul estão aumentando sua contribuição para intensidade da banda formada.

Devido a limitações experimentais, os resultados foram obtidos em 12 horas de reação, talvez em tempos maiores a banda sinalizada pela cor vermelha pudesse ser totalmente extinta, existindo apenas a banda relativa ao novo complexo formado.

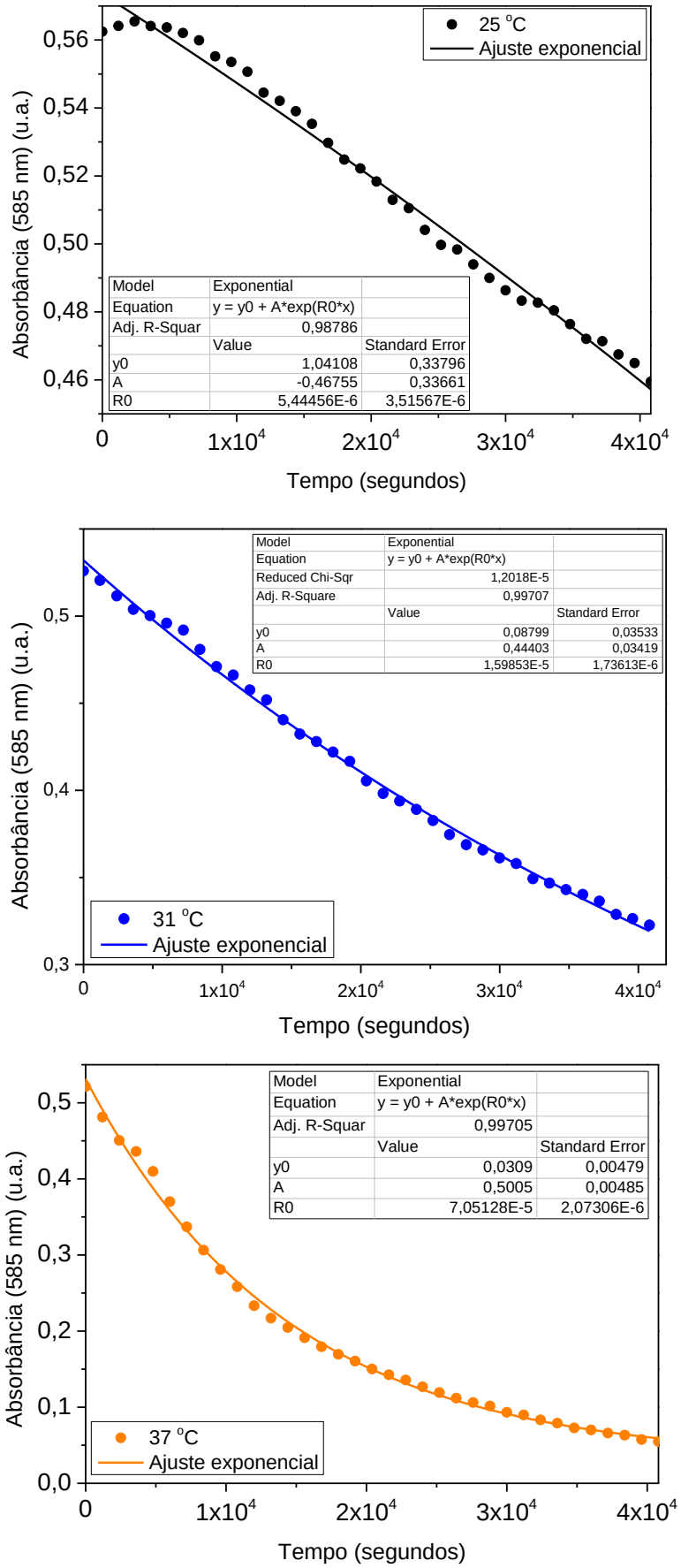
Figura 42: Deconvolução do espectro obtido para o complexo formado após 12 horas de experimento, em metanol, A. 25 ºC, B. 31 ºC, C. 37 ºC e D. 43 ºC.

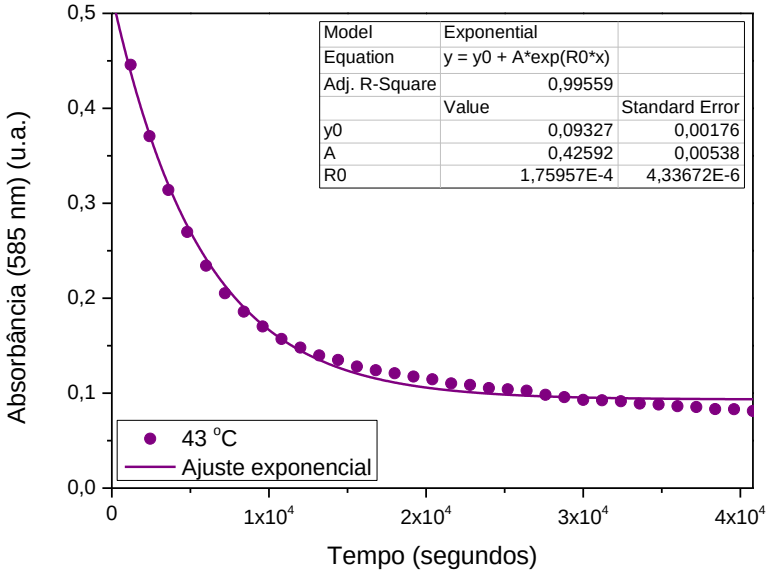


Fonte: Autor.

Visto isso, à figura 43 estão as curvas de intensidade de absorbância da banda em 585 nm em função do tempo, em 4 diferentes temperaturas.

Figura 43: Variação da intensidade de banda em 585 nm em função do tempo, em diferentes temperaturas.





Fonte: Autor.

Dentro do tempo limite de monitoramento do experimento de cinética (12 horas) não ocorreu troca significativa dos ligantes THIQ por moléculas de metanol nas duas temperaturas mais baixas. Então, embora tenha sido possível obter um ajuste exponencial dos valores de absorbância em função do tempo, a reação não se completou e, por isso, não serão apresentados valores de constante de velocidade e tempo de meia vida para essas duas temperaturas.

Em contrapartida, para as duas temperaturas mais altas observa-se que a reação ocorreu com praticamente todo o consumo do complexo inicial, chegando a um platô. Por esse motivo as constantes cinéticas, bem como os tempos de vida, só serão calculadas para as temperaturas de 37 e 43 ºC.

É interessante destacar que as duas etapas de substituições dos ligantes THIQ por moléculas de metanol são tratadas como pseudo-primeira ordem, uma vez que o ligante substituinte é o solvente e encontra-se em grande excesso podendo ser considerada sua concentração como constante.

Tabela 11: Valores das constantes de velocidades observadas para diferentes temperaturas.

Temperatura (ºC)	K_{obs} (s^{-1})
37	7,05 x10^{-5}
43	1,76 x10^{-4}

Fonte: Autor.

Os valores das constantes mostrados acima são baixos, corroborando que a reação de substituição dos ligantes THIQ por moléculas de metanol é lenta.

Em posse dos valores das constantes de velocidade global, pôde-se calcular os valores de tempo de meia vida ($t_{1/2}$) mostrando sua dependência com a temperatura. A equação que permite esse cálculo é mostrada a seguir:

Equação 53

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k_{obs}}$$

Os valores obtidos estão tabelados abaixo:

Tabela 12: Valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para diferentes temperaturas.

Temperatura (ºC)	$t_{1/2}$ (horas)
37	2,73
43	1,09

Fonte: Autor.

O tempo de meia vida indica, quando 50 % do complexo inicial foi consumido formando determinado produto. Os valores encontrados para $t_{1/2}$ são bastante altos. Apesar do complexo se mostrar lábil frente a substituição de seus ligantes THIQ, provavelmente a energia necessária para que essa troca de ligantes ocorra seja bastante alta.

Os valores apresentados na tabela acima indicam que os valores de $t_{1/2}$ são consideravelmente menores que o tempo total do experimento, evidenciando que grande parte do complexo inicial foi realmente consumido. O consumo do complexo inicial dá origem ao complexo intermediário que posteriormente forma o complexo final, e como pode ser visto nos dados de deconvolução a contribuição desses dois complexos para formação da banda na região de 585 nm é bem mais acentuada que a do complexo inicial.

A partir desse ponto, serão apresentados os dados obtidos utilizando-se como o solvente a água. Além dos experimentos mostrados abaixo, foram realizados experimentos utilizando HPLC em 3 diferentes temperaturas, em busca de elucidar a formação do complexo intermediário

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)](PF_6)_2$ que será consumido para formação do complexo final $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$.

Assim como mostrado para o metanol, a troca dos ligantes ocorre através de duas reações sucessivas de substituição do tipo associativa, onde o produto da primeira etapa da reação se torna o reagente para a reação subsequente, como pode ser visto na equação abaixo:

Equação 54

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2].(PF_6)_2 + H_2O \xrightarrow{k1} [Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)](PF_6)_2 + THIQ$$

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)].(PF_6)_2 + H_2O \xrightarrow{k2} [Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2 + THIQ$$

Reação Global:

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{kobs} [Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2 + 2\,THIQ$$

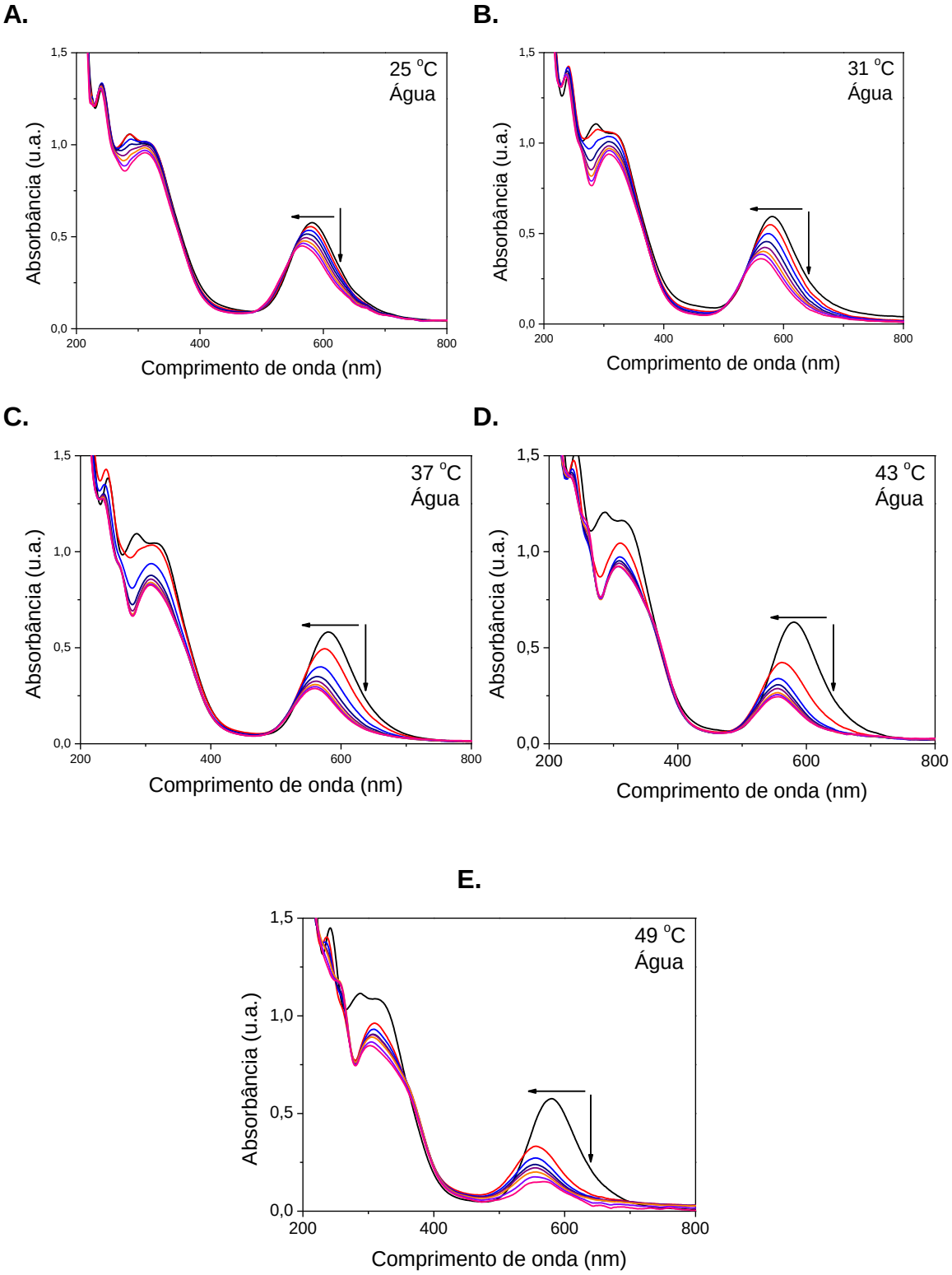
Os resultados mostrados na figura 44, mostram uma significativa diminuição da banda em 580 nm concomitante a um deslocamento hipsocrômico para todas as temperaturas. Como esperado, esses efeitos são mais pronunciados para temperaturas mais elevadas.

A diminuição da absorção em 580 nm está diretamente ligada a diminuição da concentração da espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e formação do complexo intermediário $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)](PF_6)_2$ que apresenta um máximo de banda na região de 570 nm. Como já dito, é complicado mensurar exatamente onde seria o máximo de onda para essa espécie, pois é inviável o isolamento da mesma. Além disso, em todo tempo em que a reação está ocorrendo tem-se, mesmo que em alguns momentos em concentrações muito baixas, a existência das três espécies simultaneamente. Porém, para uma melhor análise dos dados obtidos adota-se o valor de 570 nm como o máximo da espécie intermediária.

Prosseguindo-se a análise, vê-se o deslocamento máximo da banda para 550 nm, que foi atribuído a espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$. Nesse

ponto da reação, quase que 100 % do complexo inicial e intermediário foram convertidos a $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$.

Figura 44: Estudo da influência da temperatura na troca dos ligantes THIQ, em água. A. 25 ºC, B. 31 ºC, C. 37 ºC, D. 43 ºC, E. 49 ºC

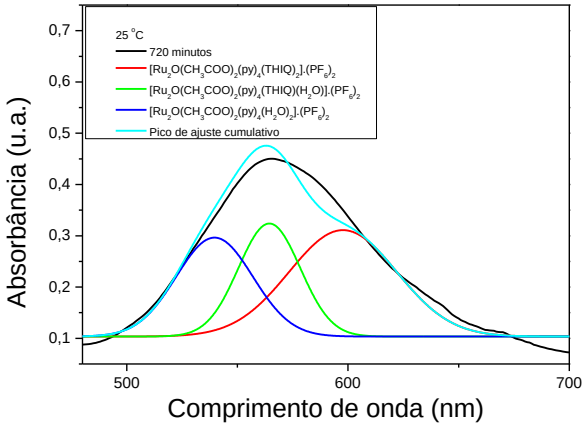


Fonte: Autor.

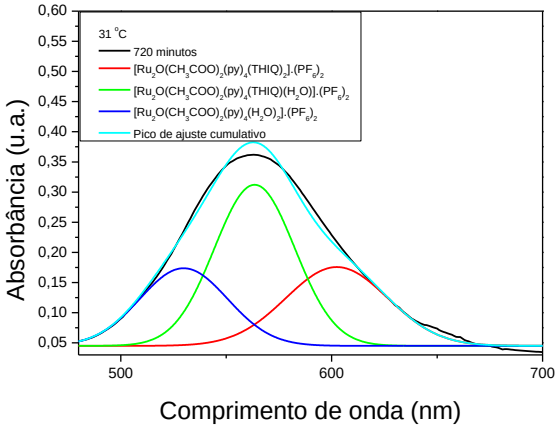
Prosseguindo-se as análises, abaixo estão mostradas as deconvoluções dos espectros eletrônicos após 720 minutos de experimento em 5 diferentes temperaturas.

Figura 45: Deconvolução do espectro obtido para o complexo formado após 12 horas de experimento, em metanol, A. 25 ºC, B. 31 ºC, C. 37 ºC. D. 43 ºC. E. 49 ºC.

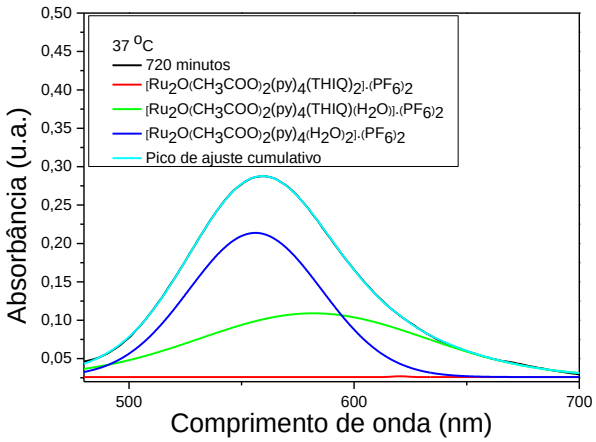
A.



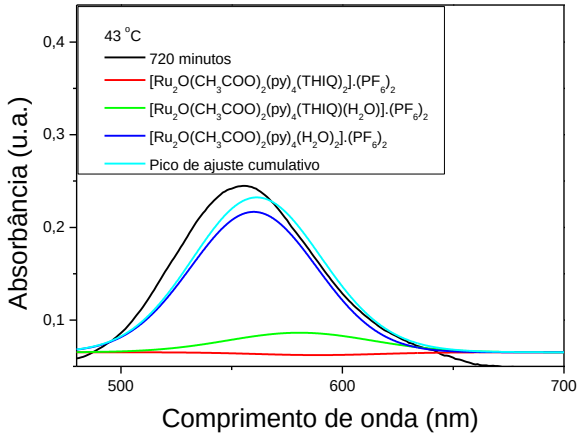
B.



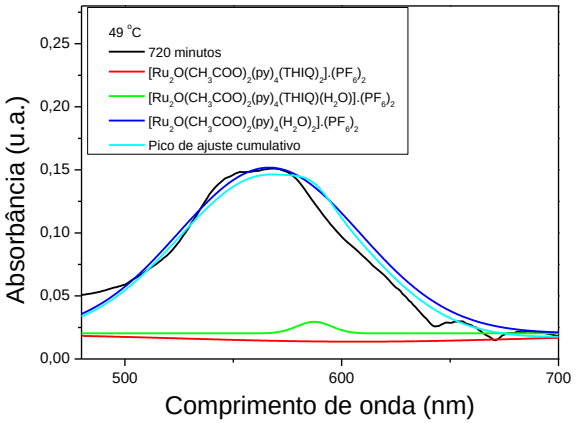
C.



D.



E.

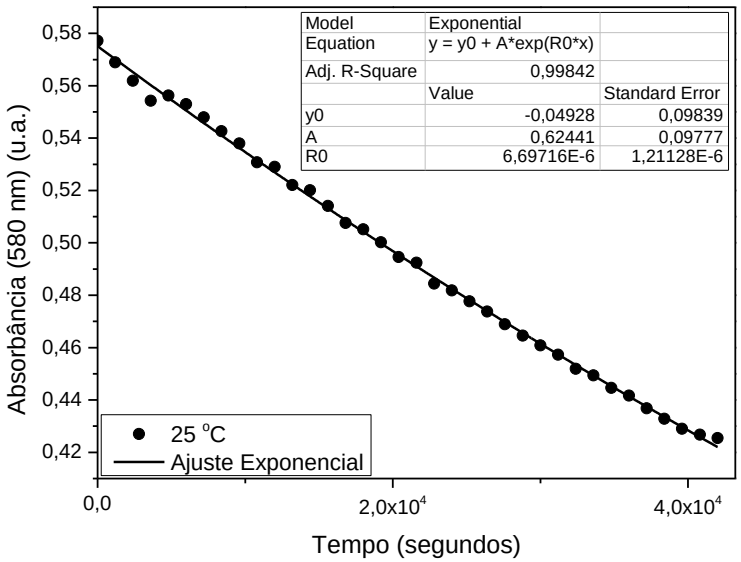


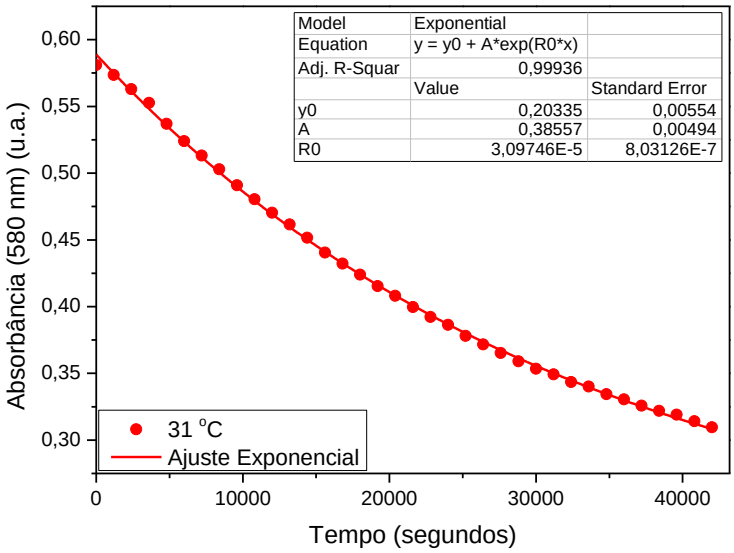
Fonte: Autor.

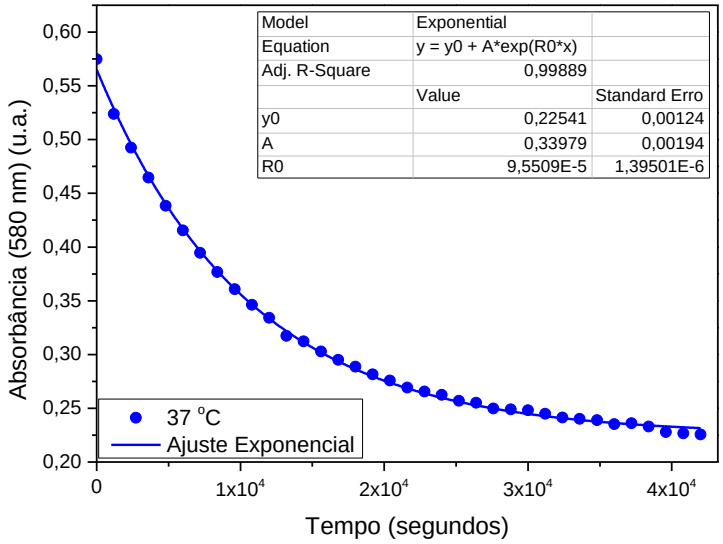
Para as temperaturas de 25 e 31 ºC é possível observar uma contribuição bastante significativa da banda relativa ao complexo inicial ($[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$), assinalado em vermelho, indicando que o tempo de experimento não foi suficiente para que todo complexo inicial fosse convertido em complexo intermediário. Para as demais temperaturas observa-se que o complexo inicial foi totalmente consumindo gerando o complexo intermediário, assinalado em verde, que posteriormente foi consumido formando o complexo final, indicado em azul.

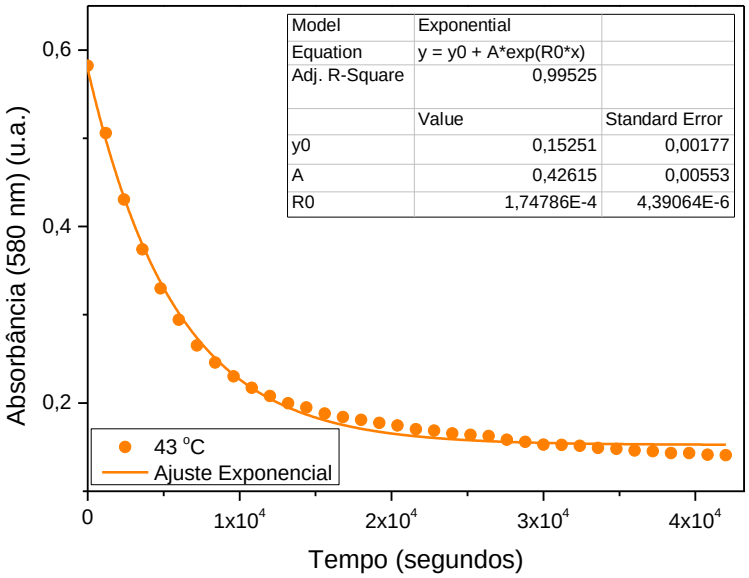
Abaixo está sendo mostrado a variação da intensidade da banda em 580 nm em função do tempo, ou seja, as curvas mostradas a seguir retratam o consumo da espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, em diferentes temperaturas.

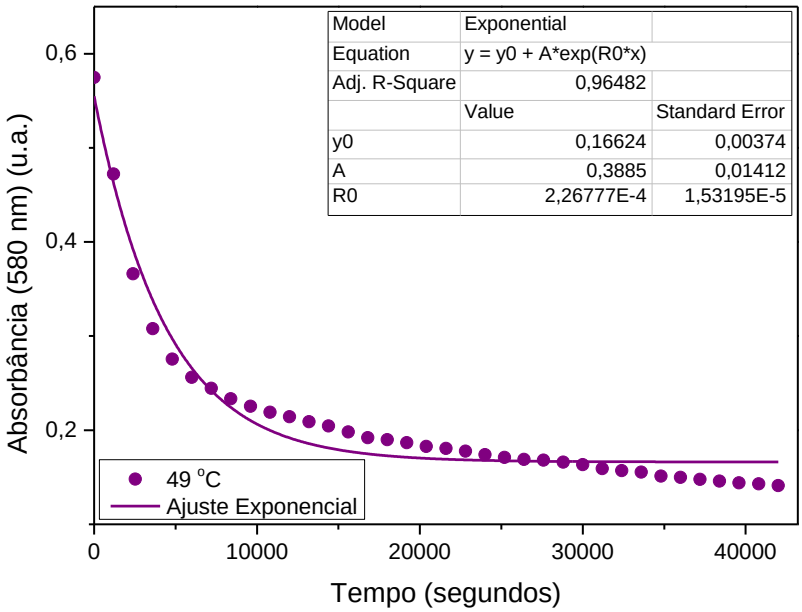
Figura 46: Variação da intensidade de banda em 580 nm em função do tempo, em diferentes temperaturas.




Model | Exponential
Equation | y = y0 + A*exp(R0*x)
Adj. R-Squar | 0,99936
Value | Standard Error
y0 | 0,20335 | 0,00554
A | 0,38557 | 0,00494
R0 | 3,09746E-5 | 8,03126E-7
31 °C
Ajuste Exponencial
Absorbância (580 nm) (u.a.)
Tempo (segundos)


Model | Exponential
Equation | y = y0 + A*exp(R0*x)
Adj. R-Square | 0,99889
Value | Standard Erro
y0 | 0,22541 | 0,00124
A | 0,33979 | 0,00194
R0 | 9,5509E-5 | 1,39501E-6
37 °C
Ajuste Exponencial
Absorbância (580 nm) (u.a.)
Tempo (segundos)


Model | Exponential
Equation | y = y0 + A*exp(R0*x)
Adj. R-Square | 0,99525
Value | Standard Error
y0 | 0,15251 | 0,00177
A | 0,42615 | 0,00553
R0 | 1,74786E-4 | 4,39064E-6
43 °C
Ajuste Exponencial
Absorbância (580 nm) (u.a.)
Tempo (segundos)



Fonte: Autor.

Os dados mostrados na figura 46 corroboram com o que foi discutido para as deconvoluções. Assim como discutido anteriormente para o caso do metanol, as curvas apresentadas para as temperaturas de 25 e 31 $_{o}$C não serão aproveitados pelo fato do tempo de experimento não ter sido o suficiente para o cálculo da constante cinética mais próxima do valor real, uma vez que as curvas não atingiram um platô. Para a temperatura de 37 ^{o}C o experimento começa a atingir o platô caracterizando que o complexo inicial esteja quase totalmente consumido. Quando a observação é feita para as temperaturas de 43 e 49 ^{o}C pode-se concluir que o complexo com dois ligantes THIQ foi praticamente consumindo por completo.

Com base nas curvas apresentadas na figura 46 foi possível determinar a constante de velocidade global em diferentes temperaturas como mostrado na tabela abaixo.

Tabela 13: Valores das constantes de velocidade observadas para diferentes temperaturas.

Temperatura (^{o}C)	k_{obs} (s^{-1})
37	9,55 x10^{-5}
43	1,75 x10^{-4}
49	2,27 x10^{-4}

Fonte: Autor.

Assim como os valores encontrados para o experimento realizado em metanol, no caso da água as constantes de velocidades observadas também são baixas, porém mais altas quando comparadas as constantes de velocidade em metanol. Essa afirmação é um indicativo de que a reação de substituição dos ligantes THIQ por moléculas de água também é lenta.

Em seguida, utilizando-se a equação 53, calculou-se os valores de tempo de meia vida em relação ao aumento da temperatura.

Tabela 14: Valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para diferentes temperaturas.

Temperatura (ºC)	$t_{1/2}$ (horas)
37	2,02
43	1,10
49	0,88

Fonte: Autor.

Apesar de menores que os valores obtidos para o experimento realizado em metanol, os valores aqui apresentados também são substancialmente altos, assinalando que a reação de troca de ligantes é bastante lenta. Com o aumento da temperatura tem-se uma diminuição dos valores de $t_{1/2}$ devido ao aumento de energia do sistema, facilitando então que a E_a necessária seja atingida para que a reação ocorra. Ainda, com o aumento da temperatura aumenta-se também a energia cinética do sistema aumentando a probabilidade de ocorrência de choques efetivos entre o produto e os ligantes em um intervalo mais curto de tempo.

Em 1889, após diversos experimentos, Arrhenius descreveu uma equação capaz de calcular k_c para determinados sistemas,

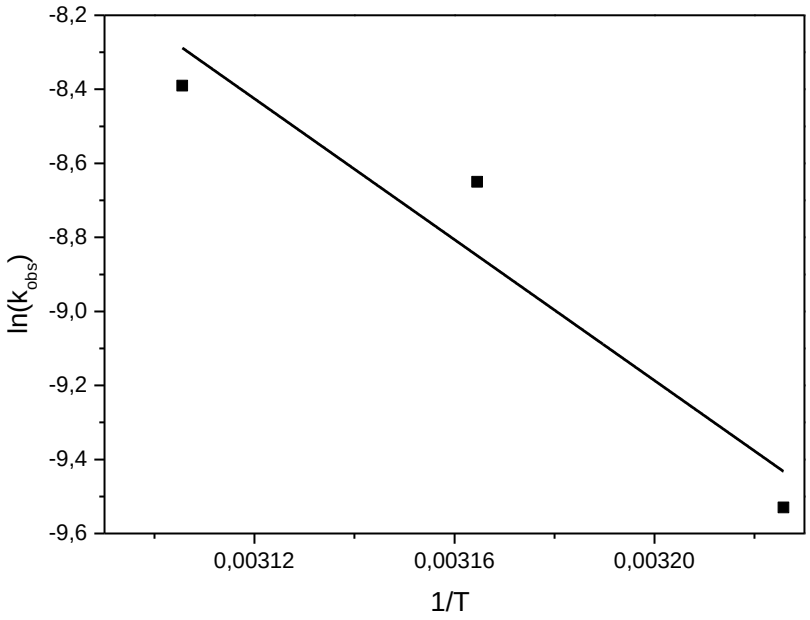
Equação 55

$$k_c = Ae^{-E_a/RT}$$

onde, A e E_a são constantes características da reação, R é a constante dos gases e T é a temperatura. E_a é chamado de energia de ativação de Arrhenius, geralmente expresso em KJ/mol ou Kcal/mol e A é o fator pré-exponencial [177].

Em busca de mensurar os valores de E_a e A, linearizou-se os valores de k_{obs} em função do inverso da temperatura, obtendo-se o gráfico abaixo:

Figura 47: Gráfico de Arrhenius do ln(k_{obs}) versus 1/T, para a reação em estudo.



Fonte: Autor.

A partir do gráfico de Arrhenius, calculou-se os valores de E_a e A com as seguintes equações [177]:

Equação 56

$$slope = -\frac{E_a}{2{,}303.R}$$

Equação 57

$$intercept = lnA$$

Seguindo-se a equação 56 obteve-se para o sistema um valor de E_a de 182,64 KJ.mol^{-1}. Sabe-se que o valor de E_a está diretamente ligado a velocidade da reação. Como pode ser visto para a reação em estudo o valor de E_a é bastante alto, indicando que a velocidade da reação seja baixa por motivos de que a barreira de energia a ser vencida antes que os reagentes se tornem produtos é bastante alta e difícil de se transpor, assim como proposto anteriormente. Isso corrobora também com os altos valores de $t_{1/2}$.

O fator pré-exponencial (A) foi determinado através da equação 57 e seu valor é 1,71x10^9 s^{-1}, como esperado, é um valor bastante alto também. Esse fator pré-exponencial está relacionado com a frequência de colisões (incluindo a orientação) que ocorre entre o complexo e as moléculas do solvente para que

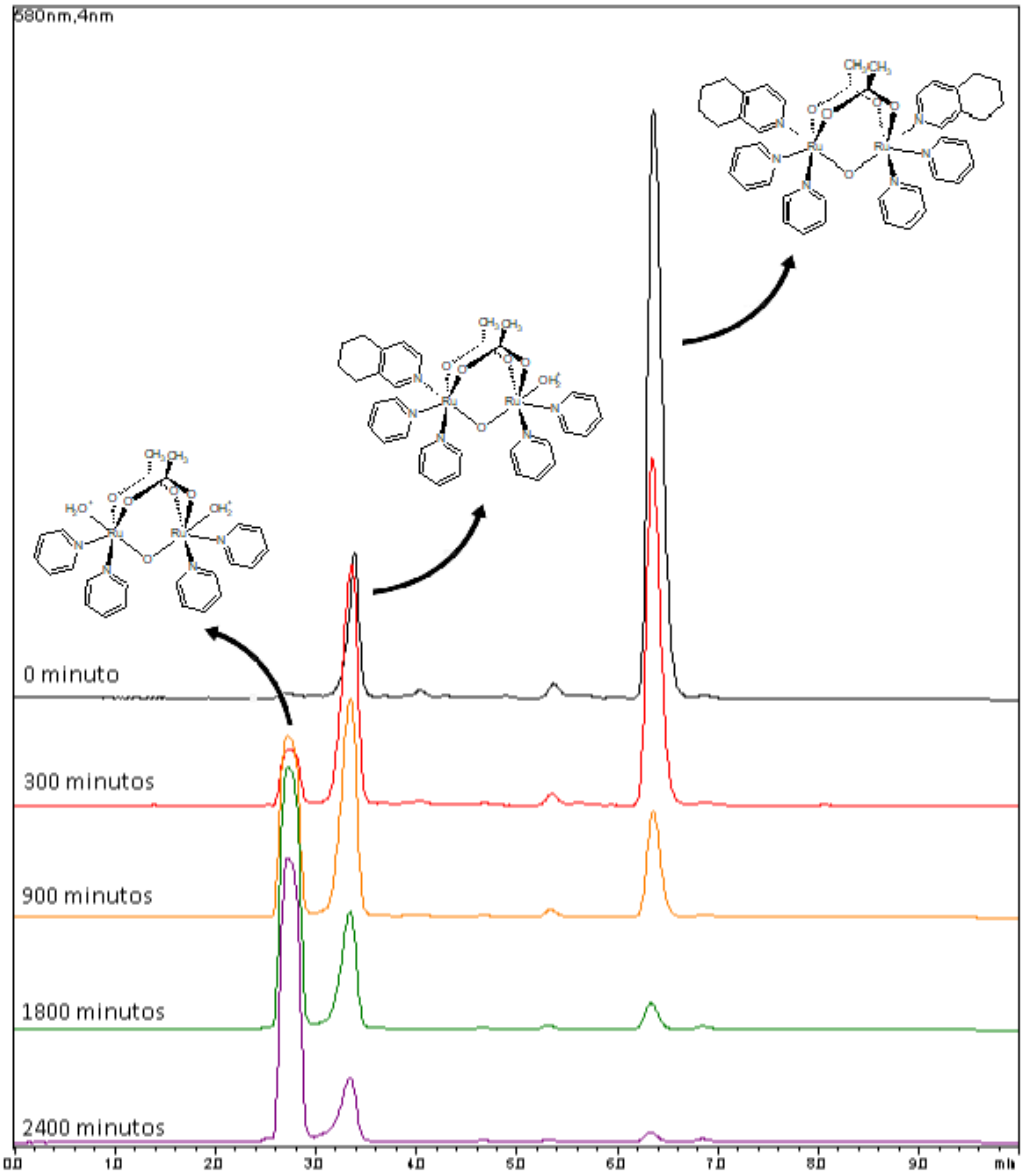
seja formado o produto. Como visto, a Ea é bastante alta então para que a reação ocorra é necessário que um grande número de choques efetivos ocorra, lembrando que boa parte dos choques entre o complexo e moléculas do solvente não resultam em troca dos ligantes.

Quando se compara a água ao metanol, sabe-se que a água por ser uma base mais dura tem maior afinidade pelos íons metálicos Ru^{3+} que também são duros. Além disso, o momento de dipolo da água é (1,87 D) maior que o momento de dipolo do metanol (1,70 D) [178], o que aumenta a sua reatividade. Os dados apresentados acima corroboram com o que foi dito até aqui.

Em busca de resultados mais confiáveis, a troca dos ligantes THIQ por água também foi investigada através de HPLC e os resultados serão mostrados abaixo

Os cromatogramas obtidos para as três temperaturas apresentam o mesmo perfil. Em aproximadamente 5,8 minutos ocorre a eluição do pico relacionado ao complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, após determinado tempo (esse tempo varia em função da temperatura) ocorre a diminuição da intensidade do pico no tempo de 5,8 minutos e concomitantemente ocorre o aparecimento de um novo pico atribuído ao complexo intermediário $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)](PF_6)_2$ em 5,2 minutos, por fim, observa-se um novo pico em 4,9 minutos atribuído ao complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$. É interessante salientar que o pico relacionado ao complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ desaparece quase que completamente, restando no fim um pico de baixíssima intensidade e um outro pico bastante intenso relacionado a troca total dos ligantes THIQ por moléculas de água formando o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$. Abaixo está apresentado os cromatogramas sobrepostos para diferentes tempos, evidenciando o consumo do complexo inicial e formação do complexo intermediário e final. É importante ressaltar que o mesmo perfil é observado para todas as temperaturas, diferem apenas em relação ao tempo em que a reação leva para chegar ao produto final.

Figura 48: Acompanhamento da troca de ligantes do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em água, a 25 ºC.

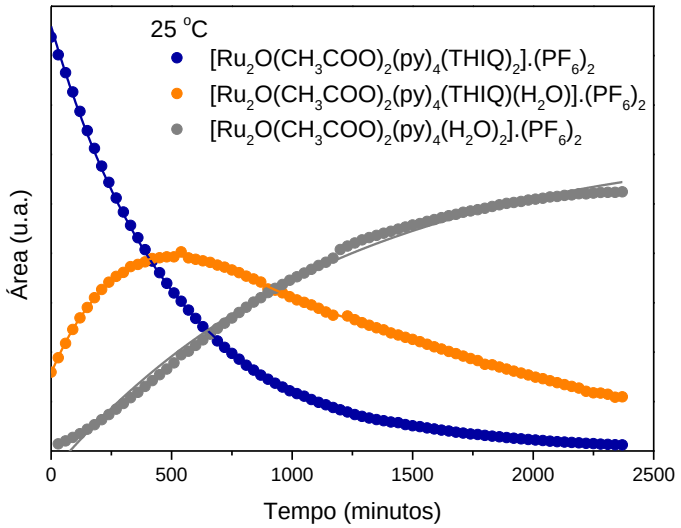


Fonte: Autor.

Através dos experimentos mostrados utilizando-se apenas dados de UV-vís não foi possível determinar qual a etapa da reação de substituição de ligantes que determina a velocidade da reação, ou seja, qual a etapa lenta. Quando se analisa o perfil cromatográfico mostrado para o tempo 0 é possível dizer que a troca do primeiro ligante não seja a etapa lenta, uma vez que já é possível observar um pico com intensidade significativa do complexo intermediário. Mostrando que a troca do primeiro ligante THIQ por molécula de água começa instantaneamente.

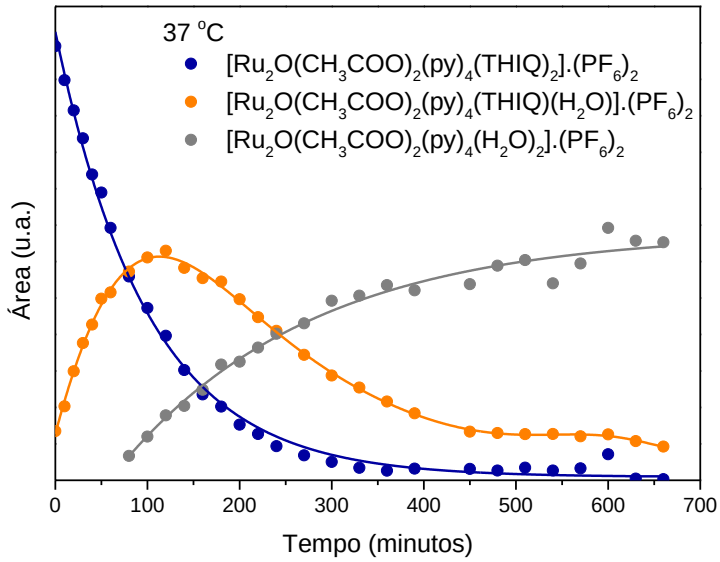
Visto isso, foram plotadas curvas que relacionam a área dos 3 picos mostrados na figura acima em relação ao tempo em três diferentes temperaturas. Os resultados são mostrados na figura 49:

Figura 49: Curva cinética da reação de troca de ligantes da área do pico em relação ao tempo, em 3 diferentes temperaturas.



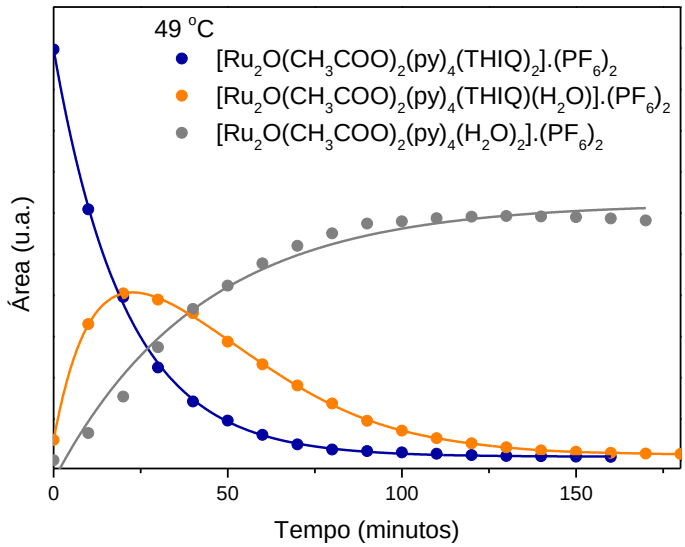
Model	Exponential	Curva Azul
Equation	y = y0 + A*exp(R0*x)	
Adj. R-Square	0,99964	
	Value	Standard Error
y0	1991,20159	488,87148
A	427781,4224	969,00525
R0	-0,00196	1,02151E-5

Model	Exponential	Curva Cinza
Equation	y = y0 + A*exp(R0*x)	
Adj. R-Squar	0,99408	
	Value	Standard Error
y0	317047,91802	5160,42566
A	-338914,28587	4166,92942
R0	-8,5257E-4	3,13007E-5



Model	Exponential	
Equation	y = y0 + A*exp(R0*x)	
Adj. R-Square	0,9966	
	Value	Standard Error
y0	2234,30018	1813,25024
A	305363,88934	3520,20505
R0	-0,00999	2,7776E-4

Model	Exponential	
Equation	y = y0 + A*exp(R0*x)	
Adj. R-Squar	0,97778	
	Value	Standard Error
y0	170164,71357	5845,51841
A	-224741,99801	9576,52835
R0	-0,00475	5,22661E-4



Model	Exponential	
Equation	y = y0 + A*exp(R0*x)	
Adj. R-Square	0,99952	
	Value	Standard Error
y0	4294,71162	1005,78405
A	494123,41181	2824,23816
R0	-0,04902	5,88209E-4

Model	Exponential	
Equation	y = y0 + A*exp(R0*x)	
Adj. R-Square	0,98132	
	Value	Standard Error
y0	311728,4681	7330,57376
A	-335984,71872	11254,9078
R0	-0,02394	0,00205

Fonte: Autor.

De um modo geral, os resultados apresentados na figura acima mostram um comportamento de troca de ligante bastante interessante. A curva em azul mostra o consumo do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, concomitantemente percebe-se que a concentração do complexo intermediário aumenta até uma concentração máxima. Essa concentração apresenta a mesma intensidade para todas as temperaturas, porém ocorre em tempos diferentes. Para a temperatura de 25 ºC o máximo de concentração do complexo intermediário ocorre em 520 minutos, já a temperatura de 37 ºC mostra um máximo de concentração da espécie intermediária em aproximadamente 120 minutos, quando a reação ocorre em 49 ºC a essa concentração ocorre em apenas 25 minutos. Além disso, observa-se que em praticamente todo tempo de reação encontra-se uma mistura das três espécies, o que pode (e provavelmente ocorreu) ter levado à algumas conclusões precipitadas em relação aos máximos de onda que caracteriza cada complexo (inicial, intermediário e final) conforme apresentado nos experimentos de UV-vís.

Em busca de elucidar qual a etapa da reação é a lenta, ou seja, a que determina a velocidade da reação calculou-se as constantes k_1 e k_2, mostradas na equação 57. Onde k_1 é a constante cinética de velocidade de consumo do complexo inicial e velocidade de formação do complexo intermediário e k_2 corresponde a constante cinética de velocidade de consumo do complexo intermediário e velocidade de formação do complexo final.

Tabela 15: Valores das constantes de velocidade para diferentes temperaturas.

Temperatura (ºC)	k_1 (s^{-1})	k_2(s^{-1})
25	1,96 x10^{-3}	0,853 x10^{-3}
37	9,99 x10^{-3}	4,75 x10^{-3}
49	49,0 x10^{-3}	23,9 x10^{-3}

Fonte: Autor.

A partir dos dados apresentados na tabela acima verifica-se que os valores de k_1 são maiores que os a constante k_2. Sendo assim, a etapa lenta é a substituição do segundo ligante THIQ pela molécula de água, ou seja, a etapa que determina a velocidade da reação é a de consumo do complexo intermediário. É possível ainda, perceber que o valor da constante k_1 é

praticamente o dobro de k_2, permitindo a relação $k_1 = 2k_2$, ou seja, a etapa de formação do complexo final é duas vezes mais lenta que a taxa de consumo do complexo inicial.

Visto isso, pode-se escrever a equação da lei cinética de velocidade como:

Equação 58

$$v = k_2[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)(THIQ)]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]]$$

Dando continuidade calculou-se os valores de $t_{1/2}$ para as duas etapas da reação (etapa 1 = substituição do primeiro ligante THIQ; etapa 2 = substituição do segundo ligante THIQ), os valores são mostrados abaixo.

Tabela 16: Valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para diferentes temperaturas.

Temperatura (ºC)	$t_{1/2}$ (minutos)	
	etapa 1	etapa 2
25	5,89	13,5
37	1,17	2,43
49	0,23	0,48

Fonte: Autor.

Os resultados obtidos aqui, tanto os valores das constantes quanto os de $t_{1/2}$, **não** reforçam os valores obtidos anteriormente.

Em vista disso, abaixo será demonstrado a lei cinética da reação em termos da concentração do reagente inicial e das constantes, sendo possível a determinação do $k_{obs.}$

A lei de velocidade da etapa lenta descrita na equação 58 está em termos do complexo intermediário, porém para uma melhor interpretação fez-se necessário reescrevê-la em termos dos reagentes iniciais da equação global (complexo inicial e água), então (para acompanhamento da dedução a seguir olhar equação 54):

Equação 59

$$formação\ do\ complexo\ intermediário = k_1[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]$$

Equação 60

$$consumo\ do\ complexo\ intermediário = k_2[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]$$

Portanto,

Equação 61

$$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)]_{.}(PF_6)_2 = k_1[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]_{.}(PF_6)_2].[H_2O] - k_2[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]$$

Rearranjando-se a equação 61, tem-se:

Equação 62

$$[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)]_{.}(PF_6)_2] = \frac{k_1[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]_{.}(PF_6)_2][H_2O]}{1 + k_2[H_2O]}$$

Sendo,

Equação 63

$$formação\ do\ complexo\ final = k_2[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]$$

Substituindo-se a equação 62 na equação 63, tem-se

Equação 64

$$formação\ do\ complexo\ final = \frac{k_1k_2[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]^2}{1 + k_2[H_2O]}$$

Sabe-se que, $k_1 = 2k_2$, então:

Equação 65

$$formação\ do\ complexo\ final = \frac{2k_2^2[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]_{.}(PF_6)_2].[H_2O]^2}{1 + k_2[H_2O]}$$

Portanto,

Equação 66

$$k_{obs} = \frac{2k_2^2[H_2O]^2}{1 + k_2[H_2O]}$$

Então a equação 64 pode ser escrita como:

Equação 67

$$formação\ do\ complexo\ final = k_{obs}[[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2]_{.}(PF_6)_2]$$

Então, uma possível explicação para as grandes diferenças de valores de $t_{1/2}$ para a análise feita em Uv-vís e HPLC está relacionada a aproximações feitas para a constante k_{obs} quando se utiliza a técnica de Uv-vís que impossibilita a distinção das contribuições de cada espécie, bem como o cálculo de cada constante (k_1 e k_2) de modo independente.

5.9 Estudo da interação entre o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e a HSA

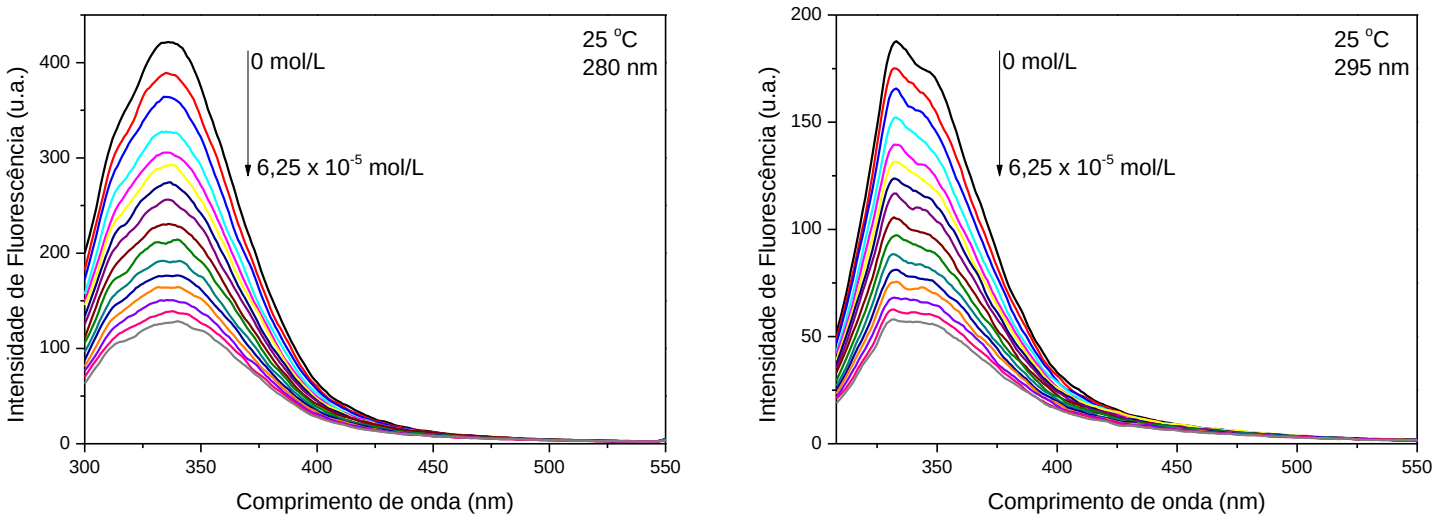
A técnica de espectroscopia de fluorescência é largamente utilizada para se entender como e por onde ocorre a interação entre proteína e determinada molécula. A HSA apresenta três resíduos de aminoácidos que absorvem na região do UV emitindo fluorescência, são eles: fenilalanina, tirosina e triptofano.

Comumente, o resíduo de triptofano (Trp-214) é o mais estudado quando se deseja elucidar o processo de supressão de fluorescência, pelo fato de estar localizado em uma região da HSA com características tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas. Quando a excitação é em 280 nm observa-se a emissão dos resíduos de triptofano e tirosina, já a excitação em 295 nm mostra a fluorescência emitida referente somente ao resíduo Trp-214. Para os dois comprimentos de onda de excitação a emissão de fluorescência ocorre em aproximadamente 340 nm [179].

Na figura 58 estão apresentados os espectros de fluorescência obtidos para a titulação com complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ de uma solução tampão contendo HSA, em 5 diferentes temperaturas com excitação em 280 nm e 295 nm.

Figura 50: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 25 ºC; λ_{exc}=280 (A) nm e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}.

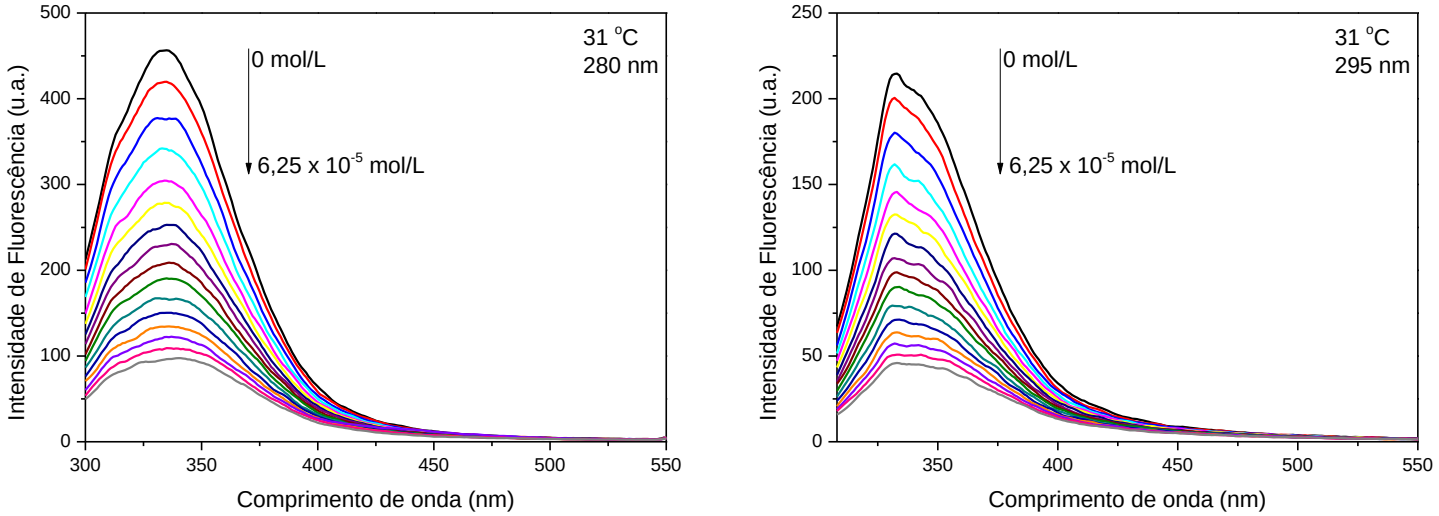
A. **B.**



Fonte: Autor

Figura 51: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 31 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}.

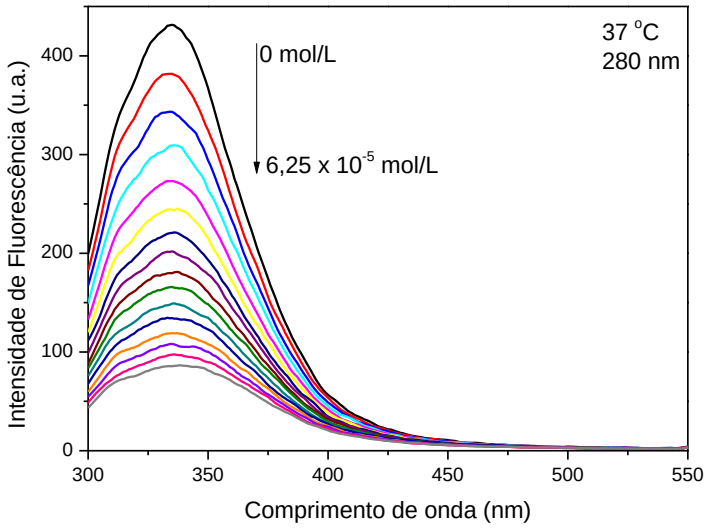
A. **B.**



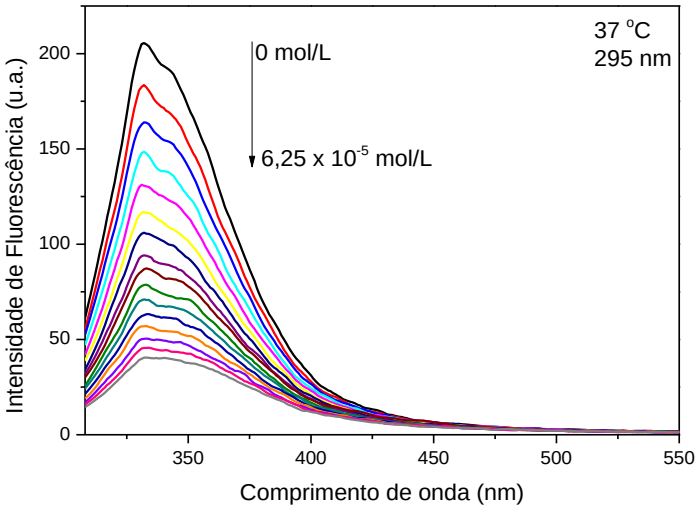
Fonte: Autor.

Figura 52: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 37 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}.

A.



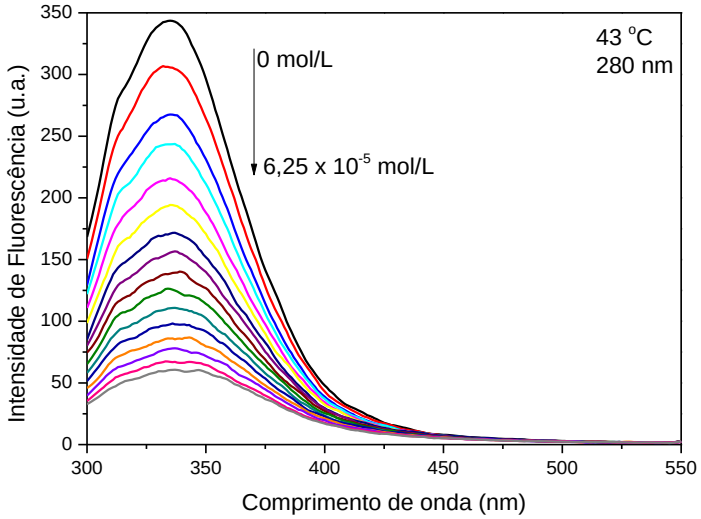
B.



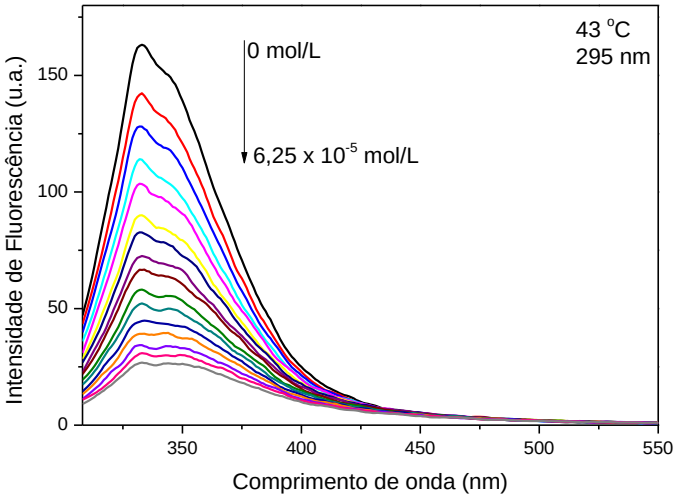
Fonte: Autor

Figura 53: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 43 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}.

A.

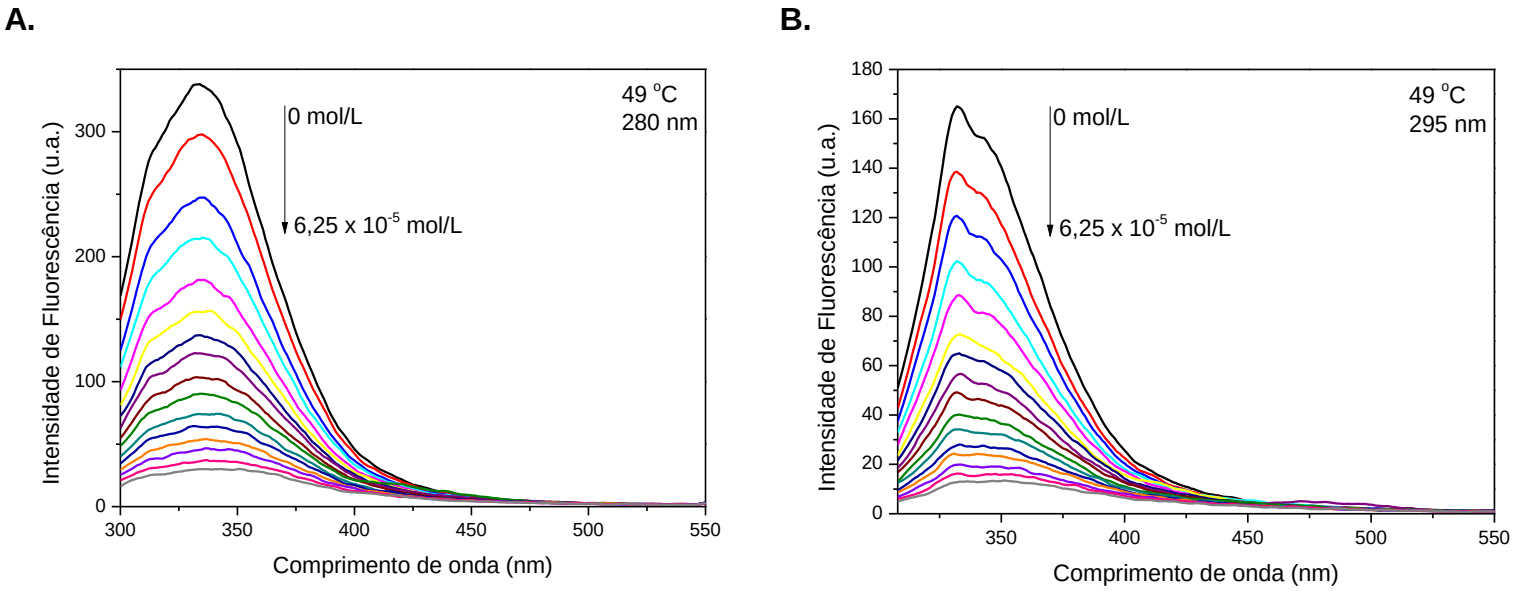


B.



Fonte: Autor.

Figura 54: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 49 ºC; λ_{exc}=280 nm (A) e λ_{exc} = 295 nm (B); [HSA]=1,0x10^{-6}mol.L^{-1} e [complexo]= 0,0 mol.L^{-1}- 6,25 x 10^{-5} mol.L^{-1}.

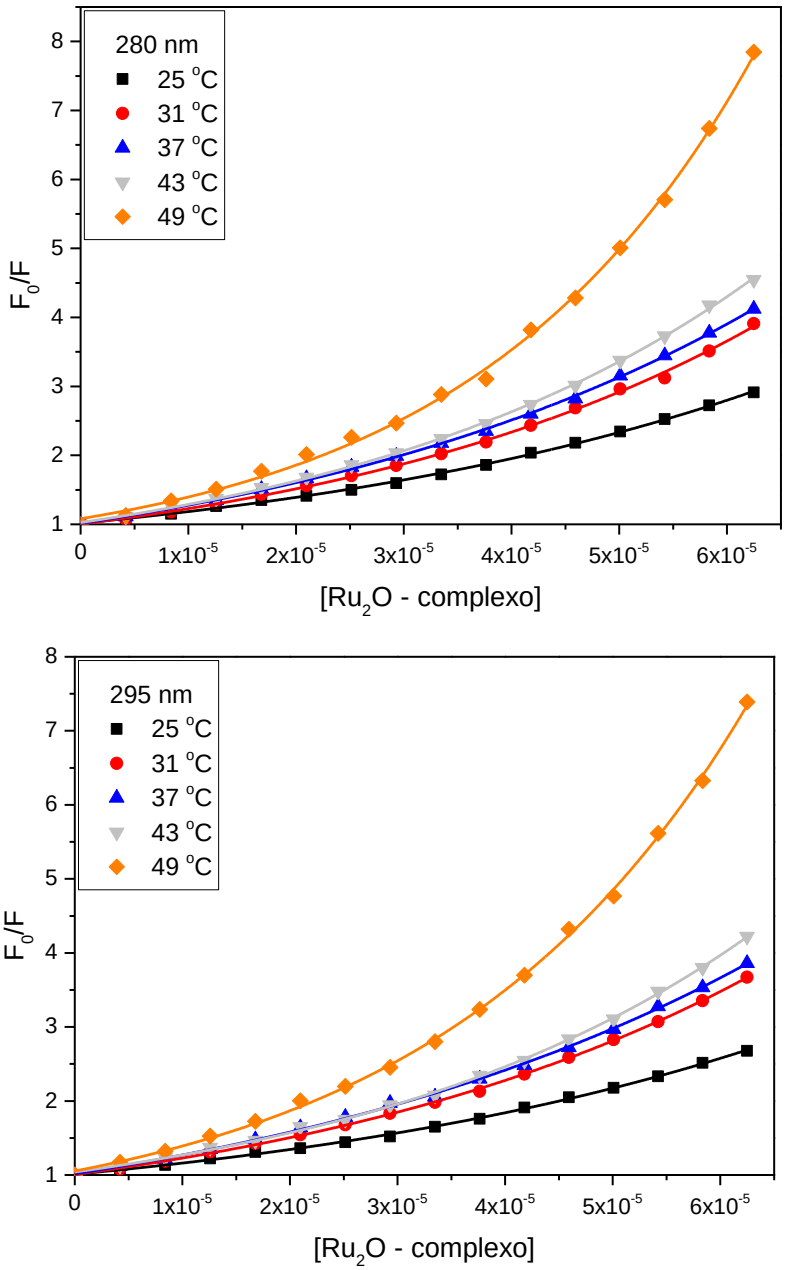


Fonte: Autor

A partir dos espectros mostrados nas figuras 50 a 54, nota-se claramente uma diminuição da intensidade de fluorescência com as adições sucessivas do complexo supressor, o mesmo perfil é observado para todas as temperaturas, sugerindo fortemente que está ocorrendo algum tipo de interação entre a HSA e complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$.

Utilizando-se a equação de efeito filtro mostrada pela equação 3, foi possível determinar as intensidades de fluorescência reais. Em seguida plotou-se gráficos de F_0/F *versus* [Ru_2O - complexo] para as 5 temperaturas, a fim de se obter os valores da constante de Stern-Volmer, $K_{sv.}$ Os valores de K_{sv} são obtidos através do valor de inclinação da reta.

Figura 55: Curvas de F_0/F *versus* concentração do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ com λ_{exc} = 280 e 295 nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49ºC).



Fonte: Autor

Mas qual reta? Em muitos casos, a supressão de fluorescência pode ocorrer através de colisões (mecanismo dinâmico) juntamente com formação de novos complexos com o supressor (mecanismo estático). A característica principal desse tipo de mecanismo combinado de supressão de fluorescência são as curvas de Stern-Volmer apresentarem uma curvatura ascendente, côncava em relação ao eixo y. Esse comportamento é observado acima para o sistema em estudo.

Em vista disso, adaptações devem ser feitas para o cálculo da constante bimolecular de supressão de fluorescência. Resgatando-se a equação 4, descrita anteriormente nota-se uma única constante que descreve o mecanismo de supressão de fluorescência. Porém, quando se observa uma mistura dos dois mecanismos de supressão essa equação pode ser reescrita da seguinte maneira:

Equação 68

$$\frac{\mathrm{F}_0}{\mathrm{F}} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q])$$

onde, F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente; [Q] é a concentração do agente supressor; K_D é constante de supressão de fluorescência dinâmica e K_S é constante de supressão de fluorescência estática [139].

Essa forma modificada da equação de Stern-Volmer é de segunda ordem em relação [Q], o que explica a curvatura ascendente observada.

Multiplicando-se os termos entre parênteses da equação 68, tem-se:

Equação 69

$$\frac{\mathrm{F}_0}{\mathrm{F}} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2$$

A equação acima pode ser reescrita em termos de uma única constante de supressão de fluorescência que será a soma das constantes K_S e K_D:

Equação 70

$$\frac{\mathrm{F}_0}{\mathrm{F}} = 1 + K_{ap}[Q]$$

onde, K_{ap} é constante de supressão de fluorescência aparente do sistema.

Em termos matemáticos, K_{ap} é definido como:

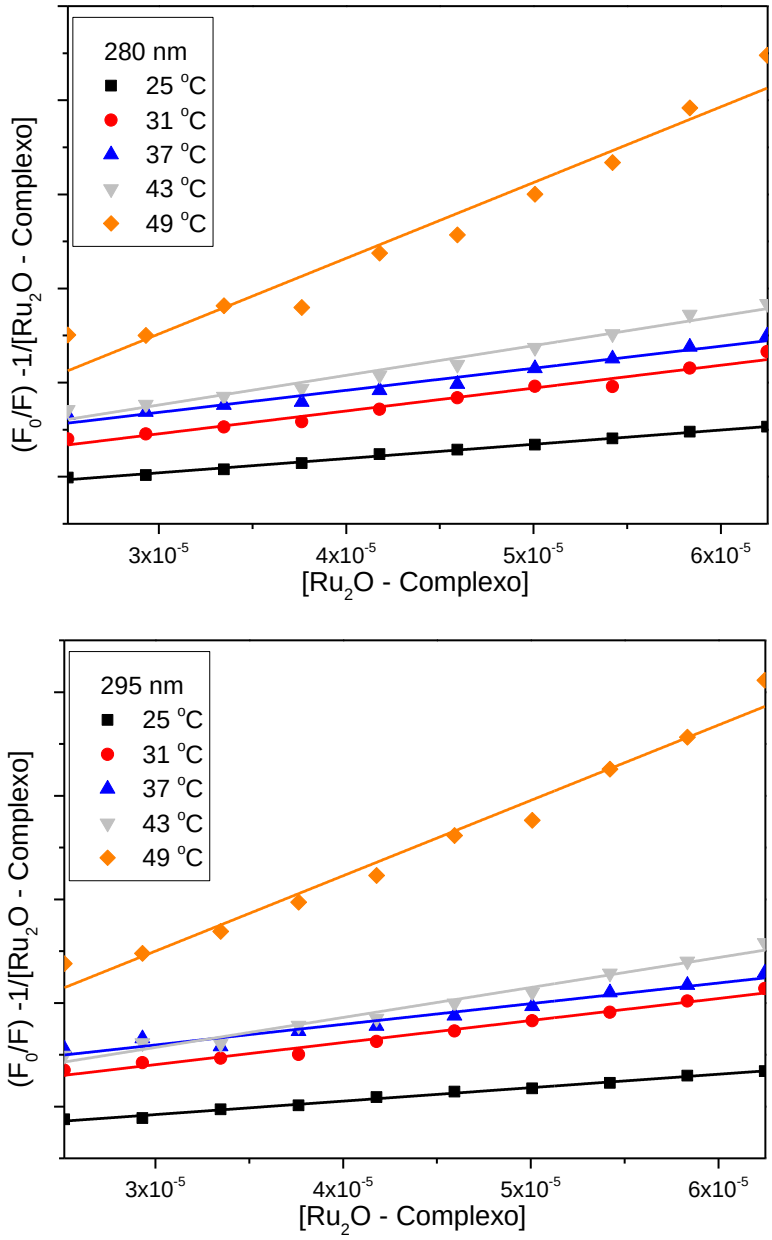
Equação 71

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

Segundo a literatura, um gráfico de K_{ap} *versus* [Q] produz uma reta que intercepta o eixo y no ponto que corresponde a soma das constantes K_D e K_S e a inclinação dessa reta corresponde ao produto das constantes $K_D.K_S$.

A seguir estão representadas as curvas linearizadas para o sistema em estudo

Figura 56: Curvas de supressão de fluorescência estática e dinâmica em diferentes concentrações do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ com λ_{exc} = 280 e 295 nm em diferentes temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49ºC).



Fonte: Autor.

Mesmo tendo em vista que a supressão de fluorescência seja do tipo estático e dinâmico, vale a pena prosseguir com as análises do modelo de Stern-Volmer.

A magnitude da constante de supressão K_{ap}, tanto para excitação em 280 quanto para excitação em 295 nm, são substancialmente mais altas quando comparadas aos valores comumente encontrados na literatura para compostos metálicos de rutênio [180] [181] [182], sugerindo que a presença do complexo causa alterações na estrutura secundária da HSA.

Quando se analisa os valores da constante K_{ap} obtidos para excitação em 280 nm, nota-se claramente um aumento de K_{ap} com o aumento da temperatura, indicando que o mecanismo predominante de supressão de fluorescência é o dinâmico. O mesmo comportamento é encontrado quando o comprimento de onda de excitação é 295 nm. O aumento da eficiência de supressão de fluorescência com a elevação da temperatura ocorre devido à maior movimentação das moléculas (tanto supressor quanto fluoróforo) em solução, consequentemente há uma maior probabilidade de ocorrer choques efetivos que ocasionem a supressão de fluorescência [183]. Além disso, em temperaturas mais elevadas o complexo sofre uma maior dissociação facilitando a ocorrência de ligações covalentes entre a espécie dissociada e a HSA, além disso tem-se uma conformação menos enovelada da HSA, deixando os resíduos de triptofano e/ou tirosina mais expostos e suscetíveis a interação com o complexo supressor.

Sabe-se da literatura [138] [184], que o tempo de vida do estado excitado da HSA é de aproximadamente 10^{-8} s. Para um mecanismo de supressão dinâmico a relação entre os valores de K_{ap} e k_q se dá como representado na equação abaixo:

Equação 72

$$K_{ap} = k_q . \tau_0$$

onde, K_{ap} é constante supressão de fluorescência; k_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão e τ_0 é o tempo de vida do estado excitado da HSA.

Como os valores de K_{ap} já estão calculados e o valor de τ_0 é dado, fica fácil o cálculo da constante de velocidade de supressão molecular, esses valores estão apresentados na tabela:

Tabela 17: Constante de supressão de fluorescência (K_{ap}) e constante de velocidade de supressão bimolecular de fluorescência (k_q), para diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura (ºC)	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ ($x10^{-5}$ mol.L^{-1})			
	K_{ap} (M^{-1}) ($x10^8$)		k_q ($M^{-1}s^{-1}$) ($x10^{16}$)	
	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm
25	3,09	2,60	3,09	2,60
31	4,86	4,26	4,86	4,26
37	4,70	3,99	4,70	3,99
43	6,31	5,79	6,31	5,79
49	16,1	14,5	16,1	14,5

Fonte: Autor.

As tendências dos valores de k_q são as mesmas observadas para K_{ap}. Nesse ponto a análise a ser feita diz respeito a comparação da ordem de grandeza da constante k_q com a constante difusional (k_{dif} = 2 x10^{10} $M^{-1}.s^{-1}$) que limita o processo bimolecular [185] [186] [187], comparação essa que possibilita indicar qual mecanismo predominante de supressão de fluorescência.

Observa-se que os valores de k_q são significativamente maiores (cerca de 1.000.000 vezes maior) que o valor da constante difusional. Essa relação indica que o mecanismo predominante de supressão é o estático [186].

A análise dos valores de k_q mostra que o encontro entre a molécula supressora e o fluorofóro é mais rápido do que a constante difusional do meio, ou seja, o encontro entre o fluoróforo e supressor dura tempo suficiente para haver uma interação ou ligação suficientemente forte que resulte na formação de uma nova espécie não-fluorescente [186].

Além disso, a investigação das mudanças dos valores de k_q com a temperatura é uma ferramenta importante a respeito do tipo de processo de supressão de fluorescência. Uma vez que a supressão de fluorescência dinâmica depende da difusão das moléculas (supressor e fluoróforo), espera-se que as constantes de velocidade de supressão bimolecular aumentem com o aumento da temperatura. Portanto, temperaturas mais altas resultam em maiores velocidades de difusão. Em suma, os valores de k_q precisam aumentar com o aumento da temperatura para um mecanismo de supressão do tipo dinâmico, concordando com o que foi dito anteriormente quando feita a análise dos valores de K_{ap} [188].

Interessante nesse ponto ressaltar que o valor da constante difusional utilizada para esse sistema foi um valor genérico utilizado para sistemas análogos. Sabe-se que muitas aproximações são feitas a fim de se determinar essa constante. Além disso, o valor de k_{dif} tem uma relação direta com a temperatura, os experimentos foram realizados em uma faixa de temperatura muito grande e provavelmente os valores de k_{dif} embutem erros que podem comprometer a análise de distinção do mecanismo de supressão de fluorescência.

É relevante notar também, que K_{ap} tem valores muito parecidos quando comparadas entre 280 e 295 nm em uma mesma temperatura. Esse comportamento permite dizer que a interação entre o complexo e a HSA deve estar ocorrendo preferencialmente no sítio relativo ao triptofano.

O experimento de estudo da fluorescência da HSA dura aproximadamente 75 minutos para cada temperatura. Segundo os experimentos de cinética mostrados acima, para a temperatura de 49 ^{o}C não há mais o complexo inicial interagindo antes do término do experimento, ou seja, a HSA está interagindo com o complexo intermediário e final, além de ligantes THIQ livres. Para as demais temperaturas é possível observar a coexistência das três espécies de complexos. Visto isso, observa-se que para a temperatura de 49 ^{o}C o valor da constante é significativamente mais alto que para as demais temperaturas, o que pode estar ligado aos complexos com ligante aquo (intermediário e final) terem uma maior afinidade pela HSA em relação ao complexo com dois ligantes THIQ. Esse mesmo comportamento é observado na cis-platina que passa a ter atividade apenas quando ocorre a substituição do(s) ligante(s) cloreto(s) por molécula(s) de água [16].

É importante nesse ponto, recuperar a ideia de que está ocorrendo supressão de fluorescência do tipo estático e do tipo dinâmico, e as análises mostradas até agora indicam que essa relação é realmente verdadeira.

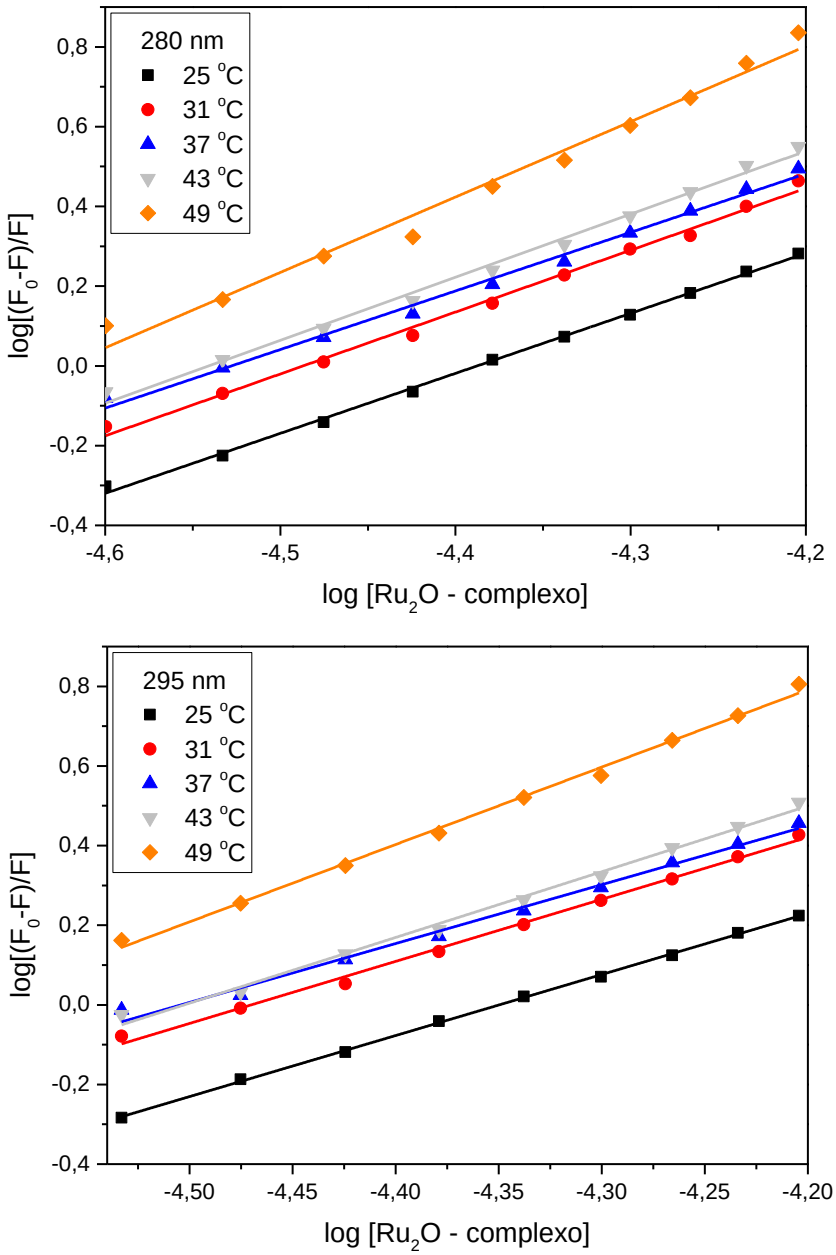
Quando as moléculas se ligam de forma independente a um conjunto de sítios equivalentes em uma macromolécula, o equilíbrio entre as moléculas livres e as moléculas ligadas é dado pela equação:

Equação 73

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = logK_b + n.\log[Ru_2O - complexo]$$

onde, F e F_0 são as intensidades de fluorescência na presença e na ausência do supressor, respectivamente; K_b é a constante de ligação aparente do [Ru_2O – complexo] à HSA; n é o número de potenciais sítios de ligação à HSA e [Ru_2O – complexo] é a concentração do supressor.

Figura 57: Gráfico do log[(F_0-F)/F] *versus* log [$Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, para λ_{exc} = 280 e 295 nm em diferentes temperaturas de incubação.



Fonte: Autor.

Tabela 18: Constantes de ligação (K_b) e números de sítios de ligação do supressor (n), para diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura (ºC)	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2].(PF_6)_2$ ($x10^{-5}$ mol.L^{-1})			
	280 nm		295 nm	
	K_b (M^{-1}) ($x10^6$)	n	K_b (M^{-1}) ($x10^6$)	n
25	4,07	1,01	4,68	1,03
31	9,33	1,05	9,55	1,05
37	4,57	1,07	4,57	1,07
43	14,8	1,58	26,9	1,65
49	549,5	1,89	891,3	1,94

Fonte: Autor.

Segundo a literatura, os valores de K_b para sistemas em que a HSA está presente encontram-se entre 10^4 M^{-1} e 10^6 M^{-1} [189], mais comumente próximos de 10^4 M^{-1}. Com base nos valores apresentados na tabela acima, nota-se que os resultados obtidos são consideravelmente mais altos para as temperaturas mais elevadas do que diz a literatura.

Em busca de uma melhor interpretação dos resultados obtidos para as constantes de ligação vale a pena retomar a ideia discutida no capítulo de cinética de troca de ligantes THIQ por moléculas de água utilizando-se HPLC. Como pode ser visto a partir da tabela 16, o tempo de vida diminui com o aumento da temperatura. Os valores de K_b encontrados para as temperaturas de 25, 31 e 37 ºC são bastante semelhantes, sobretudo devido ao fato de em menores temperaturas haver uma maior quantidade do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em relação as temperaturas mais altas. Em contrapartida, para a temperatura de 49 ºC o tempo de meia vida do complexo é muito menor por esse motivo o valor da constante de ligação aumenta abruptamente. Nesse caso, ocorre a existência majoritária dos complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)](PF_6)_2$ e $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$ em concentrações maiores que o complexo inicial, o que explica a diferença na tendência dos valores da constante de ligação com a HSA. Peter J. Sadler e colaboradores [190], mostraram que a cis-platina interage em diferentes regiões da HSA conforme ocorre a substituição dos ligantes cloretos por moléculas de água. O altíssimo valor de K_b para a temperatura de 49 ºC está relacionado a

maior afinidade do complexo com ligantes aquo por outras regiões além do triptofano e tirosina.

Voltando a análise do mecanismo de supressão de fluorescência e seguindo o raciocínio exposto até agora, a tendência dos valores obtidos para a constante de ligação, induz a um mecanismo predominantemente estático, uma vez que o aumento da temperatura está aumentando também os valores da constante de ligação permitindo concluir que esteja sendo priorizado fortes ligações do complexo à HSA em relação a interações de naturezas mais fracas.

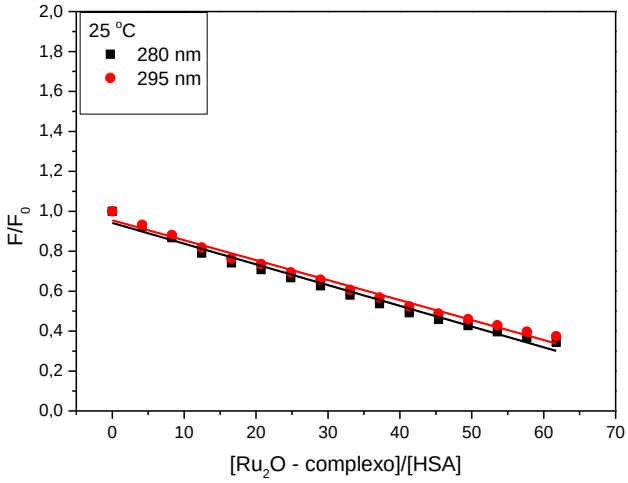
O número de sítios de ligação (n) para as três temperaturas mais baixas estão próximos de 1, o que sugere que o complexo está se ligando à HSA na proporção de 1:1. Ao que tudo indica a supressão de fluorescência está ocorrendo apenas na região dos resíduos de triptofano. A pequena flutuação de valores observados para o número de sítios de ligação pode ser explicada pela mudança de conformação da albumina que provavelmente modifica o modo de interação entre o fluoróforo e o supressor. O supressor pode não penetrar o interior hidrofóbico da proteína, e somente os fluoróforos localizados na superfície da proteína terão sua fluorescência suprimida.

Quando a análise é feita para as duas temperaturas mais altas percebe-se que esse valor chega próximo de 2. Provavelmente os novos complexos formados, estejam conseguindo acessar e se coordenar a HSA em outros sítios que o complexo inicial não consegue.

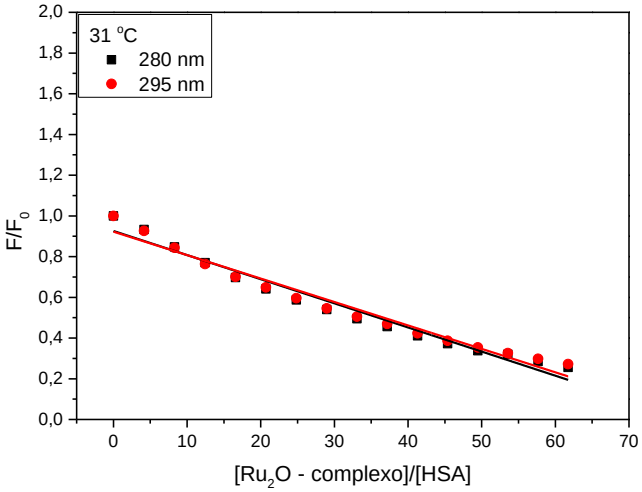
Foi dito acima que, *"Ao que tudo indica a supressão de fluorescência está ocorrendo apenas na região dos resíduos de triptofano"*. Esta dúvida pode ser respondida a partir da comparação de gráficos que relacionam F/F_0 com [Ru_2O – complexo]/[HSA] em determinada temperatura, nos dois comprimentos de onda de excitação, como mostrado nas figuras 58.

Figura 58: Curvas da intensidade da fluorescência (F/F_0) em função da razão molar [supressor]/[HSA]para os dois comprimentos de excitação (λ_{exc}= 280 e 295 nm), para as temperaturas de incubação de 25 (A), 31 (B), 37 (C), 43 (D) e 49 ºC (E).

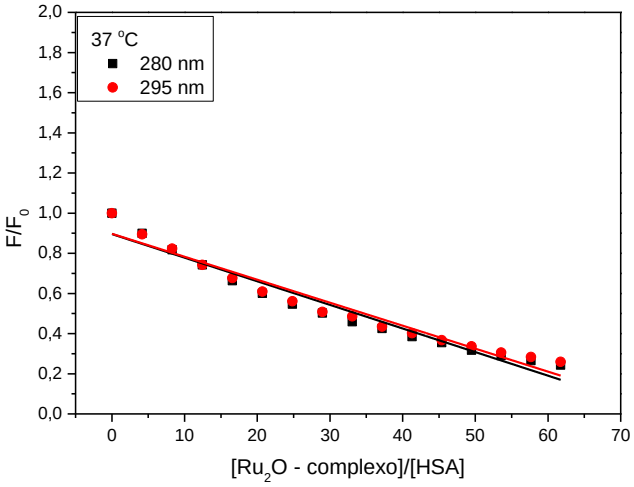
A.



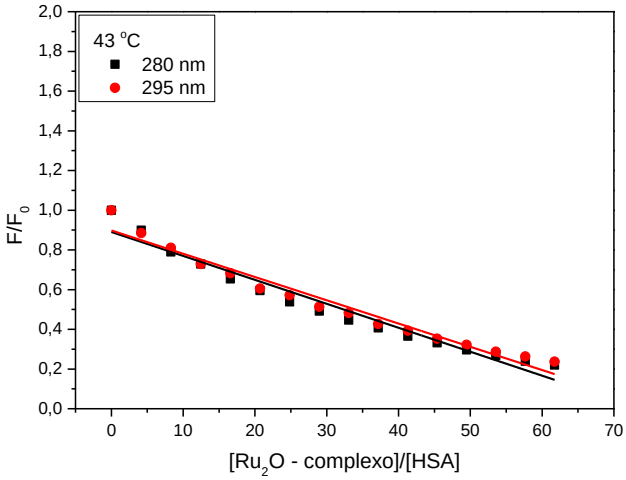
B.



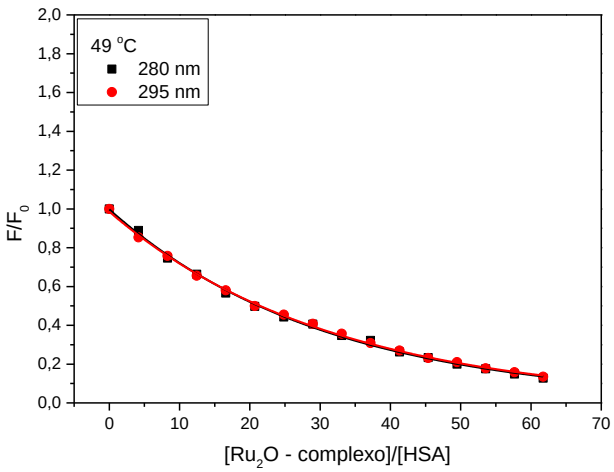
C.



D.



E.



Fonte: Autor.

Como já dito, quando a excitação é 280 nm registra-se a emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano e tirosina, já a excitação em 295 nm é referente apenas ao resíduo de triptofano. Através da comparação entre os comprimentos de onda de excitação em uma mesma temperatura, pode-se verificar se o supressor está interagindo em apenas uma região da HSA ou em mais regiões. Quando há sobreposição entre as curvas da intensidade de fluorescência para 280 nm e 295 nm significa que o supressor está se ligando apenas à região do triptofano (resíduo Trp-214); ao contrário, quando as curvas não se sobrepõem, o supressor pode estar interagindo em outras regiões além daquela onde está situado o triptofano [191]. Isso porque, quando ocorre sobreposição das curvas pode-se inferir que o resíduo de tirosina não está participando da emissão de fluorescência quando excitado.

Pela figura 58, conclui-se que a interação da HSA com o complexo esteja ocorrendo apenas na região do triptofano. De fato, esse comportamento era esperado para as 3 temperaturas mais baixas, porém para 43 e 49 ^{o}C esperava-se um desvio entre as curvas. Uma possível explicação é de que os complexos $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)(H_2O)](PF_6)_2$ e $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$ estejam interagindo na região do Trp-214 e também podem estar acessando regiões da HSA que não apresentam fluorescência na região em que o estudo foi realizado e que os complexos não consigam, por esse motivo os valores de n são diferentes de 1.

Em geral, quatro tipos de forças são responsáveis por unir uma molécula a uma proteína, são elas: forças eletrostáticas, forças de van der Waals, forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio [183] [192] [193]. O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite o cálculo dos parâmetros termodinâmicos, como a variação de energia livre (ΔG), variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS). ΔG descreve a espontaneidade do processo, enquanto ΔH e ΔS caracterizam as forças ou tipos de ligações que estão sendo formadas [194]. Valores de ΔH e $\Delta S > 0$ indicam forças hidrofóbicas, ΔH e $\Delta S < 0$ sugerem forças de van der Waals e ligações de hidrogênio e $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ refletem forças eletrostáticas [195].

Conforme descrito no parágrafo acima, as Interações Hidrofóbicas ocorrem quando ΔH e $\Delta S > 0$. Quando $\Delta H > 0$ temos um processo endotérmico, ou seja, a somatória da energia da quebra das ligações é maior que a somatória

da energia necessária para formação das mesmas. Valores positivos de ΔS indicam um aumento da “desordem” do sistema em estudo. Quando uma molécula hidrofóbica é inserida em um meio aquoso, ocorre quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Em seguida as moléculas de água irão se ligar novamente para formar uma esfera de solvatação ao redor da molécula hidrofóbica. Quando essa esfera de solvatação é formada ocorre um rearranjo entre as moléculas de H_2O, que diminui a “desordem” do sistema ($\Delta S < 0$).

A mudança de entalpia do sistema poderá ser positiva, negativa ou igual a zero, porém esta mudança é insignificante para determinação da espontaneidade da ligação, visto que o valor de ΔS é grande, então $\Delta G > 0$.

Porém, para que haja interação entre duas moléculas hidrofóbicas é necessário que as esferas de solvatação dessas duas moléculas sejam desfeitas, ou seja, ocorrerá a quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água que as formam. A aproximação entre duas moléculas hidrofóbicas promove o colapso da estrutura organizada da esfera de solvatação, permitindo assim a interação entre elas. O colapso da esfera de solvatação causa um aumento da desordem do sistema, portanto, $\Delta S > 0$.

A soma da entalpia da quebra das ligações entre as moléculas de água é maior que a soma das entalpias da interação entre as moléculas hidrofóbicas, então temos, $\Delta H > 0$ (o valor de ΔH é maior que zero, porém apresenta valor baixo).

No caso das ligações de hidrogênio e forças de van der Waals a formação das ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$), entre as moléculas de água e também entre moléculas de água e outras moléculas, diminuem a entalpia do sistema, pois a formação dessas ligações é um processo exotérmico. Ao mesmo tempo está ocorrendo uma organização entre as moléculas que estão se ligando, diminuindo assim a entropia do sistema, tem-se $\Delta S < 0$.

O mesmo ocorre com as interações de van der Waals, a ligação/interação entre moléculas polarizadas é entalpicamente negativa, pois se trata de um processe exotérmico. A ligação/interação entre essas moléculas, de certa forma, organiza o sistema, diminuindo assim a desordem do mesmo.

Por fim, para ocorrer interação eletrostática é necessário que ocorra a quebra da esfera de solvatação dos íons (cátions e/ou ânions), o que provoca

uma desorganização das moléculas de água que constituíam essa esfera e consequentemente ΔS será positivo. A entalpia terá valores negativos (processo exotérmico), pois a somatória das interações/ligações formadas entre as espécies carregadas é maior que a somatória das ligações rompidas entre as moléculas de água da esfera de solvatação.

Para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos, usa a equação de van´t Hoff, descrita abaixo:

Equação 74

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

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

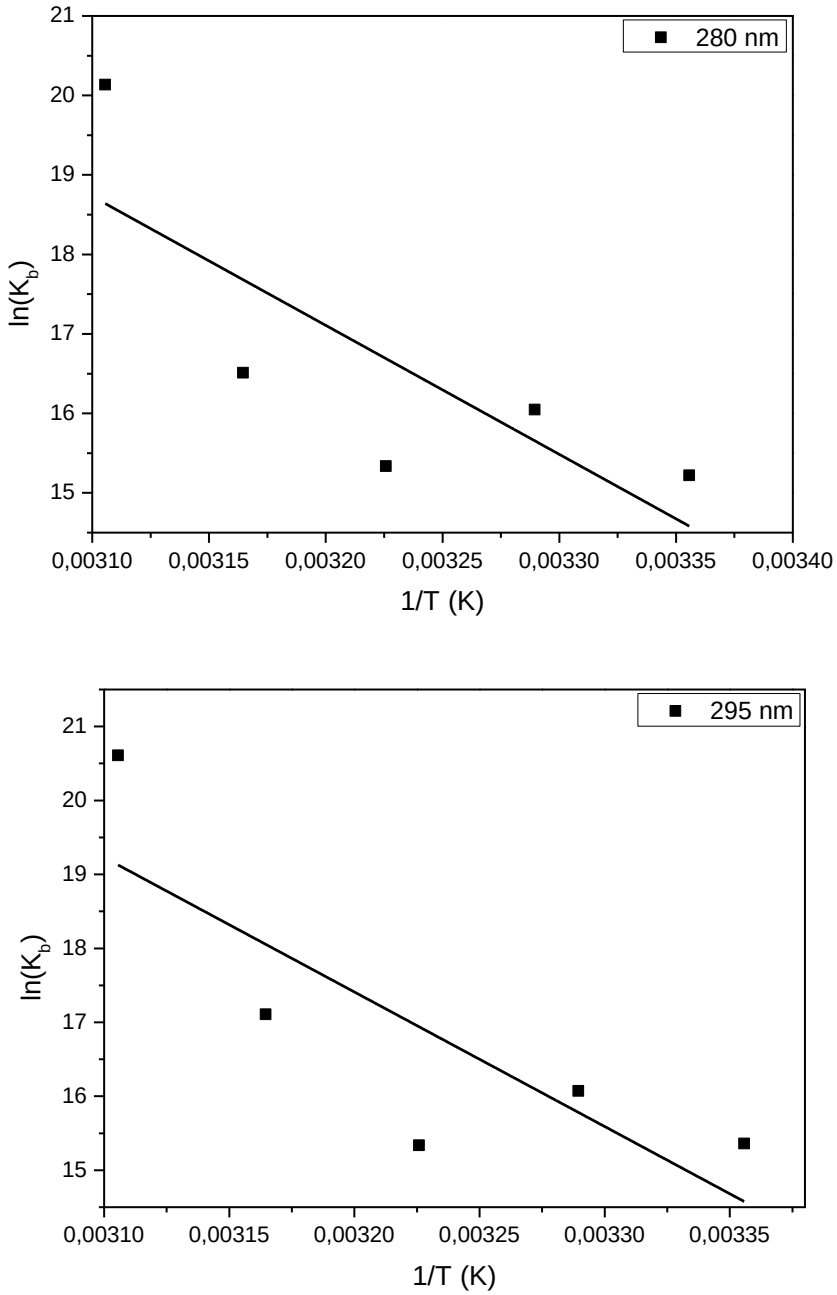
A partir desta equação, constrói-se o gráfico de van´t Hoff (figura 59). Por meio de seus coeficientes angular e linear foram obtidos os parâmetros termodinâmicos. A variação de energia livre foi calculada de acordo com a equação abaixo:

Equação 75

$$\Delta G = -RTlnK_b$$

onde, T é a temperatura em Kelvin, R a constante dos gases e K_b é a constante de ligação.

Figura 59: Gráfico de van´t Hoff, para excitação em λ_{exc}=280 e 295 nm, em diferentes temperaturas de incubação (25, 31, 37, 43 e 49 ºC).



Fonte: Autor.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos estão mostrados na tabela abaixo. Os valores de ΔG são todos menores que zero, mostrando que a interação entre o complexo supressor e a HSA é espontânea. Ademais, percebe-se que, tanto para excitação em 280 nm quanto para excitação em 295 nm, os valores de ΔS são maiores que zero e os valores de ΔH são menores que zero.

Os valores obtidos mostram que a interação predominante entre o complexo supressor e HSA é do tipo eletrostático. Era de se esperar esse comportamento uma vez que o complexo supressor, quando em solução, apresenta carga positiva e biomoléculas, como a HSA, apresentam carga resultante negativa, o que explica muito bem a atração eletrostática existente entre esses dois grupos de moléculas.

É interessante notar que os valores dos parâmetros termodinâmicos são todos maiores quando a análise é feita em 295 nm, indicando que o complexo interage com maior facilidade e força na região específica do triptofano. Há interações em outras regiões, porém não são tão significativas quanto esta.

Os valores de ΔS são positivos uma vez que é necessária quebrar toda a rede de solvatação que envolve as moléculas de HSA, causando assim uma grande perturbação no sistema. Em contrapartida, valores negativos de ΔH sugerem que o ganho de energia nas interações entre as espécies carregadas (complexo supressor e HSA) é maior do que a somatória das ligações rompidas entre as moléculas de agua da esfera de solvatação.

Tabela 19: Parâmetros termodinâmicos da interação entre o complexo supressor e a HSA, para λ_{exc} = 280 e 295 nm.

Temperatura (ºC)	280 nm			295 nm		
	ΔH (KJmol^{-1})	**ΔS (Jmol^{-1}K^{-1})**	**ΔG (KJmol^{-1})**	**ΔH (KJmol^{-1})**	**ΔS (Jmol^{-1}K^{-1})**	**ΔG (KJmol^{-1})**
25	-134,9	574,0	-37,7	-151,3	628,8	-38,0
31			-40,6			-40,6
37			-39,5			-39,5
43			-43,4			-44,9
49			-53,9			-55,2

Fonte: Autor.

Os resultados apresentados acima indicam com clareza que o mecanismo de supressão de fluorescência é do tipo dinâmico e estático. Medidas do tempo de vida do estado excitado da HSA foram realizadas para melhor investigação desses mecanismos.

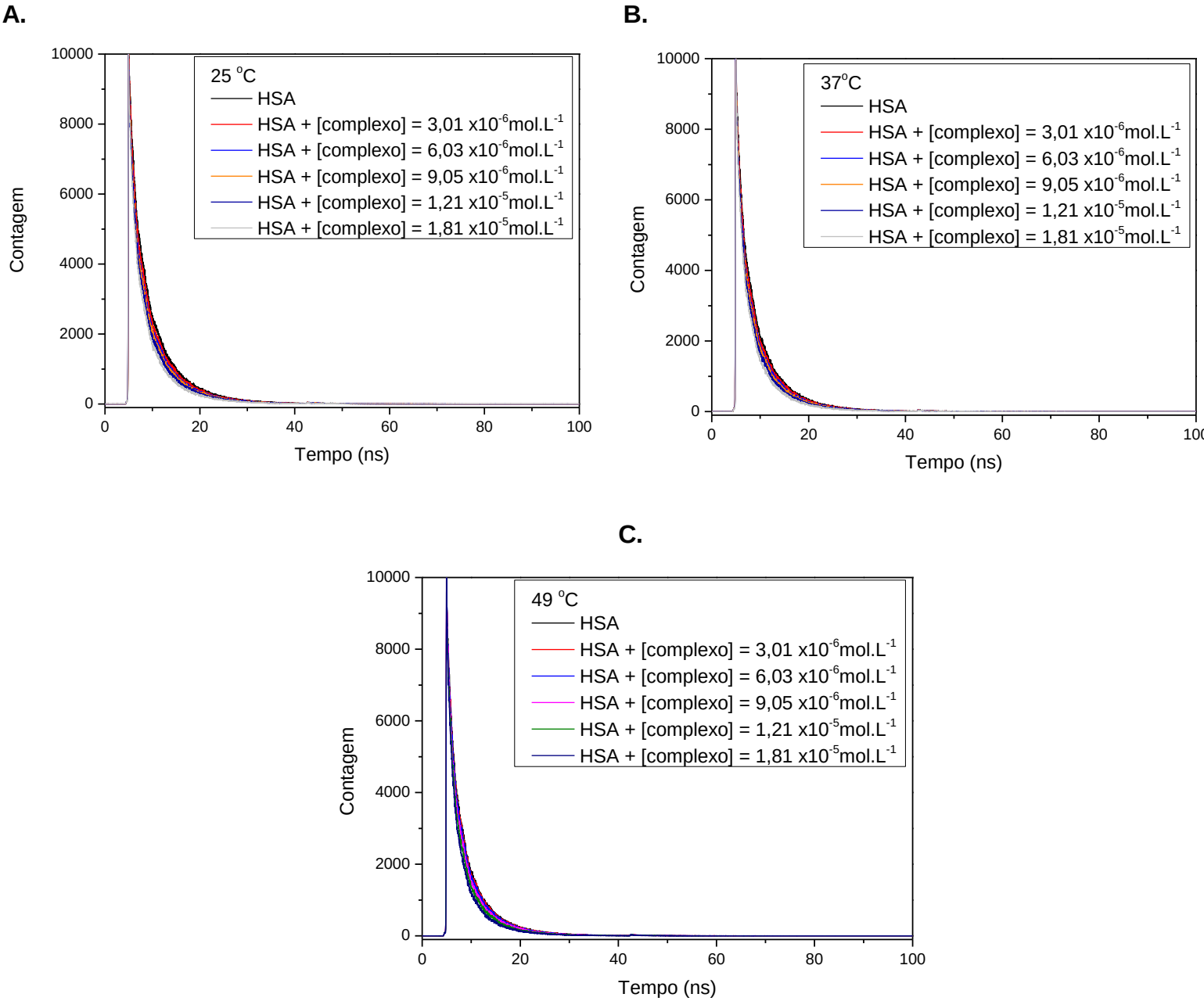
5.10 Tempo de vida

O estudo de supressão de fluorescência através do modelo matemático de Stern-Volmer determinou que a supressão de fluorescência está ocorrendo a partir do mecanismo estático e dinâmico de supressão da fluorescência.

O tempo de vida do estado excitado da HSA é sensível a interação HSA-complexo e é comumente utilizada para a determinação do mecanismo de supressão de fluorescência. Segundo esse método, quando a supressão de fluorescência é predominantemente do tipo estática, observa-se que uma fração dos fluoróforos são “removidos” do sistema em estudo, pois há a formação de adutos entre a HSA e o complexo de binuclear de rutênio, formando um novo complexo. Esses novos complexos não apresentem fluorescência, então a fluorescência medida está totalmente relacionada aos fluoróforos livres. Como a fração livre não é perturbada, o tempo de vida do estado excitado da HSA não sofre alteração alguma. Em contrapartida, quando se trata de um mecanismo de supressão predominantemente dinâmico observa-se alguma alteração no tempo do estado excitado da HSA quando se varia a concentração do supressor [139] [136] [196].

Abaixo estão representados os perfis de decaimento da fluorescência da interação da HSA com o complexo supressor em 3 diferentes temperaturas (25, 37 e 49 ^{o}C) em 5 diferentes concentrações do complexo binuclear de rutênio. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm, garantindo a excitação apenas do resíduo Trp-214. Para as três temperaturas analisadas, observa-se um expressivo decaimento do tempo de vida da HSA com o aumento da temperatura.

Figura 60: Perfil de decaimento da fluorescência da interação HSA-$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em tampão tris (pH=7,2), λ_{exc} = 295 nm, à 25 ºC (A), 37 ºC (B) e 49 ºC (C).



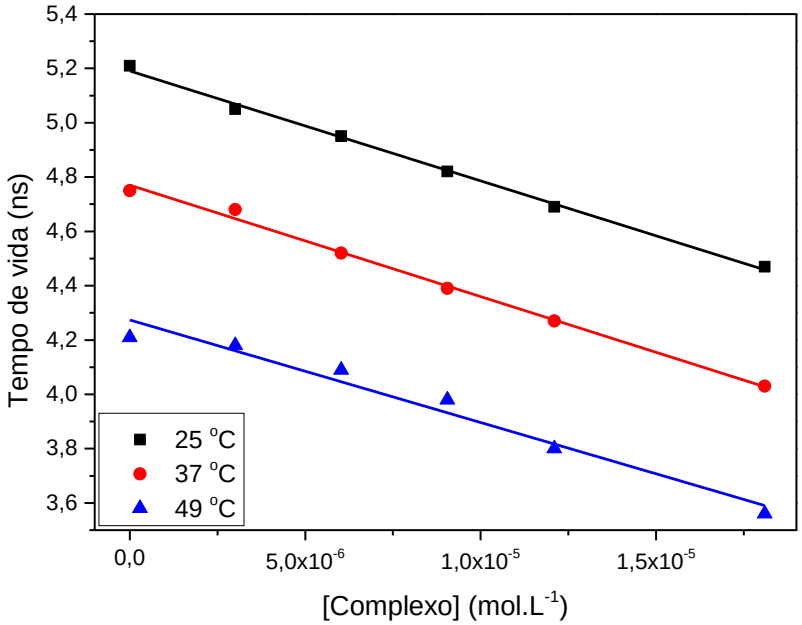
Fonte: Autor.

Como pode ser visto pela figura acima, o tempo de vida do estado excitado da albumina diminui com o aumento da concentração do complexo supressor em todas as temperaturas. Esse fato caracteriza que o modo de supressão de fluorescência predominante é do tipo dinâmico, porém devido ao modelo de Stern-Volmer discutido anteriormente sabe-se que o mecanismo de supressão de fluorescência do tipo estático também tem uma relevante

influência. Quando o mecanismo de supressão é predominantemente dinâmico não há formação de um novo complexo entre a HSA e o supressor, o que ocorre são interações colisionais suficientemente fortes entre a HSA e o complexo supressor que extingue a fluorescência do fluorofóro da HSA [196].

A figura mostrada abaixo mostra o perfil do decaimento do tempo de vida médio do estado excitado da HSA com o aumento da concentração do complexo supressor $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$.

Figura 61: Dependência do tempo de vida do estado excitado da HSA com o aumento da concentração do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, para três diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

A figura 61, mostra uma relação direta entre a temperatura e o tempo de vida do estado excitado da HSA. Nota-se que com o aumento da temperatura tem-se uma diminuição considerável do tempo de vida do estado excitado da HSA, sobretudo devido ao fato de em altas temperaturas o complexo sofrer maior dissociação e consequentemente interagir mais com a HSA e também em decorrência do sistema apresentar maiores entropias em temperaturas mais altas possibilitado mais interações colisionais suficientemente fortes entre a HSA e o complexo supressor.

Abaixo estão tabelados todos os valores obtidos para o experimento realizado em 3 temperaturas diferentes.

Tabela 20: Resultado dos ajustes feitos do decaimento de fluorescência do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, onde T_1, T_2 e T_3 são os tempos de vida do estado excitado da HSA; P_1, P_2 e P_3 são as contribuições percentuais de cada tempo de vida para o decaimento total da fluorescência.

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$							
25 ºC							
[Complexo]	**T_1 (ns)**	**T_2 (ns)**	**T_3 (ns)**	**$T_{médio}$**	**P_1 (%)**	**P_2 (%)**	**P_3 (%)**
0	6,85	2,61	0,30	5,21	62,8	34,4	2,80
3,01 x10^{-6}	6,77	2,53	0,29	5,05	61,2	35,6	3,19
6,03 x10^{-6}	6,82	2,59	0,33	4,95	57,8	38,4	3,81
9,05 x10^{-6}	6,63	2,40	0,28	4,82	59,0	37,3	3,70
1,21 x10^{-5}	6,57	2,34	0,26	4,69	57,6	38,5	3,85
1,81 x10^{-5}	6,49	2,27	0,25	4,47	54,2	41,5	4,29
37 ºC							
[Complexo]	**T_1 (ns)**	**T_2 (ns)**	**T_3 (ns)**	**$T_{médio}$**	**P_1 (%)**	**P_2 (%)**	**P_3 (%)**
0	6,49	2,49	0,32	4,75	58,4	38,0	3,57
3,01 x10^{-6}	6,38	2,34	0,27	4,68	58,4	38,0	3,59
6,03 x10^{-6}	6,34	2,33	0,28	4,52	56,8	39,1	4,10
9,05 x10^{-6}	6,30	2,29	0,27	4,39	54,7	40,9	4,33
1,21 x10^{-5}	6,19	2,16	0,23	4,27	54,3	41,5	4,19
1,81 x10^{-5}	5,99	1,99	0,18	4,03	53,1	42,8	4,13
49 ºC							
[Complexo]	**T_1 (ns)**	**T_2 (ns)**	**T_3 (ns)**	**$T_{médio}$**	**P_1 (%)**	**P_2 (%)**	**P_3 (%)**
0	5,90	2,17	0,26	4,21	56,5	39,9	3,60
3,01 x10^{-6}	5,99	2,21	0,29	4,18	54,4	41,4	4,22
6,03 x10^{-6}	5,88	2,13	0,27	4,09	54,3	41,4	4,30
9,05 x10^{-6}	5,88	2,10	0,24	3,98	52,0	43,4	4,65
1,21 x10^{-5}	5,74	1,99	0,22	3,80	50,4	44,9	4,72
1,81 x10^{-5}	5,46	1,79	0,16	3,56	50,3	45,1	4,58

Fonte: Autor.

É interessante ressaltar que as medidas de tempo de vida do estado excitado da HSA geram três valores de tempo de vida, que juntos geram o valor de tempo de vida médio através da equação 76:

Equação 76

$$T_{médio} = \frac{T_1.P_1 + T_2.P_2 + T_3.P_3}{100}$$

onde, T_1, T_2 e T_3 são os tempos de vida do estado excitado da HSA e P_1, P_2 e P_3 são as contribuições percentuais de cada tempo de vida para o decaimento total da fluorescência.

Apesar de existir apenas um resíduo de triptofano em cada HSA observa-se 3 diferentes tempos de vida, o que está de acordo com a literatura [197] [198] [199]. Os dados são interpretados como resultados de uma emissão que ocorre através de 3 subestruturas do Trp-214 resultando no estado excitado de emissão de fluorescência total. Duas dessas estruturas são inerentes ao resíduo de triptofano, sendo encontradas mesmo para o triptofano livre em solução e a terceira é resultado da interação entre o resíduo Trp-214 e o microambiente circundante [198].

Os valores encontrados para cada subestrutura do Trp-214 são diferentes entre si, ou seja, essas subestruturas estão em diferentes orientações no espaço dentro da HSA, provavelmente circundadas por microambientes de diferentes polaridades. Um cuidado conceitual deve ser tomado aqui, essa informação não está dizendo que uma subestrutura do Trp-214 esteja localizada em uma região hidrofóbica e outra em uma região polar. As três subestruturas estão localizadas em um ambiente hidrofóbico da HSA, mas provavelmente estão em microambientes diferentes, ou seja, então em contato levemente diferente com as moléculas do solvente, apresentando subestruturas mais ou menos hidrofílicas [198].

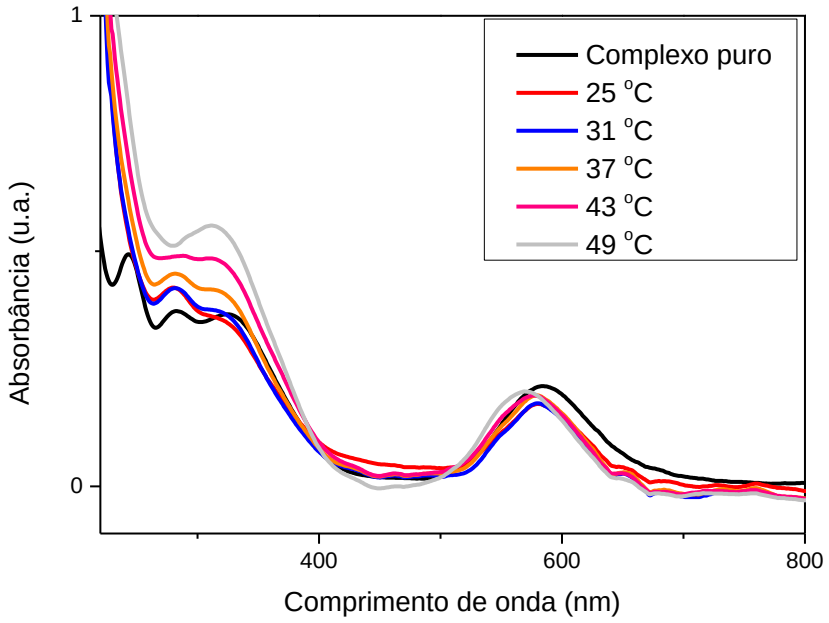
Por fim, como mencionado anteriormente, através da análise dos espectros de absorção do complexo supressor em solução e análise dos espectros de absorção do complexo supressor juntamente com a HSA pode-se inferir qual mecanismo de supressão predominante.

Como pode ser visto na figura 62, a comparação entre o espectro eletrônico do complexo e os espectros da solução complexo + HSA são bastante semelhantes. Os máximos de onda relacionados à banda da unidade [Ru_2O] variam muito pouco para quase todas as temperaturas (apenas 5 nm) em relação ao complexo puro. Para temperatura de 49 ^oC a variação é de 16 nm, porém, esse comportamento deriva da rápida troca dos ligantes THIQ *trans* a ponte μ-

oxo por moléculas de água em temperaturas elevadas e não da formação de um novo complexo entre HSA e complexo supressor.

De um modo geral, para as demais temperaturas tem-se um perfil muito parecido entre todos os espectros eletrônicos, esse comportamento é um indicativo de um mecanismo de supressão predominantemente dinâmico. Caso houvesse a formação de um novo complexo o perfil do espectro mudaria e o mecanismo seria definido como estático.

Figura 62: Comparação entre o espectro eletrônico do complexo puro e os espectros eletrônicos do sistema [HSA-Ru_2O-complexo], em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

Após toda a discussão sobre a interação da HSA com o complexo binuclear de rutênio, percebe-se que os dados apresentados apontam que tanto o mecanismo dinâmico quanto o estático estejam ocorrendo, porém muito provavelmente o mecanismo que mais esteja contribuindo com a supressão de fluorescência seja o dinâmico.

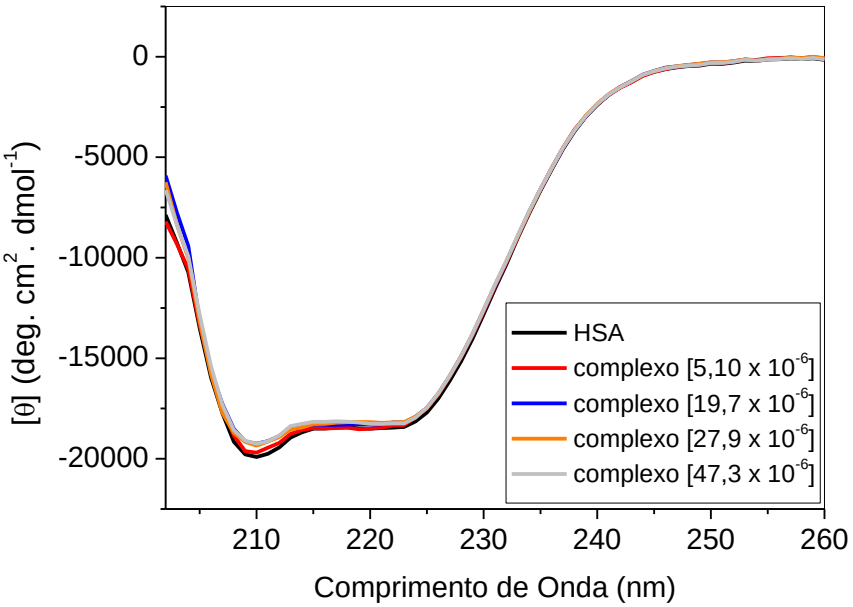
5.10.1 Espectroscopia Eletrônica de Dicroísmo Circular – Análise conformacional da HSA

Em busca de obter mais informações a respeito da interação existente entre a HSA e o complexo binuclear de rutênio, medidas de dicroísmo circular foram realizadas.

A espectroscopia de dicroísmo circular ou CD (Circular Dichroism) é uma técnica fundamentada na absorbância diferencial entre as duas rotações (horária e anti-horária) de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica. Quando macromoléculas opticamente ativas, como o caso da HSA, interagem com a luz circularmente polarizada, provocam certa alteração na luz incidente, produzindo um espectro da frequência de onda (nm) pela variação ótica em miligraus (mDeg), possibilitando o estudo da estrutura secundária da HSA [142].

Os espectros mostrados a seguir foram adquiridos na região de 190-250 nm, pois nessa região é possível analisar a variação conformacional da estrutura secundárias de proteínas.

Figura 63: Espectro de CD para monitoramento da estrutura secundária da HSA em tampão tris, em diferentes concentrações do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$, 25 ºC.



Fonte: Autor.

Para facilitar a visualização dos dados obtidos através da figura acima, tabelou-se os valores da % de α-hélice para as diferentes concentrações do complexo.

Tabela 21: Porcentagem estimada de α-hélice da HSA, através das curvas de Dicroísmo Circular

$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$	
[Complexo] (10^{-6} mol/L)	**% α-hélice**
0	79,8
5,09	78,8
19,7	77,8
27,9	78,3
47,3	77,8

Fonte: Autor.

Na região de 260 nm não se observa nenhuma mudança significativa mostrando que não houve alterações na estrutura terciária da HSA. Além disso, analisando-se os valores tabelados acima percebe-se uma redução de apenas 2,0% do conteúdo da α-hélice da HSA, mesmo em concentrações elevadas do complexo binuclear de rutênio [200]. Os dados apresentados acima corroboram com os dados encontrados quando se analisou a interação da HSA ao complexo binuclear de rutênio.

Em suma, os dados de dicroísmo circular mostraram estar ocorrendo interações fracas entre o complexo e a HSA. Muito provavelmente essas interações inespecíficas estão ocorrendo na superfície da proteína. Mesmo em concentrações altas do complexo, a estrutura da proteína não sofre quase que nenhuma alteração, mantendo sua função. Mesmo sem garantias, apenas casando-se resultados obtidos para o tratamento de Stern-Volmer com os dados apresentados nessa seção, essas interações inespecíficas na superfície da HSA são do tipo eletrostática.

5.11 Titulação espectrofotométrica na região do UV-visível

5.11.1 Estudo da interação do *fs*-DNA com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$

A titulação espectrofotométrica é um estudo muito utilizado na tentativa de identificação do modo de interação que ocorre entre o complexo de interesse e o DNA, utilizando-se o modelo matemático de Benesi-Hildebrand. Através desse modelo extrai-se a constante de ligação da interação entre DNA/complexo e realizando-se o experimento em temperaturas diferentes é possível determinar parâmetros termodinâmicos utilizando-se a equação da van´t Hoff.

Antes de iniciar-se o experimento calculou-se a relação entre as absorbâncias em 260 e 280 nm, com o intuito de saber se o *fs*-DNA encontrava-se livre de proteínas. O valor encontrado foi de 1,78, o que indica que o *fs*-DNA está livre dessas proteínas e pronto para ser utilizado [144].

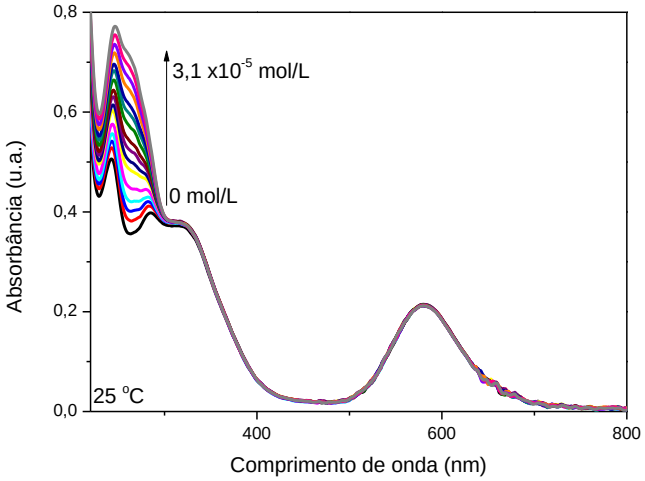
A macromolécula de *fs*-DNA apresenta grupos cromóforos em suas bases nitrogenadas que apresentam uma banda de absorção intensa na região de 260 nm. O complexo binuclear apresenta banda típica em 580 nm, característica vantajosa uma vez que sua intensidade de absorção não sofrerá interferência da absorçãi característica do *fs*-DNA. As alterações espectrais podem ser acompanhadas tanto na região de absorção do *fs*-DNA quanto nas bandas do próprio complexo, caso sejam observadas mudanças significativas [201].

Nos estudos que serão mostrados em seguida nota-se que não há alterações significativas nas bandas relativas ao complexo binuclear de rutênio, por isso a análise será toda pautada em relação a banda de absorção característica do *fs*-DNA, as figuras abaixo mostram essa tendência.

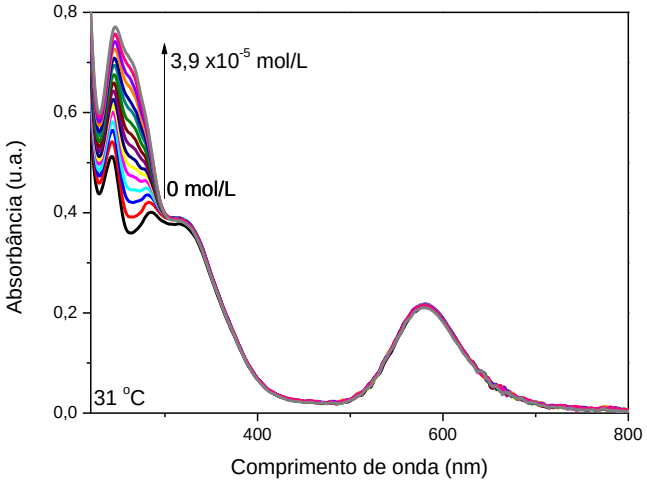
É importante ressaltar que os complexos apresentam pouca solubilidade em água, por isso foi necessário utilizar a acetonitrila para solubilização total desse complexo. Em nenhum dos experimentos a porcentagem de acetonitrila passou de 2% em relação ao volume total contido na cubeta.

Figura 64: Titulação espectrofotométrica, em 25 ºC (A), 31 ºC (B), 37 ºC (C), 43 ºC (D) e 49 ºC (E) do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ (4,2 x10^{-5} mol.L^{-1}) com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível.

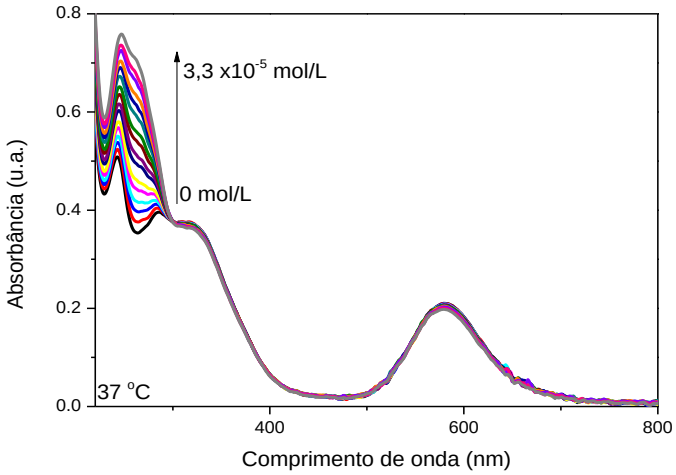
A.



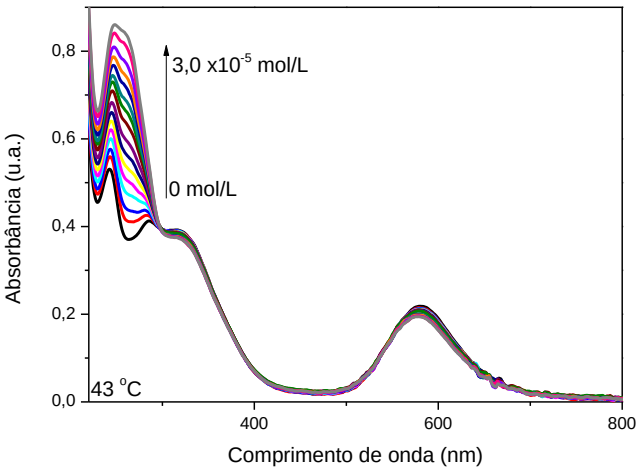
B.



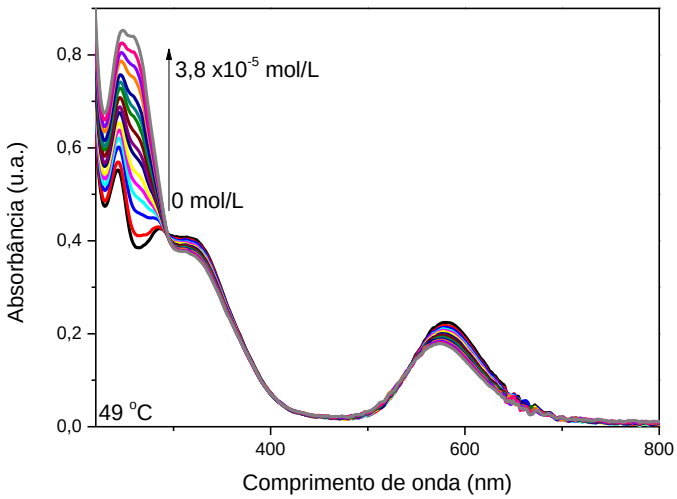
C.



D.



E.

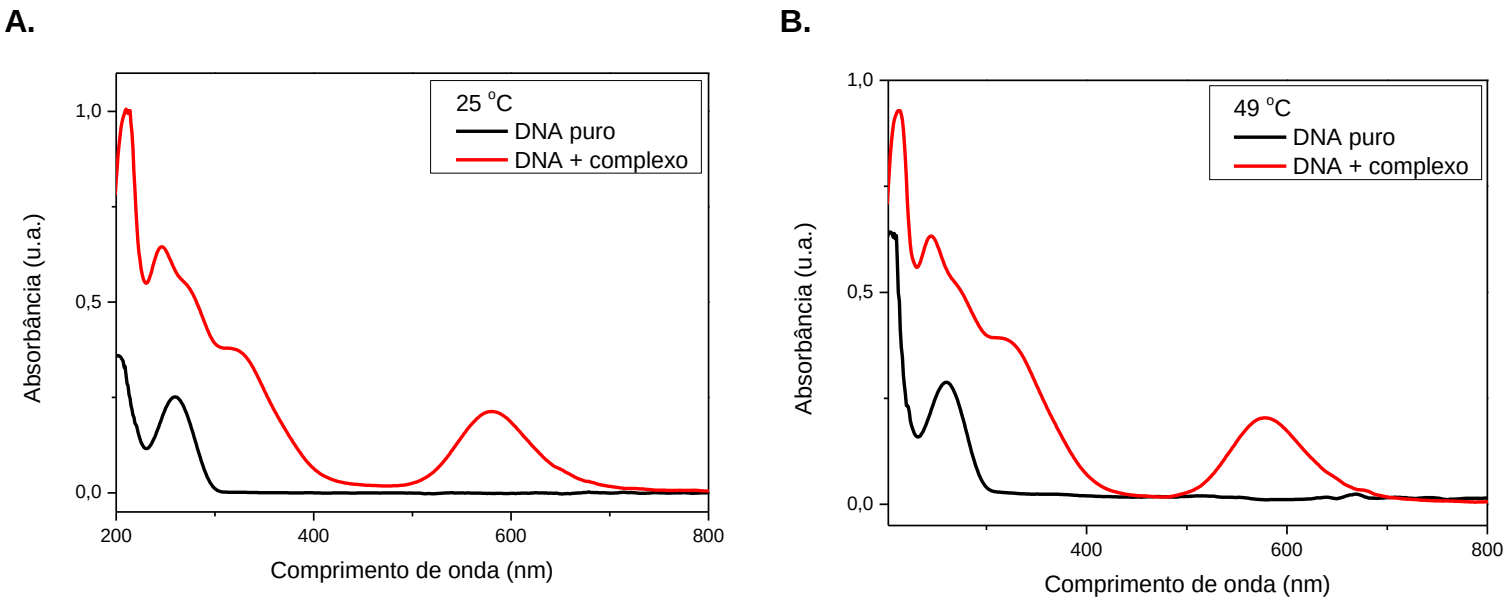


Fonte: Autor.

Nota-se que, com o aumento da temperatura há uma tendência hipsocrômica na variação da banda em 580 nm. Porém, esse fato pouco tem a ver com a interação entre o fs-DNA e o complexo binuclear de rutênio. Este fenômeno está ocorrendo, sobretudo em temperaturas mais elevadas, devido a troca dos ligantes THIQ *trans* à ponte µ-oxo por moléculas de água presentes no meio reacional.

Antes de prosseguir com a análise é importante ressaltar que com adições sucessivas de alíquotas de *fs*-DNA, obviamente a banda em 260 nm irá ter sua intensidade aumentada uma vez que a concentração de *fs*-DNA também está aumentando dentro da cubeta. Então, com o intuito de saber se o que está sendo observado é um aumento da intensidade de emissão devido somente ao aumento da concentração de *fs*-DNA ou que esta intensidade esteja variando devido alguma interação entre o *fs*-DNA e o complexo binuclear de rutênio foi realizado um experimento baseado na comparação entre concentrações iguais de *fs*-DNA na presença e ausência do complexo binuclear de rutênio. Esses resultados estão mostrados abaixo:

Figura 65: Comparação entre a intensidade da última curva da titulação espectrofotométrica e a concentração equivalente de fs-DNA livre (3,2 x10^{-5} mol.L^{-1}), em 25 ºC (A) e 49 ºC (B).



Fonte: Autor.

Optou-se por não mostrar os espectros eletrônicos em todas as temperaturas pois todos apresentam o mesmo comportamento. De modo geral, nota-se que a intensidade da banda na região de 260 nm é consideravelmente

maior para o experimento contendo complexo binuclear de rutênio e *fs*-DNA do que contendo apenas o *fs*-DNA. Esse fato induz a ideia de que realmente está ocorrendo algum tipo de interação entre o *fs*-DNA e o complexo binuclear de rutênio, porém não se deve esquecer o fato de que o complexo também apresenta uma banda intensa nessa região que pode estar influenciando na intensidade da banda relativa apenas ao *fs*-DNA.

Visto isso, e buscando-se resultados mais confiáveis foi realizado um outro experimento em 25, 37 e 49 ºC. Em uma cubeta contendo solução tampão tris (a mesma utilizada para realizar o experimento de *fs*-DNA que vai ser mostrado posteriormente) foram adicionadas alíquotas de *fs*-DNA e medidas de espectroscopia eletrônica foram realizadas após cada adição. O objetivo desse experimento é "descontar" o valor da intensidade de absorção relativo apenas a concentração do *fs*-DNA do valor observado quando a mesma concentração de *fs*-DNA é adicionada em uma cubeta contendo o complexo binuclear de rutênio. Esse tratamento matemático foi aplicado nos dados que serão discutidos adiante.

Em primeiro lugar vale a pena destacar que o espectro eletrônico do complexo não apresenta mudanças espectrais além da banda na região de 260 nm, mostrando que os orbitais do complexo não foram perturbados pela interação com o DNA, o que está intimamente ligado ao tipo de interação complexo-DNA. Vale a pena destacar nesse ponto que a pequena diferença encontrada nos espectros nas temperaturas mais altas na região de 580 nm está completamente ligado ao fato da troca de ligantes THIQ por molécula de água e não por possíveis interações do complexo com o DNA, isso é comprovado no tópico sobre a cinética de troca de ligantes.

É sabido que as interações que ocorrem entre o DNA e complexos metálicos podem ser covalentes ou não-covalentes e a magnitude da constante de ligação é o que permite distinguir qual tipo de interação esteja ocorrendo. Interações covalentes são aquelas que ocorrem entre a cis-platina e o DNA, onde a platina coordena-se fortemente aos azotos livres das bases nitrogenadas, causando danos irreversíveis nas fitas do DNA.

Quando a interação entre o complexo e o DNA se dá por intercalação, observa-se o efeito hipocrômico e deslocamento da banda para comprimento de ondas maiores, chamado de deslocamento batocrômico, onde a redução da

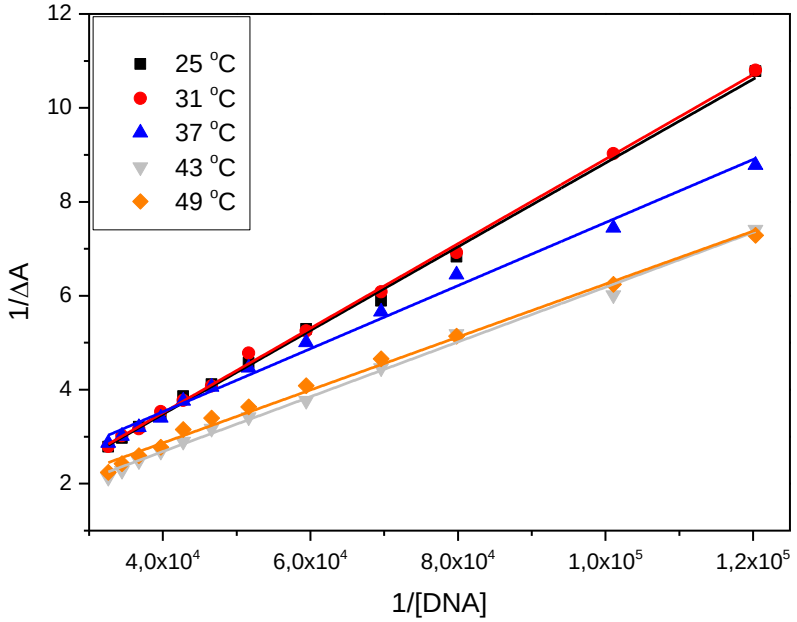
banda é proporcional ao cubo da redução da distância entre o complexo e as bases nitrogenadas do DNA. Para interações eletrostáticas – interações realizadas externamente às α-hélice por ligações aos grupamentos fosfatos do DNA – ocorre o feito hipercrômico. Esse efeito também pode ocorrer para complexos que interagem de modo não-covalente ao DNA ou ainda para complexos causadores de danos à estrutura secundária do DNA [144] [202] [203].

A partir da interpretação da figura 64, nota-se um comportamento hipercrômico da banda na região de 260 nm, em todas as temperaturas, o que pode ser associado a uma atração eletrostática entre o complexo binuclear de rutênio e o *fs*-DNA. Nesse tipo de interação ocorre mudanças na conformação e estrutura do *fs*-DNA. As duas cadeias do *fs*-DNA são mantidas juntas por interações de empilhamento (π-stacking) somadas a ligações de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos entre bases complementares. Quando ocorre determinada atração eletrostática entre *fs*-DNA e o complexo binuclear de rutênio a força de interação que sustenta a estrutura helicoidal da dupla hélice diminui fazendo com que essa estrutura colapse. Surgem então, duas estruturas de cadeia simples enoveladas de modo aleatório que obviamente, apresentam pouca interação entre as bases complementares de fitas adjacentes. Essas bases, em sua forma livre, irão apresentar cerca de 40% maior intensidade de absorbância do que quando ligadas a bases complementares. Devido a carga positiva do complexo binuclear de rutênio quando em solução, pode estar ocorrendo atração eletrostática ao grupo fosfato do esqueleto no *fs*-DNA, que causa uma contração e danos à estrutura secundária do DNA [144] [204] [205] [203].

Pode-se observar também que a banda na região de 260 nm muda de forma, sugerindo a formação de adutos (*fs*-DNA)-complexo. Porém, infelizmente, através dos dados obtidos por titulação espectrofotométrica na região do UV-visível é impossível determinar-se qual mecanismo está ocorrendo. Uma observação importante: os experimentos foram todos realizados em duplicatas.

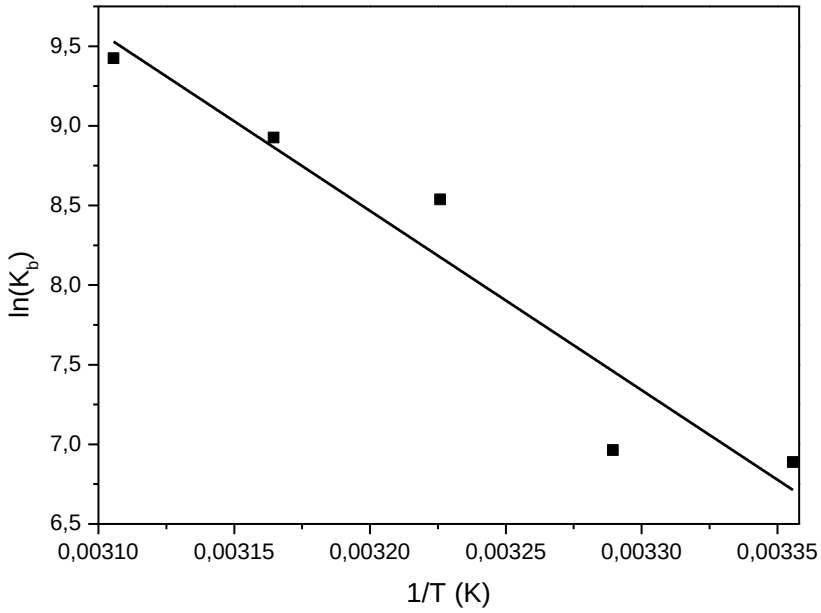
Prosseguindo-se as análises utilizando-se o modelo matemático de Benesi-Hildebrand, foram plotadas as curvas de 1/ΔA *versus* 1/[DNA] que permitem mensurar os valores das constantes de ligação entre o fs-DNA e complexo binuclear de rutênio para cada temperatura e de posse desses valores calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos nesse sistema.

Figura 66: Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ durante a titulação com o *fs*-DNA, em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

Figura 67: Gráfico de van´t Hoff para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ em 260 nm.



Fonte: Autor.

Os valores obtidos estão apresentados na tabela 22:

Tabela 22: Valores da constante de ligação (K_b) e dos parâmetros termodinâmicos para interação do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ com o *fs*-DNA

Temperatura (ºC)	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$			
	Kb (M^{-1}) ($x10^3$)	ΔH ($KJmol^{-1}$)	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	ΔG ($KJmol^{-1}$)
25	0,981	-93,6	370,0	-17,1
31	1,06			-17,6
37	13,9			-22,0
43	7,53			-23,5
49	12,4			-25,3

Fonte: Autor.

Esperava-se que o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ por apresentar relevante labilidade de seus ligantes, assim como a cis-platina, apresentasse constantes de ligação da ordem de $10^5/10^6$ característica de interações covalentes, porém foram observadas constantes substancialmente mais baixas.

Diferentemente do que se pensava a magnitude de K_b para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ são as mesmas encontradas para o complexo trinuclear $[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3](PF_6)$, caracterizando interações do tipo não-covalentes. Esses dois complexos citados acima, apesar de análogos, apresentam propriedades bem diferentes frente a substituição de seus ligantes, sendo o complexo trinuclear inerte em solução e o binuclear bastante lábil. O fator comum entre eles diz respeito a carga positiva existente nos dois complexos quando em solução, que pode estar governando o tipo de interação (eletrostática) existente entre DNA e complexo para os dois casos.

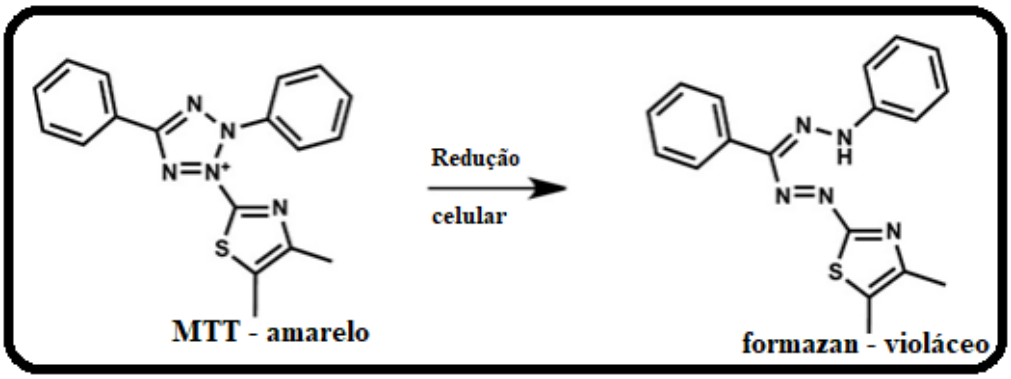
Além disso, nota-se que todos os valores de ΔG são negativos indicando que o processo de atração entre o complexo binuclear de rutênio (carga total positiva) e a molécula de DNA (que apresenta regiões com carga negativas) é um processo espontâneo. Assim como a análise feita para a H SA, o valor de ΔH é menor que zero e ΔS apresenta um valor positivo, caracterizando uma predominância de interações/atrações do tipo eletrostática, fato esse que concorda com o que foi dito anteriormente.

5.12 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais

O potencial citotóxico do complexo binuclear de rutênio foi avaliado em duas diferentes linhagens de células tumorais – a B16F10, conhecida como melanoma murino e a MCF7, adenocarcinoma de mama humano – e uma linhagem de célula não tumoral – L929, fibroblasto murino. Esse experimento foi realizado no intuito de investigar a influência da unidade [Ru_2O] frente a atuação com células tumorais.

Com esse obejtivo em mente utilizou-se o ensaio colorimétrico de MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) – o qual compõe uma série de compostos de tetrazólio utilizados para detectar células viáveis, através da avaliação do metabolismo/atividade enzimática celular. Esse método é baseado na capacidade das células viáveis converterem o MTT de coloração amarela em formazan que apresenta-se violáceo. Essa conversão ocorre, sobretudo, devido ao metabolismo ativo e enzimas mitocôndriais presentes nas células viáveis [206]. No qual a intensidade de coloração observada é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis. Este esquema está mostrado na figura abaixo. Cabe destacar que o formazan resultante da redução do MTT é um produto insolúvel, sendo necessária uma etapa de solubilização em DMSO para realização da leitura da absorbância em 490 nm.

Figura 68: Representação da reação de redução do MTT à formazan.



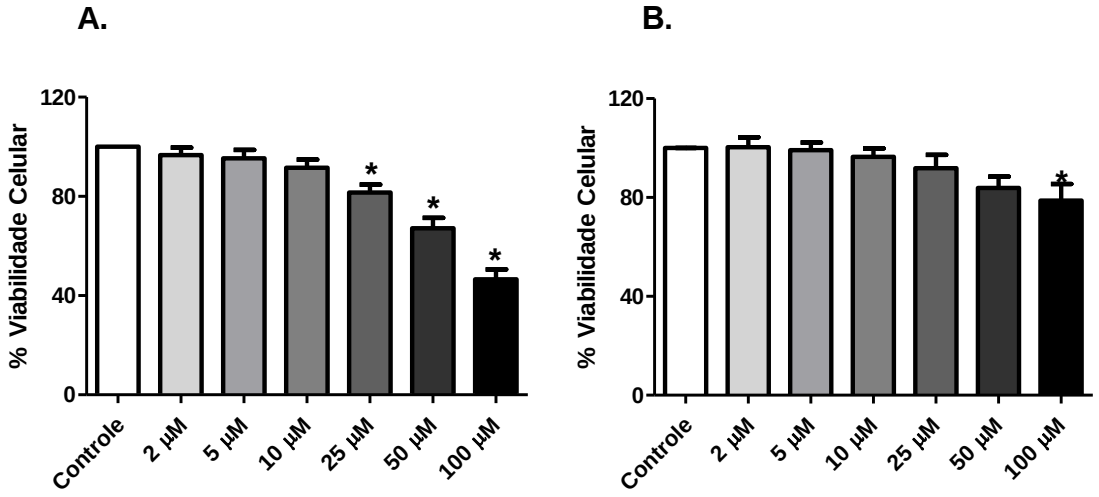
Fonte: Imagem de domínio público coletada da internet, adaptada.

Para realização desses experimentos as células foram cultivadas e semeadas conforme descrito anteriormente. Após 24 horas de incubação, o meio

foi trocado e as células foram tratadas com o complexo em diferentes concentrações e novamente incubadas, totalizando 24 horas de experimento.

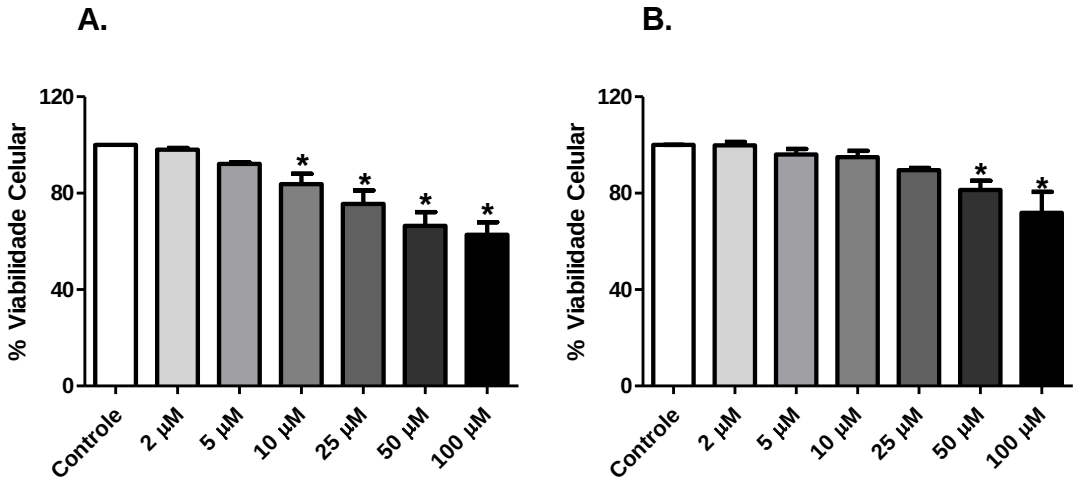
Para cada experimento, além do controle constituído apenas pela linhagem celular em estudo, foram avaliados os controles contendo o solvente no qual as amostras foram preparadas (1% de DMSO), todos os experimentos foram realizados em triplicata. As figuras mostradas a seguir ilustram o experimento.

Figura 69: Viabilidade celular após o tratamento com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ **(A)** e o ligante THIQ **(B)**, em diferentes concentrações frente as células B16F10. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de todos os experimentos realizados. As diferenças foram consideradas com significância de 0,05 com $p \leq 0,05$; * (diferente do grupo controle).



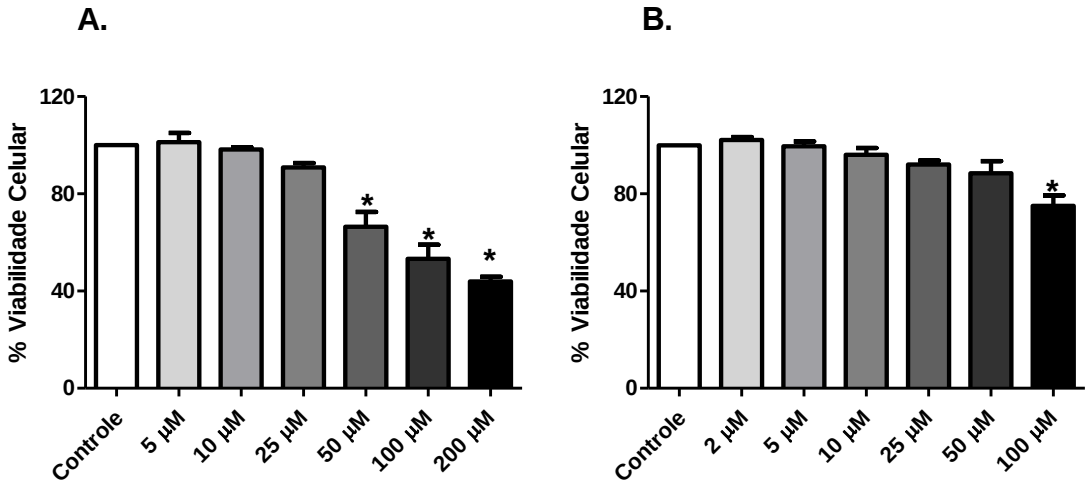
Fonte: Autor.

Figura 70: Viabilidade celular após o tratamento com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ **(A)** e o ligante THIQ **(B)**, em diferentes concentrações frente as células MCF7. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de todos os experimentos realizados. As diferenças foram consideradas com significância de 0,05 com $p \leq 0,05$; * (diferente do grupo controle).



Fonte: Autor.

Figura 71: Viabilidade celular após o tratamento com o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ **(A)** e o ligante THIQ **(B)**, em diferentes concentrações sob as células L929. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de todos os experimentos realizados. As diferenças foram consideradas com significância de 0,05 com $p \leq 0,05$; * (diferente do grupo controle).



Fonte: Autor.

Tabela 23: Valores de viabilidade celular para o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ e o ligante THIQ em diferentes linhagens de célula.

	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$			THIQ		
Concentração (10^{-6} mol/L)	**Viabilidade Celular (%)**					
	B16F10	**MCF7**	**L929**	**B16F10**	**MCF7**	**L929**
2	96,7	98,1	-	100,3	99,8	102,1
5	95,3	92,1	101,3	99,1	96,0	99,6
10	91,5	83,8	98,3	96,5	95,0	96,0
25	81,6	75,6	90,9	91,8	89,6	92,0
50	67,1	66,5	66,5	83,9	81,4	88,4
100	46,5	62,7	53,2	78,8	71,8	75,0
200	-	-	43,9	-	-	-

Fonte: Autor.

De um modo geral, reconhece-se que o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ apresenta uma atividade citotóxica mais significativa em relação ao ligante livre sob as diferentes linhagens de células tumorais e não tumoral, sobretudo para maiores concentrações. Destaca-se que o aumento da concentração ocasionou uma diminuição da viabilidade mais expressiva frente as células sadias para o complexo do que para o ligante. Então, tais dados permitem avaliar que o processo de coordenação do ligante THIQ a unidade $[Ru_2O]$ parece influenciar de forma significativa sua atividade

Embora preliminares, os resultados obtidos permitem inferir que o complexo apresenta uma atividade citotóxica ligeiramente mais pronunciada frente a linhagem tumoral B16F10 do que sob as células fibroblasto murino, ocasionando na concentração de 100 µM uma morte celular de aproximadamente 53 % e 47 %, respectivamente. Quando comparados sob as linhagens tumorais observa-se que o complexo fora mais citotóxico sob as células de melanoma para as maiores concentrações testadas (50 e 100 µM), já nas concentrações de 10 e 25 µM é evidenciado um maior potencial sob a linhagem de mama. Estudos posteriores poderão ser conduzidos a fim de se avaliar melhor esse comportamento.

Em busca de melhores resultados comparações com complexos análogos ao apresentado nessa tese serão feitas a seguir. A tabela abaixo traz um comparativo frente a diferentes complexos e suas respectivas viabilidade celular.

Tabela 24: Comparativo da viabilidade celular dos complexos binucleares e trinuclear de rutênio frente as células tumorais B16F10.

	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$	$[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$	$[Ru_3O(CH_3COO)_6(THIQ)_3]PF_6$	**THIQ**
Concentração (10^{-6} mol.L^{-1})	**Viabilidade Celular (%)**			
	B16F10			
5	95,3	94,1	-	99,6
10	91,5	91,9	80	96,0
15	-	-	-	-
20	-	-	-	-
25	81,6	90,2	55	92,0
50	67,1	86,4	45	88,4
100	46,5	82,8	40	75,0

Fonte: Autor e adaptado de [3].

Os resultados apresentados acima mostram que, de modo geral, o ligante THIQ livre apresenta uma citotoxicidade mais baixa que os complexos, mostrando que sua coordenação ao centro metálico influencia sua atividade frente às células tumorais B16F10.

Analisando-se as concentrações de 5 e 10 x10^{-6} mol.L^{-1} observa-se que o complexo trinuclear apresenta uma maior citotoxicidade em relação aos dois complexos binucleares de rutênio, mostrando nesse caso que a unidade metálica $[Ru_3O]$ tem uma influência grande frente a atividade citotóxica do complexo. Sendo os complexos trinucleares mais inertes frente a substituição dos ligantes THIQ em relação aos compostos binucleares, acredita-se que os ligantes THIQ mantém-se totalmente coordenados ao centro metálico quando ocorre a interação com as células tumorais. Diferentemente, os complexos binucleares devem estar perdendo ligantes THIQ que estão sendo substituídos por moléculas de água. Como visto o ligante livre não apresenta boa citotoxicidade e esse fato pode explicar a grande diferença entre complexos binucleares e trinucleares. Além disso, quando se analisa os dois complexos binucleares mostrados na tabela acima, percebe-se que o complexo com ligantes THIQ apresenta uma maior atividade quando comparado ao complexo

com 6 ligantes piridínicos. A conclusão nesse ponto é de que quando ocorre a substituição dos ligantes THIQ por moléculas de água o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$ passa a apresentar uma menor citotoxicidade, pois a mesma está relacionado ao ligantes THIQ coordenado. Resumindo, complexos trinucleares são inertes e mantêm os ligantes THIQ coordenados por isso apresentam uma alta citotoxicidade, os complexos binucleares perdem ligantes quando em contato com água e provavelmente uma grande parcela do complexo inicial foi convertida ao complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$, o que explica sua menor atividade.

5.13 Atividade Antialérgica

O potencial antialérgico do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ foi avaliado através da degranulação de mastócitos, parte crucial envolvida nas doenças alérgicas [207].

A exocitose – fenômeno de degranulação dos mastócitos – ocorre quando ás células são expostas a um alérgeno/antígeno através do reconhecimento deste por um imuno-complexo FcεRI-IgE específico presente na membrana celular. Inicia-se então uma série de reações bioquímicas, em que o último estágio está relacionado à fusão entre a membrana plasmática e os grânulos secretórios produtores de secreções de mediadores químicos vesiculares que são expulsos para o meio extracelular causando os sintomas característicos de doenças alérgicas [208]. Dentre as secreções produzidas está a enzima β-hexosamidase [207] [208], por esse motivo essa enzima será objeto de estudo nessa seção.

A % β-hexosamidase pode tanto aumentar quanto diminuir frente a um novo potencial fármaco. Quando ocorre um aumento da % β-hexosamidase o fármaco apresenta potencial alergênico e estimulam as células liberando o conteúdo granular dos mastócitos para o meio extracelular levando às reações alérgicas [209].

A diminuição da % β-hexosamidase ocorre quando um complexo apresenta propriedades antialérgicas, inibindo a degranulação mastocitária, podendo ser usado no tratamento de alergias. Porém, esse perfil inibitório pode estar diretamente ligado á morte celular pelo mecanismo de apoptose. Então, o

experimento realizado nesse trabalho para quantificação da enzima β-hexosaminidase [209] sinaliza tanto a inibição da degranulação (potencial antialérgico) quanto o estímulo celular (potencial alergênico), sendo que ambos podem ser indicativos de morte celular o que explica todo o cuidado com a citotoxicidade dos mastócitos tratados por potencias novos fármacos.

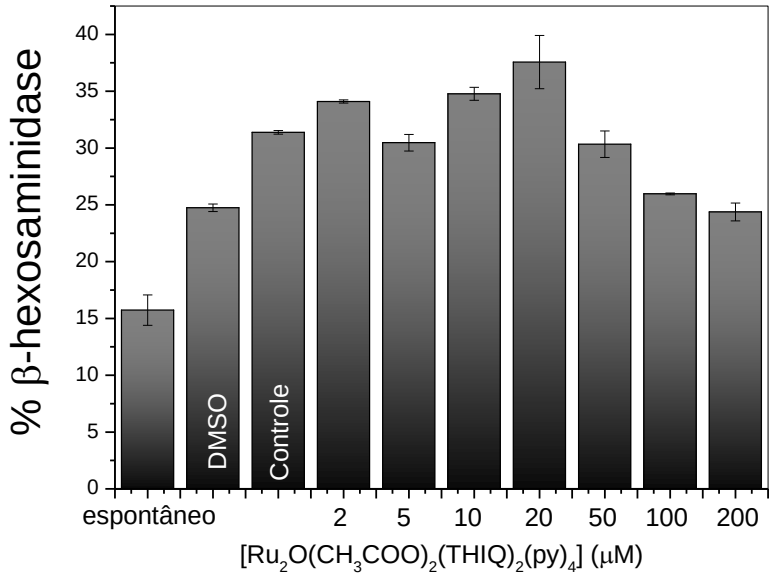
Quando comparado ao controle, os resultados do efeito inibitório do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ não mostra resultados conclusivos. Percebe-se que para algumas concentrações do complexo ocorre uma diminuição pouco significativa da % de β-hexosaminidase (5, 50, 100 e 200 µM) e em outras um pequeno aumento da % de β-hexosaminidase (2, 10 e 20 µM). Esse comportamento indica que o complexo não apresenta potencial alergênico, nem potencial antialérgico. Essa flutuação de comportamento pode estar atrelada a mistura de complexos existentes devido a troca dos ligantes THIQ por molécula de água.

É interessante ressaltar que estudos anteriores com outros complexos binucleares de rutênio mostraram comportamentos diferentes. O complexo $[Ru_2O(cetoprofeno)_2(py)_6](PF_6)_2$ [97], por exemplo, reduziu significativamente a % de β-hexosaminidase, apresentando uma interessante atividade antialérgica. Em contrapartida, o complexo análogo $[Ru_2O(ibuprofeno)_2(py)_6](PF_6)_2$, diferente apenas em relação ao acetato coordenado aos dois átomos de rutênio apresentou comportamento oposto.

Outros estudos mostraram que o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_6](PF_6)_2$, também apresentou uma discreta redução da % de β-hexosaminidase em todas as concentrações, apresentando um discreto potencial antialérgico. Em compensação o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(5\text{-metil-}1,10\text{-phen})_2(py)_2](PF_6)_2$ mostrou forte inibição da degranulação, apresentando ótimo potencial antialérgico (5-metil-1,10-phen é o 5-metil-1,10-fenantrolina, ligante bidentado).

Visto isso, percebe-se que a atividade antialérgica ou potencial alergênico não está relacionado a unidade $[Ru_2O]$ mas sim ao ligante coordenado a essa unidade.

Figura 72: Efeito inibitório do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2](PF_6)_2$ sobre a desgranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações do complexo, seguido de estímulo celular com antígeno (DNP-BSA, 0,1 µg/mL). Após incubação à 37 ºC por 1 h, as células foram incubadas com MUG 3,6 mM por subsequentes 30 minutos e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem do MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa, as barras de erro representam os desvios padrão para amostras em triplicata de um único experimento.



Fonte: Autor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síntese do complexo binuclear de rutênio foi bastante complicada, visto que em duas etapas é imprescindível utilizar como solvente a água e como mostrado acima o complexo se apresenta lábil frente à substituição de seus ligantes THIQ em água. Apesar desse inconveniente foi possível a purificação e obtenção do complexo desejado com um rendimento alto.

A espectroscopia eletrônica da região do visível é muito importante no monitoramento do processo da reação. A banda na região de 580 nm é característica da formação da unidade $[Ru_2O]$ e sem a formação da mesma não é possível continuar a reação.

A análise de Raios-X mostrou que o comprimento das ligações dos ligantes *trans* a ponte μ-oxo são realmente maiores, o que origina características muito interessantes quanto a cinética de troca desses ligantes frente a diferentes solventes. Esse estudo foi bastante explorado e mostrou que dentre os solventes estudados a água é o que apresenta a maior capacidade de substituir o ligante THIQ no complexo, formando a espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$.

Através de dados obtidos através de HPLC, mostrou-se que a formação do complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$ ocorre em duas etapas. Primeiramente ocorre a formação de um complexo intermediário $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)(THIQ)](PF_6)_2$ que é então utilizado como produto e consumido para formação da espécie $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(H_2O)_2](PF_6)_2$, sendo a etapa lenta a substituição do segundo ligante THIQ.

Quanto à interação do complexo com a HSA, observou-se uma que a supressão de fluorescência ocorre através do mecanismo estático e dinâmico, porém o mecanismo dinâmico tem uma maior influência. As constantes de ligação do complexo à HSA é bastante alta mostrando uma grande afinidade entre o complexo e a HSA. Os valores de ΔG são menores que zero, mostrando que a interação entre o complexo e a HSA é espontânea. Os valores de ΔS são maiores que zero e os valores de ΔH são menores que zero, caracterizando interações predominantemente eletrostáticas.

Assim como na análise descrita no parágrafo anterior, o estudo da interação do complexo binuclear de rutênio com o DNA mostrou que a interação

predominante é do tipo eletrostática. Está ocorrendo mudanças na conformação e estrutura do *fs*-DNA. Essa interação força uma mudança na estrutura do DNA, surgindo duas fitas simples enoveladas de modo aleatório, danificando o DNA permanentemente.

De um modo geral, reconhece-se que o complexo $[Ru_2O(CH_3COO)_2(py)_4(THIQ)_2].(PF_6)_2$ apresenta uma atividade citotóxica mais significativa em relação ao ligante livre sob as diferentes linhagens de células tumorais e não tumoral, sobretudo para maiores concentrações. Destaca-se que o aumento da concentração ocasionou uma diminuição da viabilidade mais expressiva sob a célula sadia para o complexo do que para o ligante. Então, tais dados nos permitem avaliar que o processo de coordenação do ligante THIQ a unidade $[Ru_2O]$ parece influenciar de forma significativa sua atividade.

Embora preliminares, os resultados obtidos permitem inferir que o complexo apresenta uma atividade citotóxica ligeiramente mais pronunciada sob a linhagem tumoral B16F10 do que sob as células fibroblasto murino, ocasionando na concentração de 100 µM uma morte celular de aproximadamente 54 % e 47 %, respectivamente. Quando comparados sob as linhagens tumorais observa-se que o complexo fora mais citotóxico sob as células de melanoma para as maiores concentrações testadas (50 e 100 µM), já nas concentrações de 10 e 25 µM é evidenciado um maior potencial sob a linhagem de mama. Estudos posteriores poderão ser conduzidos a fim de se avaliar melhor esse comportamento.

O estudo de potencial alérgico mostrou que a atividade dos complexos binucleares de rutênio está associada, sobretudo, ao ligante coordenado. Pode-se dizer que unidade $[Ru_2O]$ pouco influencia sua atividade frente a degranulação dos mastócitos.

Como última informação, vale a pena escrever que o complexo se apresenta bastante lábil em presença de água, o que pode acarretar algumas conclusões nem tão exatas. A discrepância nos valores encontrados para os experimentos cinéticos realizados em UV-vís e o experimento utilizando HPLC, mostraram que há a coexistência do complexo inicial, intermediário e final e através da espectroscopia eletrônica é impossível determinar o quanto cada um está influenciando na formação da banda em determinado tempo de reação.

7 REFERÊNCIAS

[1] B. Possato, Z. Carneiro, S. de Albuquerque e S. Nikolaou, “New uses for old complexes: The very first report on the trypanocidal activity of symmetric trinuclear ruthenium complexes.,” *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 176, pp. 156-158, 2017.

[2] B. Possato, V. Deflon, Z. Naal, A. Formiga e S. Nikolaou, “Extended π-system and enhanced electronic delocalization on symmetric [Ru3O(CH3COO)6(L)3] azanaphthalene ligands,” *Dalton Transactions,* vol. 24, nº 46, pp. 7926-7938, 2017.

[3] B. Possato, “Complexos trinucleares simétricos de rutênio com ligantes azanaftalenos como bons candidatos a metalofármacos: síntese, caracterização e estudos biológicos.,” *Universidade de São Paulo,* 2017.

[4] C. Popolin, J. Reis, A. Becceneri, A. Graminha, M. Almeida, R. Corrêa, L. Colina-Vegas, J. Ellena, A. Batista e M. Cominetti, “Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells.,” *Plos One,* vol. 12, nº 9, pp. 1-21, 2017.

[5] J. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. Beijnen e J. Schellens, “A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent.,” *Clinical Cancer Research,* vol. 10, nº 11, p. 3717–3727, 2004.

[6] J. Iida, E. Bell-Loncella, M. Purazo, Y. Lu, D. J., R. Clancy, J. Slavik, M. Cutler e C. Shriver, “Inhibition of cancer cell growth

by ruthenium complexes.," *Journal of Translational Medicine,* vol. 14, nº 48, pp. 1-10, 2016.

[7] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. Trosko e V. Mansour, "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.," *Nature,* vol. 222, nº 5191, pp. 385-386, 1969.

[8] N. Abbaspour, R. Hurrell e R. Kelishadi, "Review on iron and its importance for human health.," *Journal of Research in Medical Sciences,* vol. 2, nº 19, pp. 164-174, 2014.

[9] J. Guo e P. Sadler, "Metals in Medicine.," *Angewandte Chemie,* vol. 38, nº 11, pp. 1512-1678, 1999.

[10] E. Antonarakis e A. Emadi, "Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?," *Cancer Chemotherapy Pharmacology,* vol. 66, nº 1, pp. 1-9, 2010.

[11] F. Kratz e L. Messori, "Spectral characterization of ruthenium (III) transferrin.," *Journal of Inorganic Biochemistry ,* vol. 49, nº 2, pp. 79-82, 1993.

[12] S. Nikolaou e C. da Silva, "Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio.," *Química Nova ,* 2018.

[13] E. Alessio, "Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective.," *European Journal of Inorganic Chemistry,* pp. 1549-1560, 2017.

[14] B. J. Reedijk, "Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes.," *Platinum Metals Reviews ,* vol. 10, nº 1, pp. 2-11, 2008.

[15] J. Reedijk, “New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* vol. 100, nº 7, pp. 3611-3616, 2003.

[16] Y. Zhang, Z. Guo e X. Z. You, “Hydrolysis theory for cisplatin and its analogues based on density functional studies.,” *Journal of American Chemical Society,* vol. 123, nº 38, pp. 9378-9387, 2001.

[17] A. Melchior, E. Marcos, R. Pappalardo e J. Martínez, “Comparative study of the hydrolysis of a third- and a first-generation platinum anticancer complexes.,” *Theoretical Chemistry Accounts,* vol. 128, nº 4-6, pp. 627-638, 2011.

[18] J. Chakravarty e S. Bhattacharya, “Ruthenium phenolates. Synthesis, characterization and electron-transfer properties of some salicylaldiminato and 2-(arylazo)phenolato complexes of ruthenium.,” *Polyhedron,* vol. 15, nº 7, pp. 1047-1055, 1996.

[19] M. Pongratz, P. Schluga, M. Jakupec, V. Arion, C. Hartinger, G. Allmaier e B. Keppler, “Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy.,” *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* vol. 19, pp. 46-51, 2004.

[20] H. Toma, “Alfred Werner e Heinrich Rheinboldt: genealogia e legado científico.,” *Química Nova,* vol. 37, nº 3, pp. 574-581, 2014.

[21] A. Werner, “On the constitution and configuration of higher-order compounds.,” *Constitution and Configuration of compounds - Nobel Lecture,* pp. 256-269, 1913.

[22] L. Santos, L. Sarto, G. Bozza e E. de Almeida, “Química de Coordenação: Um sonho audacioso de Alfred Werner,” *Revista Virtual de Química,* vol. 6, nº 5, pp. 1260-1281, 2014.

[23] S. Shaik, “The lewis legacy: The chemical bond – A territory and heartland of chemistry.,” *Journal of Computational Chemistry,* vol. 28, nº 1, pp. 51-61, 2006.

[24] N. P. E. Barry e P. J. Sadler, “100 years of coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs.,” *Pure Application Chemistry,* vol. 86, nº 12, pp. 1897-1910, 2014.

[25] J. Blakemore, R. Crabtree e G. Brudvig, “Molecular Catalysts for Water Oxidation.,” *Chemical Reviews,* vol. 23, nº 115, p. 12974–1300, 2015.

[26] A. Noffke, A. Habtemariam, A. Pizarro e P. Sadler, “ Designing organometallic compounds for catalysis and therapy.,” *Chemical Communications,* vol. 48, p. 5219–5246, 2012.

[27] S. Nolan e H. Clavier, “Chemoselective olefin metathesis transformations mediated by ruthenium complexes.,” *Chemical Society Reviews,* vol. 39, nº 8, p. 3305–3316, 2010.

[28] J. Vos e J. Kelly, “Ruthenium polypyridyl chemistry; from basic research to applications and back again.,” *Dalton Transitions,* vol. 0, nº 41, p. 4869–4883, 2006.

[29] L. Hu e G. Xu, “Applications and trends in electrochemiluminescence.,” *Chemical Society Reviews,* vol. 39, nº 8, p. 3275–3304, 2010.

[30] M. Gill e J. Thomas, “Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA-from structural probes to cellular imaging and therapeutics.,” *Chemical Society Reviews,* vol. 41, nº 8, p. 3179–3192, 2012.

[31] S. Ardo e G. Meyer, “Photodriven heterogeneous charge transfer with transition-metal compounds anchored to TiO2

semiconductor surfaces.," *Chemical Society Reviews,* vol. 38, nº 1, p. 115–164, 2009.

[32] Y. Zhu, C. Gu, S. Tang, T. Fei, X. Gu, H. Wang, Z. Wang, F. Wang, D. Lu e Y. Ma, "A new kind of peripheral carbazole substituted ruthenium(II) complexes for electrochemical deposition organic light-emitting diodes.," *Journal of Materials Chemistry,* vol. 19, nº 23, p. 3941–3949, 2009.

[33] C. Bastos, K. Gordon e T. Ocain, "Synthesis and immunosuppressive activity of ruthenium complexes.," *Bioorganica & Medicinal Chemistry Letters,* vol. 8, pp. 147-150, 1998.

[34] V. M. R. Bailey, J. L. C. Galang, P. E. Doan e M. J. Clarke, "1H and 31P NMR and EPR of pentaammineruthenium(III) complexes of endocyclically coordinated nucleotides, nucleosides, and related heterocyclic bases. autoxidation of [(GuoN$_7$)(NH$_3$)5RuIII] (Guo = Guanosine). Crystal structure of [MeGuoN$_9$(NH$_3$)$_5$Ru]Cl$_3$·3H$_2$O.," *Inorganic Chemistry,* vol. 36, nº 9, pp. 1873-1883, 1997.

[35] R. Hosahalli, K. Byadagi, S. Nandibewoor e S. Chimatadar, "Kinetics and mechanism of ruthenium(III) catalyzed oxidation of chloromphenicol—an antibiotic drug by diperiodatocuprate(III) in aqueous alkaline medium.," *Kinects and Catalysis,* vol. 53, nº 1, pp. 65-74, 2012.

[36] T. Morais, T. Silva, F. Marques, M. Robalo, F. Avecilla, P. Madeira, P. Mendes, I. Santos e M. Garcia, "Synthesis of organometallic ruthenium(II) complexes with strong activity against several human cancer cell lines.," *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 114, pp. 65-74, 2012.

[37] G. Ludwig, G. Kaluderovic, M. Bette, M. Block, R. Paschke e D. Steinborn, "Highly active neutral ruthenium(II) arene complexes:

Synthesis, characterization, and investigation of their anticancer properties.," *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 113, pp. 77-82, 2012.

[38] M. Muthukumar e P. Viswanathamurthi, "Spectral, catalytic, and antifungal studies of ruthenium(II) chalcone complexes.," *Journal of Coordination Chemistry,* vol. 63, pp. 1263-1272, 2010.

[39] R. Gomes-Junior, R. da Silva, R. de Lima e M. Vannier-Santos, "Antifungal mechanism of [RuIII(NH3)4catechol]+complex on fluconazole-resistant Candida tropicalis.," *Microbiology Letters,* vol. 364, nº 9, pp. 1-25, 2017.

[40] B. Cetinkaya, I. Ozdemir, B. Binbaşioğlu, R. Durmaz e S. Günal, "Antibacterial and antifungal activities of complexes of ruthenium (II).," *Arzneimittel-Forschung ,* vol. 6, nº 49, pp. 538-540, 1999.

[41] M. Gill, S. Harun, S. Halder, R. Boghozian, K. Ramadan, H. Ahmad e K. Vallis, "A ruthenium polypyridyl intercalator stalls DNA replication forks, radiosensitizes human cancer cells and is enhanced by Chk1 inhibition.," *Nature,* pp. 1-13, 2016.

[42] M. Wei, L. Guo e P. Famouri, "DNA biosensors based on metallo-intercalator probes and electrocatalytic amplification.," *Microchimica Acta,* vol. 172, nº 3-4, p. 247–260, 2011.

[43] W. Al-Masoudi, N. Al-Masoudi, B. Weibert e R. Winter, "Synthesis, X-ray structure, in vitro HIV and kinesin Eg5 inhibition activities of new arene ruthenium complexes of pyrimidine analogs.," *Journal of Coordination Chemistry,* vol. 70, nº 12, pp. 2061-2073, 2017.

[44] L. Mishra, R. Sinha, H. Itokawa, K. Bastow, Y. Tachibana, Y. Nakanishi, N. Kilgore e K. Lee, "Anti-HIV and cytotoxic activities of

Ru(II)/Ru(III) polypyridyl complexes containing 2,6-(2'-benzimidazolyl)-pyridine/chalcone as co-ligand.," *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* vol. 9, nº 7, pp. 1667-1671, 2001.

[45] X. Zhang e S. Lippard, "New metal complexes as potential therapeutics.," *Current Opnion in Chemical Biology,* vol. 7, nº 4, pp. 481-489, 2003.

[46] J. Reedijk, "Medicinal applications of heavy-metal compound.," *Current Opnion in Chemical Biology,* vol. 3, nº 2, pp. 236-240, 1999.

[47] V. Sharma e D. Piwnica-Worms, "Metal complexes for therapy and diagnosis of drug resistance.," *Chemical Reviews,* vol. 99, nº 9, p. 2545–2560, 1999.

[48] C. Orvig e M. J. Abrams, "Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction.," *Americam Chemical Society,* vol. 99, nº 9, pp. 2201-2203, 1999.

[49] S. Komeda e A. Casini, "Next-generation anticancer metallodrugs.," *Current Topics in Medicinal Chemistry,* vol. 12, pp. 219-235, 2012.

[50] T. Hambley, "Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities.," *Dalton Transactions,* pp. 4929-4937, 2007.

[51] K. Smalley, R. Contractor e N. Haass, "An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells.," *Cancer Research,* vol. 67, nº 1, pp. 209-217, 2007.

[52] H. Xiang, M. Guo e J. Liu, “Transition-metal nitrosyls for photocontrolled nitric oxide delivery.,” *European Journal of Inorganic Chemistry,* vol. 2017, nº 12, pp. 1586-1595, 2017.

[53] M. Zaki, F. Arjmand e S. Tabassum, “Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action.,” *Inorganica Chimica Acta,* vol. 444, pp. 1-22, 2016.

[54] S. Fricker, E. Slade, N. Powell, O. Vaughan, G. Henderson, B. Murrer, I. Megson, S. Bisland e F. Flitney, “Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases.,” *British Journal of Pharmacology,* vol. 122, nº 7, pp. 1441-1449, 1997.

[55] M. Guo, H. Xiang, Y. Wang, Q. Zhang, L. An, S. Yang, Y. Ma, Y. Wang e J. Liu, “Ruthenium nitrosyl functionalized graphene quantum dots as an efficient nanoplatform for NIR-light-controlled and mitochondria-targeted delivery of nitric oxide combined with photothermal therapy.,” *Chemical Commnunications,* pp. 1-4, 2013.

[56] A. Enriquez-Cabrera, P. Lacroix, I. Sasaki, S. Mallet-Ladeira, N. Farfán, R. Barba-Barba, G. Ramos-Ortiz e I. Malfant, “Comparison of carbazole and fluorene donating effects on the two-photon absorption and nitric oxide photorelease capabilities of a ruthenium–nitrosyl complex.,” *European Journal of Inorganic Chemistry,* nº 3-4, pp. 531-546, 2018.

[57] D. Bonaventura, F. Oliveira, C. Lunardi, J. Vercesi, R. da Silva e L. Bendhack, “Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex.,” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry,* vol. 15, nº 4, pp. 387-394, 2006.

[58] L. Ignarro, “Nitric oxide: biology and phatology.,” *Academic Press,* 2000.

[59] G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni e E. Alessio, “Na[trans-RuCl4(DMSO)Im], a metal complex of ruthenium with antimetastatic properties.,” *Clinical & Experimental Metastasis,* vol. 10, nº 4, pp. 273-280, 1992.

[60] S. Leijen, S. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J. Beijnen e J. Schellens, “Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy.,” *Investigational New Drugs,* vol. 33, nº 1, pp. 201-214, 2015.

[61] R. Trondl, P. Heffeter, C. Kowol, M. Jakupec, W. Berger e B. Keppler, “NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application.,” *Chemical Science,* vol. 5, pp. 2925-2932, 2014.

[62] A. Bergamo e G. Sava, “Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases.,” *Chemical Society Reviews,* vol. 44, nº 24, pp. 8818-8835, 2015.

[63] G. Gransbury, P. Kappen, C. Glover, J. Hughes, A. Levina, P. Lay, I. Musgrave e H. Harris, “Comparison of KP1019 and NAMI-A intumour-mimetic environments.,” *Metallomics,* vol. 8, nº 8, pp. 762-773, 2016.

[64] C. Hartinger, M. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. Dyson e K. B.K., “KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients.,” *Chemistry & Biodiversity,* vol. 10, nº 5, pp. 2140-2155, 2008.

[65] F. do Nascimento, G. von Poelhsitz, F. Pavan, D. Sato, C. Leite, H. Selistre-de-Araújo, J. Ellena, E. Castellano, V. Deflon e A. Batista, “Synthesis, characterization, X-ray structure and in vitro antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the "SpymMe2" ligand, SpymMe2=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine.,” *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 9, nº 102, pp. 1783-1789, 2008.

[66] F. Pavan, G. Poelhsitz, M. Barbosa, S. Leite, A. Batista, J. Ellena, L. Sato, S. Franzblau, V. Moreno, D. Gambino e C. Leite, “Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis.,” *European Journal of Medicinal Chemistry,* vol. 46, nº 10, pp. 5099-5107, 2011.

[67] H. A. J. DePhilips, “Oxygen Binding of Hemerythrin.,” *Archives of Biochemistry and Biophysics,* vol. 144, nº 1, pp. 122-126, 1971.

[68] J. Loehr, K. Meyerhoff, C. Sleker e L. Jensen, “An X-ray Crystallographic Study of Hemerythrin.,” *Journal of Molecular Biology,* vol. 91, nº 4, pp. 521-522, 1975.

[69] P. Harrington e R. Wilkins, “The Kinetics of Oxidation of Hemerythrin Species - Linear Free Energy Relationships.,” *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 19, nº 4, pp. 339-344, 1983.

[70] A. Toulmond, “Circulating Respiratory Pigments in Marine Animals.,” *Symposia of the Society for Experimental Biology,* vol. 39, pp. 163-206, 1985.

[71] P. Wilkins e R. Wilkins, “The Coordination Chemistry of the Binuclear Iron Site in Hemerythrin.,” *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 79, nº 3, pp. 195-214, 1987.

[72] R. Stenkamp, “Dioxygen and Hemerythrin.,” *American Chemical Society,* vol. 94, nº 3, pp. 715-726, 1994.

[73] A. Negri, G. Tedeschi, F. Bonomi, J. Zhang e D. M. J. Kurtz, “Amino-acid sequences of the Alpha - and - Beta-subunits of Hemerythrin from Lingula reevii.,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology,* vol. 1208, nº 2, pp. 277-285, 1994.

[74] B. Lieb e A. Meyer, “Respiratory Proteins in Sipunculus nudus - Implications for Phylogeny and Evolution of the Hemerythrin Family.,” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.,* vol. 155, nº 2, pp. 171-177, 2010.

[75] W. Kao, V. Wang, Y. Huang, S. Yu, T. Chang e S. Chan, “Isolation, Purification and Characterization of Hemerythrin from Methylococcus capsulatus (Bath).,” *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 102, nº 8, pp. 1607-1614, 2008.

[76] S. Lippard, “The Bioinorganic Chemistry of Rust.,” *Chemistry in Britain,* vol. 22, pp. 222-229, 1986.

[77] S. Dutta, R. Werner, U. Florke, S. Mohanta, K. Nanda, W. Haase e K. Nag, “Model Compounds for Iron Proteins. Structure and Magnetic, Spectroscopic, and Redox Properties of the Fe(III)M(II) and [Co(III)Fe(III)] Complexes with (μ-Carboxylato)bis(μ-phenoxo)dimetalate and (μ-oxo)diiron(III) Cores.,” *Inorganic Chemistry,* vol. 35, nº 8, pp. 2292-2300, 1996.

[78] M. Balamurugan, E. Suresh e M. Palaniandavar, “μ-Oxo and Bis(μ-carboxylato)-bridge Diiron(III) Complexes of a 3N Ligand as Catalysts for Alkane Hydroxylation: Steroelectronic Factors of Carboxylate Bridge Determine the Catalytic Efficiency.,” *Dalton Transactions,* vol. 45, nº 28, pp. 11422-11436, 2016.

[79] S. Yoon e S. Lippard, “Synthesis and Characterization of Carboxylate-Rich Complexes Having the $\{Fe_2(\mu\text{-}OH)_2(\mu\text{-}O_2CR)\}^{3+}$ and $\{Fe_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}O_2CR)\}^{3+}$Cores of O_2-Dependent Diiron Enzymes.,” *Journal of the American Chemical Society,* vol. 126, nº 9, pp. 2666-2667, 2004.

[80] S. Chanu, S. Banerjee e M. Roy, “Potent Anticancer Activity of Photo-activated oxo-bridged Diirion(II) Complexes.,” *European Journal of Medicinal Chemistry ,* vol. 125, pp. 816-824, 2017.

[81] J. Sheats, R. Czernuszewicz, G. Dismukes, A. Rheingold, V. Petrouleas, J. Stubbe, W. Armstrong, R. Beer e S. Lippard, “Binuclear Manganese(III) Complexes of Potencial Biological Significance.,” *Journal of the American Chemical Society,* vol. 109, nº 5, pp. 1435-144, 1987.

[82] M. Corbella, R. Costa e J. Ribas, “Strucutural and Magnetization Studies of a New (μ-oxo)bis(μ-carboxylato)dimanganese(III) Complex with a Terminal Hydroxo Ligand.,” *Inorganic Chemistry,* vol. 35, nº 7, pp. 1857-1865, 1996.

[83] W. Machini e M. Teixeira, “Analytical Development of a Binuclear oxo-manganese Complex Bioinspired on Oxidase Enzyme for Doping Control Analysis of Acetazolamide.,” *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 79, pp. 442-448, 2016.

[84] C. Martin e M. Teixeira, “A Comparison of Charge-transfer Mechanisms at Rotated Disk Electrode for Biomimetic Binuclear and Tetranuclear oxo-manganese Complex in Aqueous Solution.,” *Inorganica Chimica Acta,* vol. 425, pp. 76-82, 2015.

[85] K. Wieghardt, M. Koppen, B. Nuber e J. Weiss, “Spontaneous Self Assembly of the $\{M_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}MeCO_2)_2\}^{2+}$Core. Synthesis, Structure, and Properties of the Binuclear Vanadium(III)

Complex.," *Journal of Chemical Society Communications,* vol. 735, nº 20, pp. 1530-1532, 1986.

[86] M. Tabatabaee, H. Mahmoodikhah, G. Ahadiat, M. Dusek e Pojarová, "Synthesis, Crystal Structure, and Spectroscopic Characterization of two new Binuclear Complexes of Manganes(II) and Vanadium (V) with Dipicolinate Ligands Containing 2-aminopyrimidinium as a Counter Cation," *Monatshefte Fur Chemie,* vol. 144, nº 5, pp. 621-626, 2013.

[87] P. Chatterjee, N. Kundu, S. Bhattacharya, K. Choi, A. Endo e M. Chaudhury, "Targeted Synthesis of μ-Oxo Divanadium(V) Compounds with Asymmetry in Coordination Environments.," *Inorganic Chemistry,* vol. 46, nº 14, pp. 5483-5485, 2007.

[88] M. Bond, R. Czernuszewicz, B. Dave, Q. Yan, M. Mohan, R. Verastegue e C. Carrano, "Spectroscopic and Magnetostructural Correlations in oxo-bridged Dinuclear Vanadium(III) Complexes of Potential Biological Significance.," *Inorganic Chemistry,* vol. 34, nº 23, pp. 5857-5869, 1995.

[89] A. Bodner, D. S., K. Wieghardt, B. Nuber e J. Weiss, "Structure-Magnetism Relationship in $[Ti(III)-O-Ti(III)]^{4+}$ Complexes.," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 29, nº 1, pp. 68-70, 1990.

[90] T. Kemmitt, G. Gainsford e N. Al-Salim, "An oxo-bridged Centrosymmetric Tetranuclear Titanium Compound.," *Acta Crystallographica Section C,* vol. C60, pp. m42-m43, 2004.

[91] P. Jeske, K. Wieghardt e B. Nuber, "New Mono- and Dinuclear Titanium(III) Complexes. The Crystal Structure of and Exchange Coupling in $[(LTi(III)(NCO_2)_2)(\mu\text{-}O)]$ (L = 1,4,7-Trimethyl-

1,4,7-triazacyclononane)," *Inorganic Chemistry,* vol. 33, nº 1, pp. 47-53, 1994.

[92] J. Okuda e E. Herdtweck, "Synthesis and Structural Characterization of an Organotitanium Complex Containing a Planar Bis (μ-oxo)dititanium Core.," *American Chemical Society,* vol. 30, nº 7, pp. 1516-1520, 1990.

[93] G. Ali, P. VanNatta, D. Ramirez, K. Light e M. Kieber-Emmons, "Thermodynamics of a μ-oxo Dicopper(II) Complex for Hydrogen Atom Abstraction.," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 139, nº 51, pp. 18448-18451, 2017.

[94] A. Rodríguez-Fortea, E. Ruiz, S. Alvarez e P. Alemany, "Exchange Coupling in μ-aqua: μ-oxo vs. di-μ-hydroxo Dinuclear Cu(II) Compounds: a Density Functional Study.," *Dalton Transictions,* vol. 0, nº 15, pp. 2624-2629, 2005.

[95] N. Kitajima, T. Koda e Y. Moro-Oka, "Synthesis of a Novel μ-Oxo Binuclear Copper(II) Complex Ligated by Hydrotris(3,5-dimethyl-1-pyrazolyl)borate.," *Chemistry Letters,* vol. 17, nº 2, pp. 347-350, 1988.

[96] Y. Sasaki, M. Susuki, A. Tokiwa, M. Ebihara, T. Yamaguchi, C. Kabuto e T. Ito, "Bis(μ-acetato)(μ-oxo)bis(tris(pyridine)ruthenium(III)) Ion: A Ruthenium Analogue of the Hemerythrin Active Center.," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 110, nº 18, pp. 6251-6252, 1988.

[97] G. Seuanes, M. Moreira, T. Petta, M. Del Lama, L. de Moraes, A. de Oliveira, R. Naal e S. Nikolaou, "Novel Binuclear μ-oxo Diruthenium Complexes Combined with Ibuprofen and Ketoprofen: Interaction with Relevant Target Biomolecules and Anti-

allergic Potencial.," *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 153, pp. 178-185, 2015.

[98] A. Eremin, A. Belyaev e S. Simanova, "Binuclear Ruthenium(III) μ-Oxocarboxylates of the Nonelectrolyte Type. Molecular Structure of the Complex $[Ru_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}O_2CCF_3)_2Py_4(O_2CCF_3)_2]\cdot(CH_3)_2CO$.," *Russian Journal of Coordination Chemistry,* vol. 31, nº 11, pp. 761-767, 2005.

[99] B. Das e A. R. Chakravarty, "Reactivity of PPh3 toward Ru(II)Ru(III)Cl(O2CAr)4: Synthesis, Molecular Structures, and Spectroscopic and Electrochemical Properties of Ru(II)Ru(III)(OH)2Cl(MeCN)(O2CAr)4(PPh3)2 and Ru(II)2(OH2)(MeCN)2(O2CAr)4(PPH3)2.," *Inorganic Chemistry,* vol. 30, nº 26, pp. 4978-4986, 1991.

[100] T. Ikeue, Y. Kimura, K. Karino, M. Iida, T. Yamaji, I. Hiromitsu, T. Sugimori, D. Yoshioka, M. Mikuriya e M. Handa, "Structural, Magnetic, and 1H NMR Spectral Study on Lantern-type cis- and trans-diruthenium(II,III) Complexes with two Formamidinato and two Acetato Bridges.," *Inorganic Chemistry Communications,* vol. 33, pp. 133-137, 2013.

[101] J. Achan, A. O. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, J. K. Tibenderana, F. N. Baliraine, P. J. Rosenthal e U. D'alessandro, "Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria.," *Malaria Journal,* vol. 10, nº 1, pp. 144-155, 2011.

[102] A. Carver, "Quinine therapy and hydrotherapy in the treatment of malaria.," *The Lancet,* vol. 190, pp. 623-624, 1917.

[103] P. O'Neill, P. Bray, S. Hawley, S. Wards e B. Park, "4-Aminoquinolines—Past, present, and future; A chemical

perspective.," *Pharmacology & Therapeutics,* vol. 77, nº 1, pp. 29-58, 1998.

[104] F. Goble, "Chemotherapeutic activity of certain 8-aminoquinolines, particularly pentaquine, in experimental Chagas' disease.," *The Journal of Parasitology,* vol. 35, nº 4, pp. 375-378, 1949.

[105] F. Buckner, C. Verlinde, A. la Flamme e W. van Voorhis, "Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase.," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* vol. 40, nº 11, pp. 2592-2597, 1996.

[106] M. Foley, "Quinoline antimalarials mechanisms of action and resistance and prospects for new agents.," *Pharmacology & Therapeutics,* vol. 79, nº 1, pp. 55-87, 1998.

[107] D. Beattie, R. Crossley, A. Curran, G. Dixon, D. Hill, A. Lawrence e R. Shepherd, "5,6,7,8-Tetrahydroquinolines. Antiulcer and Antisecretory Activity of 5,6,7,8-Tetrahydroquinolinenitriles and -thioamides .," *Journal of Medicinal Chemistry,* vol. 20, nº 5, pp. 714-718, 1977.

[108] S. Ahmad, "Kinetic aspects of platinum anticancer agents.," *Polyhedron,* vol. 138, pp. 109-124, 2017.

[109] S. Gómez-Ruiz, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic e G. Kaluderovic, "On the discovery, biological effects, and Use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy.," *Bioinorganic Chemistry and Applications,* vol. 2012, pp. 1-14, 2012.

[110] R. Eldick, "Electronic tuning of the lability of inert Co(III) and Pt(II) complexes.," *Advances in Inorganic Chemistry,* vol. 59, pp. 265-310, 2006.

[111] R. Eldik e C. Hubbard, “The interpretation and mechanistic significance of activation volumes for organometallic reactions.,” *Advances in Physical Organic Chemistry,* vol. 41, pp. 1-78, 2006.

[112] D. C. Hodgkin, J. Pickworth, J. H. Robertson, K. N. Trueblood, R. J. Prosen e J. G. White, “The crystal structure of the Hexacarboxylic Acid derived brom B12 and the molecular structure of the vitamin.,” *Nature,* vol. 176, nº 4477, pp. 325-328, 1955.

[113] R. Holm, P. Kennepohl e E. Solomon, “Structural and functional aspects of metal sites in biology.,” *Chemical Reviews,* vol. 96, nº 7, pp. 2239-2314, 1996.

[114] A. Lacroix, T. Edwardson, M. Hancock e M. Dore, “Development of DNA nanostructures for high-affinity binding to Human Serum Albumin.,” *Journal of the American Chemical Society,* vol. 139, pp. 7355-7362, 2017.

[115] K. Ulrich, “Structure and ligand binding properties of human serum albumin.,” *Danish Medical Bulletin.,* vol. 37, nº 1, pp. 57-84, 1990.

[116] W. Klopfenstein, “Enthalpy change of binding lysolecithin to serum albumin.,” *Biochimica Biophysica Acta,* vol. 181, pp. 323-325, 1969.

[117] W. Unger, “Binding of prostaglandin to human serum albumin.,” *Journal of Pharmacy Pharmacology,* vol. 24, nº 6, pp. 470-477, 1972.

[118] B. P. Espósito e R. Najjar, “Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin.,” *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 232, pp. 137-149, 2002.

[119] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano e P. Ascenzi, “Human serum albumin: from bench to bedside.,” *Molecular Aspects of Medicine,* vol. 2012, nº 3, pp. 209-290, 2012.

[120] J. Watson e F. Crick, “Molecular structure of nucleic acids.,” *Nature,* vol. 171, pp. 737-738, 1953.

[121] A. Lehninger, D. Nelson e M. Cox, Lehninger principles of biochemistry., Macmillan Higher Education, 2008.

[122] F. Keene, J. Smith e J. Collins, “Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids.,” *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 253, p. 2021–2035, 2009.

[123] C. Barra e A. Netto, “Interações entre complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análise: um enfoque nos metalointercaladores.,” *Revista Virtual de Química,* vol. 7, nº 6, pp. 1998-2016, 2015.

[124] B. M. Zeglis, V. C. Pierre e J. K. Barton, “Metallo-intercalators and metallo-insertors.,” *Chemical Communications,* vol. 44, pp. 4565-5479, 2007.

[125] A. Komor e J. Barton, “The path for metal complexes to a DNA target.,” *Chemical Communications,* vol. 49, nº 35, pp. 3617-3630, 2013.

[126] “INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER.,” [Online]. Available: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. [Acesso em 22 05 2018].

[127] G. B. Filho, Distúrbios do crescimento e diferenciação celular., Belo Horizonte: Guanabara-Koogan S.A, 1994.

[128] M. Ochsner, “Photophysical and photobiological properties in photodynamic therapy of tumours.,” *Journal of Photochemistry and Photobiology,* vol. 39, pp. 1-18, 1997.

[129] N. Larsen, L. Broge e H. Jacobi, “Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment.,” *Drug Discovery Today,* vol. 21, nº 1, pp. 26-37, 2015.

[130] T. McConnell, The nature of disease : pathology for the health professions., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

[131] S. Johansson, J. Hourihane, J. Bousquet, C. Bruijnzeel-Koomen, S. Dreborg, T. Haahtela, M. Kowalski, N. Mygind, J. Ring, P. van Cauwenberge, M. van Hage-Hamsten e B. Wuthrich, “A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.,” *Allergy,* vol. 56, pp. 813-824, 2001.

[132] D. Holowka e B. Baird, “Antigen-mediated IgE receptor aggregation and signaling: A window on cell surface structure and dynamics.,” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure,* vol. 25, pp. 79-112, 1996.

[133] J. D. Taurog, C. Fewtrell e E. L. Becker, “IgE mediated triggering of rat basophil leukemia cells: lack of evidence for serine esterase activation.,” *Journal of immunology,* vol. 122, nº 6, pp. 2150-2153, 1979.

[134] E. L. Barsumian, C. Isersky, M. G. Petrino e R. P. Siraganian, “IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones.,” *European Journal of Immunology,* vol. 11, nº 4, pp. 317-323, 1981.

[135] Y. Sasaki, M. Suzuki, A. Nagasawa, A. Tokiwa, M. Ebihara, T. Yamaguchi, C. Kabuto, T. Ochi e T. Ito, “Preparation, structure,

and properties of the bis(p-acetato)(p-oxo)Ruthenium(III) Dimers $[Ru_2(\mu\text{-}CH3COO)_2(\mu\text{-}O)(py)_6]^{2+}$ and $[Ru_2(\mu\text{-}CH_3COO)_2(\mu\text{-}O)(bpy)_2(py)_2]^{2+}$.," *Inorganic Chemistry,* vol. 30, nº 26, pp. 4903-4908, 1991.

[136] J. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy., Springer, 2006.

[137] M. Eftink e T. Dewey, "Fluorescence Quenching Reactions.," em *Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy.*, Boston, MA, Springer US, 1991, pp. 1-41.

[138] Y. Hu, Y. Liu, J. Wang, X. Xiao e S. Qu, "Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.,* vol. 36, nº 4, pp. 915-919, 2004.

[139] B. Valeur, Molecular fluorescence: principles and applications., Paris: Wiley, 2001.

[140] D. Sheehan, Physical biochemistry - principles and applications., Wiley-Blackwell, 2009.

[141] N. Greenfield e G. Fasman, "Computed circular dichroism spectra for the evalution of protein conformation.," *Biochemistry,* vol. 8, p. 4108–4116, 1969.

[142] N. Greenfield, "Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data.," *Analytical Biochemistry,* vol. 235, pp. 1-10, 1996.

[143] M. K. Tanimoto, K. Dias, S. Dovidauskas e S. Nikolaou, "Tuning the reaction products of ruthenium and ciprofloxacin for studies of DNA interactions.," *Journal of Coordination Chemistry,* vol. 65, nº 9, p. 1504–1517, 2012.

[144] M. Sirajuddin, S. Ali e A. Badshah, “Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry.,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,* vol. 124, pp. 1-19, 2013.

[145] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.,” *Journal of Immunological Methods,* vol. 65, nº 1-2, pp. 55-63, 1983.

[146] W. Henderson e J. Mcindoe, Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds: tools - tecnhiques - tips., England: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

[147] S. Toma, S. Nikolaou, D. Tomazela, M. Eberlin e H. Toma, “Synthesis, spectroscopy, tandem mass spectrometry, and electrochemistry of the linearly bridged μ-{trans-1,4-bis[2-(4-pyridyl)ethenyl]-benzene}-{$Ru_3O(CH_3COO)_6(py)_2$}^{2} cluster.,” *Inorganica Chimica Acta,* vol. 357, nº 8, pp. 2253-2260, 2004.

[148] M. Eberlin, D. Tomazela, K. Araki, A. Alexiou, L. Formiga, H. Toma e S. Nikolaou, “Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry of Polymetallic Complexes : Intrinsic Ligand (L) Affinities with Direct Access to Steric Effects.,” *Organometallics,* vol. 25, pp. 3245-3250, 2006.

[149] D. A. Skoog, F. J. Holler e T. A. Nieman, Princípios de Análise Instrumental., Porto Alegre: Bookman, 2002.

[150] M. Abe, A. Mitani, A. Ohsawa, M. Herai, M. Tanaka e Y. A. Sasaki, “ABE, MA kinetic study on pyridine exchange reactions at a bis(μ-acetato)(μ-oxo)diruthenium(III) center: effects of monodentate and bidentate N-heterocyclic ligands cis to the oxo bridge.,” *Inorganica Chimica Acta,* vol. 331, pp. 158-167, 2002.

[151] T. Fukumoto, A. Kikuchi, K. Umakoshi e Y. Sasaki, “Preparation and properties of a series of (μ-oxo) di(μ-acetato) diruthenium(III) complexes, $[Ru_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3COO)_2(pyridine)_4(L)_2]^{2+}$ and $[Ru_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3COO)_2(AA)_2(L)_2]^{2+}$, where AA is 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline, and L is a monodentate ligand.,” *Inorganica Chimica Acta,* vol. 283, pp. 151-159, 1998.

[152] G. Caramori e K. de Oliveira, “Aromaticidade - evolução histórica do conceito e critérios quantitativos.,” *Química Nova,* vol. 32, nº 7, pp. 1871-1884, 2009.

[153] R. Silverstein, G. Bassler e T. Morril, Spectroscopic Identification of Organic Compounds, John Wiley & Sons, 1991.

[154] A. Hussain, A. Bhatt, D. Kuamar, R. Thorat, H. Padhiyar e R. Shukla, “Substitution of trans ligands in μ-oxo-bis(μ-acetato)diruthenium(III) complexes: Synthesis and kinetic studies.,” *Inorganica Chemica Acta,* vol. 32, pp. 1101-1108, 2009.

[155] I. Bertini e C. Luchinat, “Chapter 2 The hyperfine shift.,” *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 150, nº 0, pp. 29-75, 1996.

[156] S. Nikolaou, “Desenvolvimento de estruturas polinucleares baseadas em clusters trinucleares e complexos poliimínicos de rutênio: unidades de montagem em química supramolecular.,” *Universidade de São Paulo,* 2002.

[157] I. Alperovich, G. Smolentsev, D. Moonshiram, J. Jurss, J. Concepcion, T. Meyer, A. Soldatov e Y. Pushkar, “Understanding the electronic structure of 4d metal complexes: from molecular spinors to L-Edge spectra of a di-Ru catalyst.,” *Journal of American Chemical Society,* vol. 133, pp. 15786-15794, 2011.

[158] T. Weaver, T. Meyer, S. Adeyemi, G. Brown, R. Eckberg, W. Hatfield, E. Johnson, R. Murray e D. Untereker.Chemically significant interactions between ruthenium Ions in oxo-bridge complexes of ruthenium (III).," *Journal of Americam Chemical Society,* vol. 97, pp. 3039-3048, 1975.

[159] H. Zhang, K. Tsuge, Y. Sasaki, M. Osawa e M. Abe, "Cyano- and aqua-coordinated diruthenium(III) complexes with xoo-bis(acetato) brigde: preparation and steric and electronic strutures.," *European Journal of Inorganic Chemistry,* vol. 2011, nº 33, pp.

[160] A. Llobet, M. Curry, T. Evans e T. Meyer, "Synthesis and spectral and redox properties of three triply bridged complexes of ruthenium.," *Inorganic Chemistry,* vol. 28, pp. 3131-3137, 1989.

[161] J. Baumann, D. Salmon, S. Wilson, T. Meyer e W. Hatfield, "Electronic structure and redox properties of the clusters $[Ru_3O(CH_3CO_2)_6L_3]^{n+}$.," *Inorganic Chemistry,* vol. 17, pp. 3342-3350, 1978.

[162] H. Toma, A. Alexiou e S. Dovidauskas, "Extended electronic interactions in a triangular μ-oxotriruthenium acetate cluster containing nitric oxide.," *European Journal of Inorganic Chemistry,* vol. 2002, nº 11, pp. 3010-3017, 2002.

[163] H. Masuda, "The Crystal and Molecular Structure of New Tetravalent Ruthenium Porphyrin. μ-Oxo-bis[(octaethylporphinato)ruthenium(IV) hydroxide]," *Journal of American Chemical Society,* vol. 103, nº 9, pp. 2199-2203, 1981.

[164] Y. Sasaki, A. Yoshida, A. Ohto, I. Tokiwa, I. Ito, H. Kobayashi, I. Uryu e I. Mogi, "Mixed chromium(III)-ruthenium(III) trinuclear complex, $[CrRu_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3COO)_6(pyridine)_3]^+$," *Chemistry Letters,* vol. 22, nº 1, pp. 69-72, 1993.

[165] K. Nakamoto, Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds., v.13: John Wiley & Sons INC., 1996.

[166] M. Aquino, “Diruthenium and diosmium tetracarboxylates: synthesis, physical properties and applications.,” *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 1998, nº 170, pp. 141-202, 1998.

[167] A. Heyns, “The I.R. and raman spectra of sodium hexafluorophosphate monohydrate, $NaPF_6.H_2O$.,” *Spectrochimica Acta,* vol. 33, pp. 315-322, 1977.

[168] C. He e S. J. Lippard, “Synthesis and electrochemical studies of diiron complexes of 1,8-naphthyridine-based dinucleating ligands to model features of the active sites of non-heme diiron enzymes.,” *Inorganic Chemistry,* vol. 40, nº 7, pp. 1414-1420, 2001.

[169] M. Valli, S. Miyata, H. Wakita e T. Yamaguchi, “An in Situ absorption fine structure study different oxidation states of oxo and hydroxo-bridge ruthenium dimers in acetonitrile solution.,” *Inorganic Chemistry,* vol. 36, nº 21, pp. 4622-4626, 1997.

[170] T. Tanase, N. Takeshita, S. Yano, I. Kinoshita e A. IChimura, “(μ-Oxo or hydroxo)bis(μ-carboxylato)diruthenium(III) complexes with tris(1-pyrazolyl)borate face-capping ligand, a.ording versatile oxidation states via a protonation/deprotonation couple.,” *New Journal of Chemistry,* pp. 927-929, 1998.

[171] H. Zhang, M. Abe, Y. Zhang, G. Li, S. Ye, M. Osawa e Y. Sasaki, “Proton-coupled electron transfer and lewis acid recognition at self-assembled monolayers of an oxo bridged diruthenium(III) complex functionalized with two disulfide anchors.,” *American Chemical Society,* vol. 29, pp. 10110-10119, 2013.

[172] A. Symala e A. Chakravarty, “Synthesis, structure and redox properties of(μ-oxo)bis(μ-carboxylato)diruthenium(III) complexes

containing three different terminal ligands.," *Polyhedron,* vol. 12, pp. 1545-1552, 1993.

[173] P. Doppel e T. Meyer, "Synthesis and redox properties of the unsymmetrical, Oxo-Bridge complex $[(bpy)_2(py)RuIIIORuIII(H_2O)(bpy)_2]^{4+}$," *Inorganic Chemistry,* vol. 26, pp. 2028-2034, 1987.

[174] F. Basolo, "Mechanisms of substitution reactions of metal complexes.," *Survey of Progress in Chemistry,* vol. 2, pp. 1-55, 1964.

[175] B. Coe e S. Glenwright, "Trans-effects in octahedral transition metal complexes.," *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 2000, nº 203, pp. 5-80, 2000.

[176] H. Tseng, R. Zong, J. Muckerman e R. Thummel, "Mononuclear Ruthenium(II) Complexes That Catalyze Water Oxidation.," *Inorganic Chemistry,* vol. 47, nº 24, pp. 11763-11773, 2008.

[177] I. Levine, Physical Chemistry, New York: Higher Education, 2009.

[178] A. Barboza, C. Cruz, M. Graziani, M. Lorenzetti e E. Sabadini, "Aquecimento em forno microondas/ Desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais.," *Química Nova.,* vol. 24, nº 6, pp. 901-904, 2001.

[179] T. Peters, All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications., San Diego, CA: Academic Press, 1996.

[180] N. Cacita e S. Nikolaou, "Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by

means of fluorescence quenching.," *Journal of Luminescence,* vol. 2016, nº 169, pp. 115-120, 2016.

[181] F. Reis, J. Coelho, W. Pazin e S. Nikolaou, "A new homoleptic coordination compound of ruthenium and norfloxacin and its interaction with humam serum albumin.," *Inorganic Chemistry Communication,* vol. 63, pp. 96-100, 2016.

[182] R. de Oliveira, E. Boffo, F. Reis, S. Nikolaou, K. Andriani, G. Caramori e F. Doro, "A ruthenium polypyridyl complex with the antihypertensive drug valsartan: Synthesis, theoretical calculations and interaction studies with human serum albumin.," *Polyhedron,* vol. 114, pp. 232-241, 2016.

[183] H. Hou, Z. Qi, Y. Ouyang, F. Liao, Y. Zhang e C. Liu, "Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* vol. 47, pp. 134-139, 2008.

[184] S. Gorinstein, I. Goshev, S. Moncheva, M. Zemser, M. Weisz, A. Caspi, I. Libman, H. T. Lerner, S. Trakhtenberg e O. Martín-Belloso, "Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes.," *Journal of Protein Chemistry,* vol. 19, nº 8, pp. 637-642, 2000.

[185] W. Ware, "Oxigen quenching of fluorescence in solution, an experimental study of the diffusion process.," *Journal of Physical Chemistry,* vol. 66, pp. 455-458, 1966.

[186] R. Maurice e A. Camillo, "Fluorescence quenching studies with proteins.," *Analytical biochemistry,* vol. 114, pp. 199-212, 1981.

[187] M. Xie, M. Long, Y. Liu, C. Qin e Y. Wang, "Characterization of the interaction between human serum albumin and morin.," *Biochimica et biophysica acta,* vol. 1760, nº 8, p. 1184–1191, 2006.

[188] M. Arik, N. Çelebi e Y. Onganer, “Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution.,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry,* vol. 170, pp. 105-111, 2005.

[189] R. E. Olson e D. Christ, “Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs.,” *Annual Reports in Medicinal Chemistry,* vol. 31, pp. 327-336, 1996.

[190] A. Ivanov, J. Christodoulou, J. Parkinson, K. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow e P. Sadler, “Cisplatin Binding Sites on Human Albumin.,” *The Journal of Biological Chemistry,* vol. 273, nº 24, pp. 14721-14730, 1998.

[191] X. Guo, L. Zhang, X. Sun, X. Han, C. Guo e P. Kang, “Spectroscopic studies on the interaction between sodium ozagrel and bovine serum albumin.,” *Journal of Molecular Structure,* vol. 928, pp. 114-120, 2009.

[192] X. Yu, S. Lu, Y. Yang e X. Li, “Study on the interaction between NCP-(4-hydroxycoumarins) and bovine serum albumin by spectroscopic techniques.,” *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* vol. 91, pp. 113-117, 2012.

[193] S. S. Kalanur, J. Seetharamappa e V. K. A. Kalalbandi, “Characterization of interaction and the effect of carbamazepine on the structure of human serum albumin.,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* vol. 53, nº 3, pp. 660-666, 2010.

[194] Y. Hu, S. Xu, X. Zhu e A. Gong, “Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses.,” *SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* vol. 74, nº 2, pp. 526-531, 2009.

[195] P. Ross e S. Subramanian, “Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability.,” *Biochemistry,* vol. 20, nº 11, pp. 3096-3102, 1981.

[196] R. Patel e M. Kumari, “Interaction between pyrrolidinium based ionic liquid and bovine serum albumin: A spectroscopic and molecular docking insight.,” *Biochemistry & Analytical Biochemistry,* vol. 5, nº 2, pp. 1-8, 2016.

[197] N. Tayeh, T. Rungassamy e J. Albani, “Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins.,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* vol. 2009, nº 50, pp. 107-116, 2009.

[198] M. Amiri, K. Jankeje e J. Albani, “Origin of fluorescence lifetimes in human serum albumin. Studies on native and denatured protein.,” *Journal of Fluorescence,* vol. 2010, nº 20, pp. 651-656, 2010.

[199] M. Amiri, K. Jankeje e J. Albani, “Characterization of human serum albumin forms with pH. Fluorescence lifetime studies.,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* vol. 2010, nº 51, p. 1097–1102, 2010.

[200] V. Silveira, G. Caramori, M. Abbott, M. Gonçalves, A. Ferreira, V. da Silveira, G. Caramori, M. Abbott, M. Gonçalves e H. d. C. F. A. Petrilhi, “Oxindole-Schiff base copper(II) complexes interactions with human serum albumin: Spectroscopic, oxidative damage, and computational studies.,” *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 103, nº 10, pp. 1331-1341, 2009.

[201] R. Eshkourfu, B. Čobeljic, M. Vujcic, I. Turel, A. Pevec, K. Sepcic, M. Zec, R. S., T. Srdic-Radic, D. Mitic, K. Andjelkovic e D. Sladic, “Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt(III) complex with the

condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide.," *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 105, p. 1196–1203, 2011.

[202] R. Liu, X. Yu, W. Gao, J. D, F. Yang, X. Li, J. Chen, H. Tao, H. Huang e P. Yi, "Study on the interaction between salvianic acid A sodium and bovine serum albumin by spectroscopic methods.," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* vol. 5, nº 78, pp. 1535-1539, 2011.

[203] N. Shahabadi, S. Mohammadi e R. Alizadeh, "DNA interaction studies of a new platinum(II) complex containing different aromatic dinitrogen ligands.," *Bioinorganic Chemistry and Applications,* vol. 2011, p. 8, 2011.

[204] F. Arjmand e A. Jamsheera, "DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV).," *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy,* vol. 2011, nº 78, pp. 45-51, 2011.

[205] G. Pratviel, J. Bernadou e B. Meunier, "DNA and RNA cleavage by metal complexes.," *Advances in Inorganic Chemistry,* vol. 45, pp. 251-312, 1998.

[206] M. V. Berridge e A. S. Tan, "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular, localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.," *Archives of Biochemistry and Biophysics,* vol. 303, nº 2, p. 474–482, 1992.

[207] S. Wernersson e G. Pejler, "Mast cell secretory granules: armed for battle.," *Nature Reviews Immunology,* vol. 14, nº 7, p. 478–494, 2014.

[208] E. Passante e N. Frankish, “The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell.,” *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ,* vol. 58, nº 11, p. 737–745, 2009.

[209] R. Naal, J. Tabb, D. Holowka e B. Baird, “In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells.,” *Biosensors & Bioelectronics,* vol. 20, nº 4, pp. 791-796, 2004.

[210] P. Schluga, C. Hartinger, E. A., E. Reisner, M. Galanski, M. Jakupec e B. Keppler.

[211] H. A. J. DePhilips, “Oxygen Binding of Hemerythrin.,” *Archives of Biochemistry and Biophysics,* vol. 144, nº 1, pp. 122-126, 1971.

[212] J. Loehr, K. Meyerhoff, C. Sleker e L. Jensen, “An X-ray Crystallographic Study of Hemerythrin.,” *Journal of Molecular Biology,* vol. 91, nº 4, pp. 521-522, 1975.

[213] P. Harrington e R. Wilkins, “The kinetics of oxidation of hemerythrin species - linear free energy relationships.,” *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 19, nº 4, pp. 339-344, 1983.

[214] H. Taube, “Rates and mechanisms of substitution in inorganic complexes solution.,” *Chemical Reviews,* vol. 50, nº 1, pp. 69-126, 1952.

[215] P. T., All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications., San Diego, CA: Academic Press, 1996.

[216] N. Shahabadi, S. Kashanian e F. Darabi, “DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt(II) complex containing dinitrogen Schiff base ligand: The effect of metal on the

mode of binding.," *European Journal of Medicinal Chemistry,* vol. 45, pp. 4239-4245, 2010.

[217] C. G.F. e K. de Oliveira, "Aromaticidade - evolução histórica do conceito e critérios quantitativos.," *Química Nova,* vol. 32, nº 7, pp. 1871-1884, 2009.

[218] T. Fukumoto, A. Kikuchi, K. Umakoshi e Y. Sasaki, "Preparation and properties of a series of (μ-oxo)di(μ-acetato)diruthenium(III) complexes, $[Ru_2(\mu\text{-}O)(\text{-}CH_3COO)^{2-}(pyridine)n(L)_2]^{2+}$ and $[Ru_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}CH_3COO)_2(AA)_2(L)_2]^{2+}$, where AA is 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline, and L is a monodentate ligand.," *Inorganica Chemica Acta,* vol. 1998, nº 283, pp. 151-159, 1998.

[219] C. Reichardt, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Wiley-VCH Publishers, 2003.