UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LILIAN PEREIRA FRANCO

**Acoplamento quantum dot/complexos nitrosilos de
Rutênio em transferência eletrônica vetorial e em
análise de imagem. Aspectos químicos e biológicos
relacionados à produção de óxido nítrico**

Ribeirão Preto - SP
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Acoplamento quantum dot/complexos nitrosilos de
Rutênio em transferência eletrônica vetorial e em
análise de imagem. Aspectos químicos e biológicos
relacionados à produção de óxido nítrico**

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

Área de Concentração:

Química e Física Biológica.

Orientado:

Lilian Pereira Franco.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva.

Versão corrigida

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de pós - graduação em
Ciências em 24/04/2014. Versão original encontra-se disponível na Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-

Ribeirão Preto - SP
2014

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Franco, Lilian Pereira

Acoplamento quantum dot/complexos nitrosilos de Rutênio em transferência eletrônica vetorial e em análise de imagem. Aspectos químicos e biológicos relacionados à produção de óxido nítrico / Lilian Pereira Franco; orientador Prof. Dr. Roberto Santana da Silva. Ribeirão Preto - SP, 2014.

185 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Química e Física Biológica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2014.

1. Quantum dot 2. Complexos de Rutênio 3. Transf. Eletrônica

Nome: FRANCO, Lilian Pereira

Título: Acoplamento quantum dot/complexos nitrosilos de Rutênio em transferência eletrônica vetorial e em análise de imagem. Aspectos químicos e biológicos relacionados à produção de óxido nítrico

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

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: _____

Coram Deo

(Diante de Deus)

À DEUS, porque DEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, **Ciro** e **Ester**, bênçãos de Deus na minha vida, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos. Momentos de alegrias, tristezas, dúvidas ou questionamentos. Pelos conselhos, palavras de carinho e o amor incondicional. Obrigada por transmitirem os ensinamentos cristãos, que hoje fazem parte do que Sou, mas agradeço principalmente pela oportunidade de conviver e compartilhar durante todos esses anos o refletir do amor de Deus sobre a vida de vocês.

Ao meu irmão **Guilherme**, pela amizade e companheirismo ao longo da vida e por proporcionar-me a oportunidade de conviver em família com a Bruna e da alegria de ser **titia** do Felipe.

Ao **Prof. Dr. Roberto Santana da Silva**, o "Chefe", por ter me aceitado como aluna de doutorado e ter me orientado durante esses anos. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, as críticas construtivas, pela amizade, **paciência** e pelas oportunidade únicas proporcionadas durante esse período. Principalmente agradeço pela confiança.

Thanks to **Prof. Dr. Peter C. Ford** for accepting me in his lab, making me feel as part of his group at UCSB. Thanks for the advices and the group meetings, that really made difference in my way of thinking. Thanks for all the Ford's group members, for the attention and friendship. Special thanks to **Peter Burks, John Garcia** and **Meredith Crisalli**, you made my days much warmer with your presence and support.

To the **Tumbels**, thanks for the nice & warm moments in family. Thanks **Wilson's family** and to **GVC** for the weekly refreshment, emotional and spiritual.

A **Simone Cicillini** e **Juliana Moraes**, colegas que se tornaram mais que amigas. Obrigada pelo suporte profissional e emocional para a execução desse projeto. Vocês foram fundamentais.

Aos colaboradores do grupo de pesquisa, **Prof. Dra. Sofia Nikolau** pela atenção e disponibilidade constantes. Ao **Prof. Dr. Marco A. Schiavon** por me

receber em seu laboratório e conduzir-me nos primeiros passos na síntese dos PQs.

Aos colegas e amigos de trabalho, desde os primeiros, Zumira Carneiro, Tassiele Heinrich, Maíta dos Santos, Fabiana Oliveira, Laísa Negri e Clovis Jr, até aos recém-chegados que se envolveram rapidamente, digo-lhes: Muito obrigada! Agradeço em especial à Mariete, sensibilidade e empatia imediata. Muito obrigada pela ajuda! E a "de sempre" Loyanne, pela amizade, colaboração e apoio durante esse tempo. À todos, obrigada pelos momentos de descontração, risadas e pelos "cafezinhos".

A minha prima **Cláudia**, pelos momentos únicos passados juntas, na nossa república, nas viagens, nos desabafos, na cumplicidade...tantos momentos que serão guardados para sempre. Obrigada.

Aos meus familiares, meus tios mestres e doutores, que me inspiraram a trilhar nessa caminhada da carreira de docência, **Tia Marília Franco e Tio Dálcio**. Muito obrigada por torcerem por mim!

Ao **David & Marina**, casal muito querido, amigos presentes nos momentos alegres e tristes, nas reflexões e questionamentos da vida. Agradeço especialmente por participarem comigo na reta final desse trabalho. Mari, obrigada por compartilhar comigo suas histórias, por sua companhia e sua casa.

Aos meus amigos, aqueles que estiveram presentes em todos os momentos ou mesmo em alguns, aos que aconselharam e aos que apenas ouviram, àqueles que nem sempre estiveram presentes mas quando o faziam, tornavam cada minuto especial. Obrigada **Ana, Gi, Rê, Cau, Amanda e Gui**, pela amizade e compreensão durante os vários momentos que não pude estar com vocês.

Aos amigos de Ribeirão Preto, irmãos que me acolheram desde os meus primeiros dias nesta cidade. Obrigada pelas caronas e o cuidado.

Aos funcionários da secretaria de Pós graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCFRP, pela atenção no esclarecimento de dúvidas durante a realização deste curso, em especial a Eleni Passos e Rosana Florêncio.

Obrigada a Deus, por colocar pessoas tão especiais na minha vida, que fizeram e ainda fazem parte da minha história .

As agências de fomento: CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

"As a blind man has no idea of colours, so we
have no idea of the manner by which the all-wise

God perceives and understands all things."

"Como um homem cego não tem idéia das cores,
por isso não temos nenhuma idéia da maneira
pela qual o Deus todo-sábio percebe e
compreende todas as coisas."

- Isaac Newton

Resumo

FRANCO, L. P. **Acoplamento quantum dot/complexos nitrosilos de Rutênio em transferência eletrônica vetorial e em análise de imagem. Aspectos químicos e biológicos relacionados à produção de óxido nítrico.** 2014. 185 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Química e Física Biológica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2014.

Oxido nítrico (NO) é uma molécula que participa de várias atividades fisiológicas no organismo, entre as quais incluem-se ação vasodilatadora e antitumoral. Entretanto sua resposta biológica é dependente da concentração, que quando alta apresenta citotoxicidade. Um fator limitante para sua aplicação em sistemas biológicos é seu curto tempo de meia vida no organismo, o que direcionou os estudos de complexos de rutênio-nitrosilo (RuNO) como doadores de NO. Complexos RuNO apresentam interesse especial devido suas propriedades termoestáveis e fotoquímicas. O uso da luz como um estímulo externo torna-se vantajoso pela capacidade de controlar-se a localização, o tempo de liberação da droga e a dosagem. A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido aplicada na terapia clínica contra o câncer. TFD depende da concentração de oxigênio para a produção de espécies reativas, o que é limitado em alguns tipos de tumores devido a hipóxia. Os Pontos quânticos (PQs), semiconductor nanocristalino, destacam-se como materiais funcionais com propriedade ópticas únicas dependentes do tamanho. Podem atuar como antenas na captação de luz e fotossensibilização de complexos rutênio-nitrosilo para a liberação de moléculas bioativas. Neste trabalho descrevemos a síntese e caracterização de diferentes PQs (CdS, CdSe e CdTe) utilizando diferentes agentes passivantes (ATG, TOPO e AMP) e a síntese e caracterização do complexo rutênio-nitrosilo *cis*-[Ru(NO)(4-amp)(bpy)₂]³⁺ (4-amp= 4-aminopiridina; bpy = 2,2' bipyridina. Estudos das propriedades fotofísicas e avaliação fotoquímica da interação entre PQ e RuNO foram realizados como também a avaliação da atividade citotóxica

desta associação sobre cultura de células de melanoma murino B16-F10. As medidas das propriedades fotofísicas demonstraram interação pela supressão da fluorescência analisada pela equação de Stern-Volmer. Pela determinação do número de sítios de ligação (≈ 2) e a constante de ligação (k_b) verificou-se que a interação entre as espécies apresentaram supressão da emissão em um gráfico não linear de Stern-Volmer resultante do processo de agregação entre os compostos. Os dados obtidos corroboram para o mecanismo proposto, demonstrando que cada PQ540 interage com duas moléculas de RuNO. Ainda observou-se que, sob irradiação na região do visível, em 532 nm, aumenta-se o número de mols de NO liberado de no mínimo 6 vezes quando irradiado na presença de PQs comparado à irradiação do complexo sozinho em solução. O processo de transferência eletrônica fotoinduzida foi proposto como o mecanismo fotoquímico para a liberação de NO, enquanto que o processo de transferência de energia mostrou-se desfavorável devido a não sobreposição entre os espectros de absorção do complexo nitrosilo e o espectro de emissão do PQ. As análises de imagem fluorescentes demonstraram o potencial dos PQs como marcadores celulares. As concentrações utilizadas nos experimentos não demonstraram toxicidade sobre as células de melanoma murino na ausência de luz. Porém quando irradiadas, apresentaram citotoxicidade parcial. Portanto, essa transferência pode ocorrer pela redução do NO^+ para NO^0 , seguida pela liberação de NO ou por fotoaquação e consequente fotoredução do nitrito em solução.

Palavras-chave: 1. Quantum dot 2. Complexos de Rutênio 3. Transf. Eletrônica

Abstract

FRANCO, L. P. **Coupling quantum dot / nitrosyl ruthenium complex in electron transfer vector and image analysis. CHemical and biological aspects related to production of nitric oxide..** 2014. 185 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physical and Biological Chemistry) - Faculty of Pharmaceutical Science of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2014.

Nitric oxide (NO) is a molecule involved in many physiological activities in human body among them include vasodilator and antitumoral. However, the biological response is concentration dependent and in high concentrations it causes cytotoxicity. A limiting factor for biological applications is the short half-life of NO in the body which has led to the research of nitrosyl ruthenium complexes (RuNO) as NO donors. RuNO complexes are of special interest because of their thermal stability and photochemical properties. The use of light as an external stimulus is advantageous as we can track the location, timing of drug release and dosage. Photodynamic therapy (PDT) has been used in clinical therapy for cancer treatment. PDT depends on oxygen concentrations for reactive oxygen species production what is limited in some types of tumors because of hypoxia. The Quantum dots (QDs), semiconductor nanocrystal, as functional materials, possess unique optical size-dependent properties. QDs can act as antennas in capturing light and photosensitizing ruthenium- nitrosyl complexes for release of bioactive molecules. In this work we describe the synthesis and characterization of different PQs (CdS, CdSe and CdTe) using different passivating agents (TGA, TOPO and MPA), the synthesis and characterization of ruthenium- nitrosyl complex *cis*-[Ru(NO)(4-amp)(bpy)₂]³⁺ (4-amp = 4-aminopyridine; bpy = 2,2'-bipyridine). The photophysical properties and photochemical evaluation from the interaction between QD and RuNO were done as well the cytotoxicity activity from this association on murine melanoma cell line B16-F10. Measurements of photophysical

properties show interactions by the quenching of fluorescence plotted with the Stern-Volmer equation. By determining the number of binding sites (≈ 2) and the binding constants (k_b) it was found that the interaction between the species presented an emission suppression in a nonlinear curve Stern- Volmer plot resulted by the aggregation process between both compounds. The data corroborates the proposed mechanism that QD540 interacts with two molecules of RuNO. It was also observed that under irradiation in the visible region, 532 nm, that moles of NO released increases at least 6 times when irradiated in the presence of QDs compared to the irradiation of the RuNO complex alone in solution. The process of photo induced electron transfer was proposed as the mechanism for photochemical release of NO while the process of energy transfer was deemed unfavorable due to no overlap between nitrosyl complex absorption and the QD emission spectrum. The fluorescence image analysis demonstrated the potential of QDs as cell markers. The concentrations used in the experiments have not shown toxicity on murine melanoma cells in the absence of light. However when irradiated, QDs exhibited partial cytotoxicity. Therefore, this transfer may occur by the reduction of NO^+ to NO^0 , followed by the release of NO or photoaquation and subsequent photoreduction of nitrite in solution.

Key-words: 1. Quantum dot 2. Ruthenium complex 3. Electronic transfer

Lista de Figuras

1.1	Esquema dos orbitais moleculares envolvidos na ligação de um metal com ligante nitrosil.	3
1.2	Representação da estrutura do <i>trans</i> -[RuCl ₄ (DMSO)(Im)] ⁻ , NAMI-A.	7
1.3	Estrutura do complexo K ₂ [Ru(Hedta)Cl] , 'scavenger' de NO. <i>Fonte: Fricker, 1997.</i>	8
1.4	Diagrama de Jablonski simplificado. <i>Adaptado: Stomayor (2008)</i>	13
1.5	Fluorescência dos PQs dependente do tamanho.	16
1.6	Representação das zonas de energias de diferentes materiais: isolante, condutor, semicondutor, ponto quântico e molécula. Adaptado de <i>Murphy and Coffre[50]</i>	16
1.7	Processos de fotoreações dos PQs.	17
1.8	Estrutura multifuncional de um PQ. Adaptado de GAO, (2005).	20
3.1	Rota sintética do complexo de rutênio <i>cis</i> -[Ru(NO ⁺)(bpy) ₂ (L)](PF ₆) ₃	25
3.2	Rota sintética do complexo de rutênio <i>trans</i> -[RuCl([15]aneN ₄)NO](PF ₆) ₂	27
3.3	Montagem esquemática utilizada na síntese do PQ CdTe-AMP.	33
3.4	Representação da reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais.	48
3.5	Equipamento utilizado para encapsulamento do PQ CdTe-AMP.	49
4.1	Espectro de absorção na região do UV-visível, em HCl 0,1 mol.L ⁻¹ , do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ 2,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	53
4.2	Espectro de absorção na região do UV-visível, em tampão fosfato (pH 7,4) do precursor complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(4-ampy)(bpy) ₂] ⁺ 2 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	54
4.3	Variação espectral do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ na ausência de luz em (A) solução aquosa em HCl 0,1 mol.L ⁻¹ após 24 h ; (B) em tampão acetato (pH 4) no período de 0-180 minutos.	55

4.4	Varição espectral do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ em solução aquosa de diferentes valores de pH.	56
4.5	Varição espectral do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ em (A) solução tampão acetato pH 4,0 e (B) em tampão fosfato pH 7,4, antes da irradiação e após irradiação em 447 nm por 5 minutos. . .	57
4.6	Cronoamperograma: liberação do NO do complexo [Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ⁺ em (A) tampão acetato (pH 4,0) e (B) solução tampão fosfato pH 7,4 após fotólise (λ_{exc} = 447 nm).	58
4.7	Espectro de absorção na região do UV-visível, em solução aquosa complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (4-ampy)(NO)] ³⁺ 2 x 10 ⁻⁵ M, antes (cinza) e após irradiação (preto) em 447 nm. Detalhe para a formação da banda em 485 nm.	58
4.8	Espectro na região do UV-vis do composto <i>trans</i> -[RuCl ₂ ([15]aneN ₄)] ⁺ 4,3 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , em solução em HCl 1,2 mol L ⁻¹	60
4.9	Espectro na região do UV-vis do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)] ²⁺ em solução tampão pH 7,4 na concentração 3,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	60
4.10	Espectro na região do UV-vis do complexo <i>trans</i> -[RuCl(H ₂ O)([15]aneN ₄)] ²⁺ (cinza) produto da fotólise do <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)] ²⁺ em 355nm (preto) na concentração de 3,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	61
4.11	Espectro na região do infravermelho dos precursores A) <i>cis</i> -[Ru(NO ₂) ₂ (bpy) ₂](PF ₆) e B) <i>cis</i> -[Ru(NO)(NO ₂)(bpy) ₂](PF ₆) ²⁺ obtida em pastilhas de KBr. . .	62
4.12	Fórmula estrutural do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ . Átomo Ru (verde escuro); N (azul); C (cinza); O (vermelho).	63
4.13	Fórmula estrutural do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)]Cl ₂ . Átomo Ru (verde escuro); N (azul); C (cinza); O (vermelho); Cl (verde claro). Espectro na região do infravermelho para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)]Cl ₂ (A) e para o seu precursor <i>trans</i> -[RuCl ₂ ([15]aneN ₄)]PF ₆ (B)	64
4.14	Espectros de (a) absorção na região do UV-vis e de (b) emissão do CdS-ATG em solução aquosa (λ_{ex} = 415nm; f_{ex} = f_{em} = 5 nm; temperatura ambiente).	66

4.15	Espectro de absorção na região do infravermelho do PQ CdS-ATG em pastilhas de KBr.	67
4.16	Difratograma de raio X do pó do PQ CdS-ATG.	67
4.17	Espectro de (a) absorção no UV-vis e de (b) emissão (λ_{ex} = 326 nm; f_{ex} = f_{em} = 5 nm) do CdSe/ZnS-TOPO em tolueno; temperatura ambiente.	71
4.18	Difratogramas de raio X do pó do PQ CdSe/ZnS-TOPO. Se (esfera), CdS(quadrado), CdOH (triângulo)	72
4.19	Imagem do balão de reação durante a síntese do PQ CdTe-MPA e de uma solução do PQ isolado, sob irradiação UV, λ_{ex} = 366nm.	73
4.20	Espectros de absorção no Uv-vis e de emissão (λ_{ex} = 320 nm; f_{em} = f_{ex} = 3 nm) do CdTe-AMP em solução aquosa.	74
4.21	Espectros de emissão (λ_{ex} = 320 nm; f_{em} = f_{ex} = 3 nm) do PQ CdTe-AMP no meio reacional (vermelho) e após precipitação seletiva; 1º precipitado laranja (azul) e 2º precipitado amarelo (preto), ambos em solução aquosa.	75
4.22	Espectros de excitação (λ_{em} = 540 nm) do PQ CdTe-AMP.	75
4.23	Espectro de absorção na região do infravermelho do PQ CdTe-AMP em pastilha de KBr.	76
4.24	Difratograma de raio X do PQ CdTe-AMP.	76
4.25	Modelo estrutural de uma superfície de nanocristal CdTe. Alguns átomos de Te foram substituídos por grupo tiol (S-R) (BORCHET, 2003).	77
4.26	Intensidade de área integrada versus absorbância do PQ CdTe-MPA.	78
4.27	Curva de decaimento de luminescência da solução aquosa do PQ540 livre (2.2×10^{-5} mol/L) e de sua solução análoga contendo cmplexo RuNO. (7.0×10^{-6} M) λ_{exc} = 460 nm. Medidas realizadas no Centro de caracterização óptica da UCSB.	79
4.28	Fotomicrografia eletrônica de transmissão do PQ CdTe-AMP. Barra de aumento 5 nm.	81
4.29	Espectros de absorção do CdTe-AMP sintetizado em meio orgânico (hexano). A direita: amostra sob luz UV.	82

4.30	Espectros de absorção em meio aquoso (direita) e espectro de emissão ($\lambda_{exc}= 540 \text{ nm}$) do PQ CdTe-AMP após troca de ligante.	83
4.31	Imagem do frasco contendo PQ CdTe-MPA após reação de troca de ligante. Esquerda: sob luz ambiente, direita: sob irradiação UV, $\lambda_{exc}= 366\text{nm}$	83
4.32	Difratograma de raio X pelo método do pó do PQ CdTe-AMP sintetizado em meio orgânico.	83
4.33	Microscopia eletrônica de transmissão do PQ CdTe-AMP em meio orgânico (hexano). Barra de aumento 20nm (A) e 10nm (B).	84
4.34	Espectro de absorção na região do UV-vis do PQ CdTe(AMP) em solução aquosa e encapsulado.	86
4.35	Espectros de emissão do (CdTe-MPA) em solução aquosa ($\lambda_{ex}= 320 \text{ nm}$) e encapsulado no lipossoma ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$), $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$, $f_{em}=f_{ex}= 5 \text{ nm}$	87
4.36	Disitribuição de tamanho do PQ540 encapsulado pelo lipossoma. . . .	87
5.1	Processos de fotoreações dos PQs. Modificado de [23, 51]	89
5.2	Evidência de uma reação de transferência de elétrons no sistema CdS-ATG e $\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$. Acompanhamento por espectroscopia eletrônica. (cinza pontilhado) espectro $\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$, (preto) solução após adição de PQ CdS-ATG e (tracejado) adição de HCl 1 mol/L.	92
5.3	Espectros de emissão do PQ CdS-ATG, em solução aquosa ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), e após sucessivas adições de uma solução aquosa complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ nas concentrações de $0,0$ a $13,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, monitorada em 520 nm ($h_{ex}= 410 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex}=f_{em}= 5 \text{ nm}$	92
5.4	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência do PQ1 CdS-ATG ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em 520 nm , na presença de diferentes concentrações do <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ ($h_{ex}= 410 \text{ nm}$).	93

5.5	Cronoamperograma de liberação do NO por redução: solução aquosa do complexo <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) antes e após adição do PQ CdS-ATG. * Adição do PQ.	94
5.6	Espectros de emissão do PQ CdTe-AMP em solução aquosa ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), e após sucessivas adições de uma solução aquosa do complexo <i>trans</i> -[RuCl([15]aneN ₄)NO] ²⁺ nas concentrações a - j: 0,0; 0,4; 8,0; 1,2; 1,6; 2,0; 2,3; 2,7; 3,3 e $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$	96
5.7	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência do PQ540 CdTe-AMP em solução aquosa ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), e após sucessivas adições de solução aquosa complexo <i>trans</i> -[RuCl([15]aneN ₄)NO] ²⁺ nas concentrações de 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,3 $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$	97
5.8	Espectros de absorção do PQ540 ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença do complexo <i>trans</i> -[RuCl([15]aneN ₄)(NO)] ²⁺ na concentração de $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	98
5.9	A: Cronoamperograma da solução do <i>trans</i> -[RuCl([15]aneN ₄)(NO)] ²⁺ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) antes (1) e após adição de 50 μL do PQ (2) e somente em água (3). B: Espectro de absorção do complexo [15]ane após adição de 100 μL de PQ540 sem liberação de NO	99
5.10	Espectros de emissão do PQ CdTe-AMP, em solução aquosa ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), e após sucessivas adições de uma solução aquosa complexo <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ em diferentes concentrações de a-x: 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 2,0; 2,3; 2,8; 3,0; 3,5; 4,2; 4,5; 5,0; 5,3 e 6,0; 6,4; 6,7; 7,0; 7,4; 7,8; 8,1; 8,5 e $8,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$	100

5.11	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência do PQ540 CdTe-AMP em solução aquosa ($5,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), e após sucessivas adições de solução aquosa complexo <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ nas concentrações de 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2,0 x 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ . Monitorada em 544 nm (λ_{ex} = 320 nm). Temperatura ambiente; $f_{ex}=f_{em}$ = 5 nm.	101
5.12	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência do PQ540 CdTe-AMP em solução aquosa ($5,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), e após sucessivas adições de solução aquosa complexo <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ nas concentrações de 0,0 a 8,8 x 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ . Monitorada em 544 nm (λ_{ex} = 320 nm). Temperatura ambiente; $f_{ex}=f_{em}$ = 5 nm.	102
5.13	Gráfico de Stern-Volmer modificado.	103
5.14	Espectro de absorção de <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (4-ampy)(NO)] ³⁺ ($5.2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações do PQ540 1-7: 0, 1,4; 2,8; 4,2; 5,5; 6,9 e 8,2 x 10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹ em solução aquosa. Solução estoque de PQ540 $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Detalhe: <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ e o ligante livre (AMP).	104
5.15	Espectro de absorção de <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ ($6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de concentração do ligante livre AMP ($0,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução tamponada pH 5,0 (solução tampão de acetato).	105
5.16	Proposta de reação entre PQ540 e complexo nitrosilo de rutênio.	106
5.17	Cronoamperograma de liberação do NO por fotólise (λ_{ex} = 532 nm): (preto) solução aquosa do complexo <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); (cinza) mistura do complexo nitrosilo de rutênio com CdTe-MPA ($10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), em solução aquosa.	107
5.18	Cronoamperograma de liberação do NO por fotólise (λ_{ex} = 532 nm), em solução aquosa, da mistura do complexo nitrosilo ($3,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) com diferentes concentrações PQ 540 (azul) $8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$; (rosa) $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; (vermelho) $3,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; (verde) $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$	108

5.19	Gráfico a esquerda: Espectro de absorbância do complexo nitrosilo <i>cis</i> -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ (preto), e fluorescência do PQ540 (Δ). A direita: Destaque da sobreposição entre as bandas dos compostos na região entre 450-550 nm.	108
5.20	Curva de decaimento de luminescência da solução aquosa do PQ540 livre (2.2 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹) e de sua solução análoga contendo complexo RuNO. (1,0 x 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) λ _{exc} = 460 nm. Medidas realizadas no Centro de caracterização óptica da UCSB.	109
5.21	Relação Log(F-F ₀)/(F-F _∞) x Log[RuNO] para determinação do número de sítios ligantes do PQ540.	110
5.22	Esquema ilustrativo das possíveis vias de transferência eletrônica intermolecular fotoinduzida pelo PQ no complexo de rutênio, em meio aquoso aerado.	111
5.23	Relação de intensidade de sinal em função do campo magnético de uma solução aquosa de PQ CdTe-MPA irradiada em 532 nm. Período de irradiação variou de 0 a 30 minutos conforme legenda.	112
5.24	Variação da intensidade do sinal de EPR em função do tempo de irradiação (minutos) em 532 nm da solução aquosa de PQ CdTe-MPA.	113
5.25	Proposta de interação entre PQ CdTe-MPA e complexos <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺ (esquerda do PQ) e <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)] ²⁺ (direita do PQ).	115
5.26	Sistema acoplado ao aparelho de NOA para os testes fotoquímicos: Direita para esquerda: (A) Fonte de excitação LED, (B) lente, (C) filtro de passagem, (D) obturador e (E) suporte para a mostra contendo cubeta de quartzo no formato Y e (F) agitador magnético.	117
5.27	Espectro de emissão LED azul à esquerda e filtro de passagem à direita.	117
5.28	Espectros de liberação de NO avaliado pelo NOA durante sua calibração. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das soluções. A direita: gráfico construído pelo número total de moles de NO ₂ ⁻ vs. área integrada de NO liberado.	118
5.29	Espectro de absorção do complexo de rutênio (6x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹) em tampão citrato pH 3,6 (cinza) e em pH 7,4 (preto).	119

- 5.30 Sobreposição das curvas de liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de lâmpada de mercúrio (365 nm) em tampão pH 3,6. Picos da esquerda para direita: correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 30 s, 60 s e 90 s finalizando com 5 minutos de irradiação. 120
- 5.31 Sobreposição dos espectros de liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED azul (475nm) em soluções tampão pH 3,6 e 7,4. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 30s, 60s, 5s e 10s. . 120
- 5.32 Sobreposição dos espectros de liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED verde (530nm) em soluções tampão de pH 3,6 e 7,4. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 30s, 60s, 90s e de 5 minutos apenas realizado em pH 7.4. 121
- 5.33 Liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED em (λ_{exc} 530 nm). Picos 1-4: 1) solução tamponada pH 3,6 de RuNO ($10^{-4}mol.L^{-1}$) sob irradiação de luz por 30s; 2)pico resultante abertura do sistema para adição de 100 μ L de PQ ($3 \times 10^{-7}mol.L^{-1}$) (pico desconsiderado); 3) mesma solução RuNO+PQ490 sob irradiação por 30s; 4) repetição do procedimento descrito no pico 3 123
- 5.34 Liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED (λ_{exc} 530 nm) em solução tamponada pH 7,4 de RuNO ($10^{-4} mol.L^{-1}$). Picos da esquerda para direita correspondem às repetições das soluções de RuNO sob os respectivos tempos de irradiação: 2, 5, 10, 30 e 60 s. . . 124
- 5.35 Liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED (λ_{exc} 530 nm) em solução tamponada pH 7,4 de RuNO ($10^{-4} mol.L^{-1}$) na presença de PQ540. Picos da esquerda para direita correspondem às repetições de irradiação das respectivas soluções de RuNO : 2, 5, 10, 30 e 60 s. 124

5.36	Espectro de liberação de NO irradiação de LED ambar (λ_{exc} 560 nm) em tampão 7,4. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 2, 5, 10, 30 e 60s. O símbolo (*) refere-se ao momento da abertura do sistema para injeção do PQ600. Na sequência, as irradiações nos tempos de 2, 5, e 10s.	125
6.1	Efeito da mobilidade e intensidade luminescente das bandas do fluoróforo PQ540 e de seu conjugado PQ540-RuNO. A, B e C correspondem às soluções aquosa de PQ ($3,5 \times 10^{-6}$ M); mistura de PQ-RuNO($1,4 \times 10^{-3}$) e o complexo sozinho ($2,5 \times 10^{-3}$) respectivamente.	129
6.2	Bandas do fluoróforo PQ e PQ-RuNO sob luz branca (A) e luz UV (B). Direita para esquerda: solução aquosa de PQ; mistura de PQ em concentrações	130
6.3	Microscopia de FLIM das células B16-F10 incubadas com PQ540 por 4h. A) amostra controle sem PQ540; B) célula contendo PQ540; C e D imagens em diferentes angulos, XZ e ZY respectivamente.	131
6.4	Diferentes Tempos de vida da luminescência dos PQs no sistema biológico. Figura interna indica região correspondente para cada tempo de vida: interior da célula -Azul (A); parte externa da célula-Preto (P) e porção não celular-Vermelho (V).	132
6.5	Imagem de células B16-F10 incubadas com as nanopartículas PQ (1) e mistura PQ-RuNO (2) por 4 h. (A) Imagem em campo claro sem luz de excitação λ_{exc} 490 nm; (B) espécie fluorescente internalizada e células controle (C) sem PQ540. Barra de escala 20 μ m.	132
6.6	Imagem de células B16-F10 incubadas com as nanopartículas PQ540 por 3 h. (A) Imagem em campo claro, sem luz de excitação; (B) núcleo corado com Hoechst, sob filtro UV; (C) espécie fluorescente internalizada utilizando filtro GFP (D) sobreposição das imagens B e C.	133

- 6.7 Imagens analisadas em Microscópio Biológico invertido binocular durante os experimentos de viabilidade celular. A. Células melanoma murino, linhagem B16-F10. B. Células melanoma, linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com MTT (formação de cristais de formazan de coloração púrpura). C. melanoma murino, linhagem B16-F10 após tripsinização. 135
- 6.8 Efeito do PQ540 na viabilidade celular de células tumorais B16-F10 avaliado por MTT. As células foram tratadas e pré-incubadas por 4 horas e 24 horas com PQ540 nas concentrações de 10^{-10} M; 10^{-9} M e 10^{-8} M. Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle . . . 136
- 6.9 Efeito do PQ540 e complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ na viabilidade celular de células tumorais B16-F10. As células foram tratadas e pré-incubadas por 4 horas com ambos compostos separadamente e irradiados a 527 nm na dose de 4 J/cm^2 . Os dados apresentados representam as médias S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle. 137
- 6.10 Efeito citotóxico do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ sobre linhagens de células tumorais B16-F10, na ausência e presença do PQ540. As células tratadas foram irradiadas (4 J/cm^2) após 4 h de incubação com os compostos e a viabilidade celular avaliada após 24 horas do tratamento. Os dados apresentados representam as médias S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle. 138

6.11	Viabilidade celular do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ sobre linhagens de células tumorais B16-F10, na ausência e presença do PQ540 em diferentes doses de irradiação após 4h de incubação com os compostos e a viabilidade celular avaliada após 24 horas do tratamento. Os dados apresentados representam as médias S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle. . . .	139
6.12	Porcentagem de viabilidade celular de células B16-F10 após 24h de incubação na presença dos compostos em diferentes porcentagens (v/v).140	
7.1	Representação da estrutura do $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$	155
7.2	Representação da estrutura do $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}([15]\text{aneN}_4)]\text{Cl}_2$. . .	155
7.3	Representação da estrutura do Ácido Tioglicólico	155
7.4	Representação da estrutura do Ácido Mercaptopropiônico	156
7.5	Representação da estrutura do TOPO	156
7.6	Representação da estrutura do TEMPO	156

Lista de Tabelas

1.1	Comparação entre energia vibracional na região do infravermelho para as espécies NO^+ , NO^0 e NO^-	4
3.1	Reagentes utilizados	23
4.1	Resultados encontrados na análise elementar dos compostos nitrosilos.	52
4.2	Resultados de análise de espectros na região do UV-visível para o complexo de rutênio em solução aquosa.	61
4.3	Atribuição de algumas das bandas de absorção na região do infravermelho para o complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{NO}^+)(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_3$	63
4.4	Energia vibracional do NO^+ dos complexos rutênio-nitrosilos.	64
4.5	Distribuição do tamanho das partículas dos PQs sintetizados.	69
4.6	Valores de máximos de absorção no UV-vis, excitação e emissão observados nos espectros de PQ1 e PQ2.	69
4.7	Relação de tamanho dos PQs CdTe-AMP e técnica utilizada.	81
5.1	Valores de constante de velocidade e meia vida.	106
5.2	Constantes K_{SV} para os experimentos de supressão	113
5.3	Relação de rendimento quântico de NO resultante da reação fotoquímica de diferentes soluções do complexo de rutênio submetidos a 30s de irradiação. Os Resultados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 3 leituras diferentes no mesmo tempo de irradiação.	122
5.4	Relação de pico mols de NO resultante da reação fotoquímica de diferentes soluções tampão citrato (pH 3,6) e fosfato (pH 7,4) do complexo de rutênio submetidos a 30s de irradiação.	126

Lista de Abreviaturas

4-ampy	4-Aminopiridina
[15] <i>aneN</i> ₄	1, 4, 8, 12 - tetraazaciclopentadecano
bpy	2,2 - bipyridina
EPR	Electron paramagnetic resonance
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
IL	Transição intraligante
IV	Infravermelho
LED	Light Emitted Diode
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)
NPs	Nanopartículas
PMT	Photo multiplier tube
PQ	Pontos quânticos
QD	Quantum dots
TCLM	Transição de Carga Ligante Metal
TCML	Transição de Carga Metal Ligante
TEMPO	2,2,6,6 - tetrametilpiperidina-1-oxil
TOP	Ácido tri-octinilfosfina
TOPO	Ácido tri-octinilfosfinóxido
UV-vis	Ultravioleta-visível

Lista de Símbolos

δ	Frequência de deformação angular
ε	Coefficiente de absorvidade molar ($\text{mol cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$)
λ	Comprimento de Onda (nm)
ν_{ass}	Frequência de estiramento assimétrico
ν_s	Frequência de estiramento simétrico
$\nu_{(NO)}$	Frequência de estiramento do óxido nítrico
ϕ	Rendimento quântico
ϕ_{NO}	Rendimento quântico do óxido nítrico
ϕ_{Fe}	Rendimento quântico do ferro

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xxiv
Lista de Abreviaturas	xxv
Lista de Símbolos	xxvi
1 Introdução	1
1.1 Aspectos gerais do Óxido Nítrico	1
1.2 Propriedades físico-químicas da molécula NO	3
1.3 Complexos Metálicos	5
1.4 Complexos nitrosilos de rutênio	7
1.5 Avanços e aplicações dos complexos nitrosilos de rutênio	8
1.6 Introdução à Fotoquímica	12
1.7 Pontos Quânticos (PQs) ou Quantum Dots (QDs)	15
2 Objetivos	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 Experimental	23
3.1 Síntese e caracterização dos complexos nitrosilos	25
3.1.1 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (bpy) ₂].2H ₂ O	25
3.1.2 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂) ₂ (bpy) ₂].H ₂ O	26
3.1.3 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(NO ₂) ₂ (bpy) ₂](PF ₆) ₂	26
3.1.4 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(4-ampy)(bpy) ₂](PF ₆)	26
3.1.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂](PF ₆) ₃	27
3.1.6 Síntese do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)](PF ₆) ₂	27
3.1.7 <i>trans</i> -[RuCl ₂ ([15]aneN ₄)]PF ₆	27

3.1.8	Síntese do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)](PF ₆) ₂	28
3.2	Caracterização do complexos de rutênio	28
3.2.1	Medidas de pH e Espectroscopia na região do infravermelho	28
3.2.2	Análise Elementar	29
3.2.3	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível	29
3.3	Síntese de Pontos Quânticos (PQs)	29
3.3.1	Síntese do PQ Sulfeto de Cádmio - (core: CdS)	30
3.3.2	Síntese do PQ Seleneto de cádmio revestido com sulfeto de zinco (core/ <i>shell</i> : CdSe/ZnS)	31
3.3.3	Síntese do PQ Telureto de cádmio (core: CdTe)	32
3.3.3.1	Síntese CdTe em solução aquosa (PQ540)	32
3.3.3.2	Precipitação Seletiva do PQ CdTe-AMP	33
3.3.3.3	Síntese CdTe em meio orgânico (PQ600)	34
3.3.3.4	Troca de ligante (Exchange)	34
3.4	Caracterização dos PQs	35
3.4.1	Espectroscopia na região do ultravioleta - visível	35
3.4.2	Espectroscopia de Fluorescência	35
3.4.3	Medidas de Tempo de vida	35
3.4.4	Rendimento Quântico de fluorescência para o PQ CdTe-AMP	36
3.4.5	Espectroscopia na região do infravermelho	36
3.4.6	Cálculo do tamanho dos PQs	36
3.4.7	Difração de raio X	37
3.4.8	Determinação do tamanho e da distribuição do tamanho por espalhamento de luz	37
3.4.9	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	38
3.4.10	Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	38
3.5	Análise Fotoquímica	38
3.5.1	Determinação amperométrica do NO liberado	39
3.5.2	Determinação de NO liberado utilizando Analisador de Óxido Nítrico (NOA)	39
3.5.3	Calibração do NOA	40

3.5.4	Medida da intensidade de luz incidente (I_s)	41
3.5.5	Procedimento para a actinometria	41
3.5.6	Cálculo de I_s utilizando-se ferrioxalato de potássio	42
3.5.7	Cálculo do rendimento quântico (ϕ)	43
3.6	Estudo de cinética na interação PQ e o complexo nitrosilo	43
3.7	Análise da Interação entre os compostos pela equação de Stern-Volmer	44
3.8	Análise da Interação entre os compostos por eletroforese	44
3.9	Ensaio biológicos e análise de Imagem	45
3.9.1	Estudos <i>in vitro</i>	45
3.9.2	Material biológico ou material celular	45
3.9.3	Meios de Cultivo Células melanoma murino (B16-F10)	45
3.9.4	Ensaio de citotoxicidade dos compostos	46
3.9.5	Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT	46
3.9.6	Teste de internalização celular e posterior análise por espectroscopia de absorção atômica em células B16-F10.	47
3.9.7	Análise de Imagem por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Confocal	48
3.9.8	Encapsulamento do CdTe-AMP em lipossoma.	49
4	Síntese e Caracterização dos Complexos nitrosilos de rutênio e Pontos Quânticos	50
4.1	Síntese dos complexos nitrosilo de rutênio	50
4.1.1	<i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂](PF ₆) ₃	50
4.1.2	<i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)] ²⁺	51
4.2	Caracterização dos complexos de rutênio	51
4.2.1	Análise Elementar	51
4.2.2	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺	51
4.2.3	Estudo da estabilidade química e fotoquímica dos compostos nitrosilos discutidos neste trabalho	54
4.2.3.1	<i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)]Cl ₂	59
4.2.4	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	61

4.3	Caracterização do PQ Sulfeto de Cádmio - (núcleo: CdS)	65
4.3.0.1	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível	65
4.3.0.2	Espectroscopia Infravermelho	66
4.3.0.3	Difração de Raio X	66
4.3.0.4	Modificações na síntese de PQ CdS	67
4.3.1	Caracterização do PQ de seleneto de cádmio revestido com sulfeto de zinco - (núcleo/concha: CdSe/ZnS).	70
4.3.1.1	Espectroscopias na região do UV-vis e de fluorescência	70
4.3.1.2	Difração de raio X	71
4.3.2	Síntese e caracterização do PQ de telureto de cádmio - (núcleo: CdTe-AMP).	73
4.3.2.1	Espectroscopias na região do UV-vis e de fluorescência	74
4.3.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho	74
4.3.2.3	Difração de raio X	76
4.3.2.4	Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)	77
4.3.2.5	Tempo de vida (τ)	79
4.3.2.6	Determinação do tamanho de partícula	80
4.3.2.7	Espectroscopias na região do UV-vis , fluorescência e Difração de Raio X (CdTe-AMP : Reação em meio orgânico)	82
4.3.2.8	Difração de Raio X	82
4.3.2.9	Tamanho da partícula	84
4.4	Encapsulação do PQ CdTe-AMP em lipossomas	85
5	Estudo Fotofísico e Fotoquímico da interação entre PQs e complexos nitrosilo de rutênio	88
5.1	PQs CdS-ATG e complexos de Rutênio	91
5.1.1	Avaliação da liberação de NO fotoinduzida pelo PQ CdS-ATG	93
5.2	Interação PQ CdTe-MPA com os complexos nitrosilo de rutênio . . .	95
5.2.1	PQ CdTe-MPA meio aquoso - PQ540 e complexo nitrosilo <i>trans</i> -[RuCl(NO)([15]aneN ₄)]Cl ₂	95

5.2.2	Avaliação da liberação de NO fotoinduzida pelo PQ CdTe-AMP e complexo <i>trans</i> -[RuCl([15]aneN ₄)(NO)] ₂₊	98
5.2.3	PQ CdTe-MPA meio aquoso - PQ540 e complexo nitrosilo <i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺	99
5.2.3.1	Estudo de cinética na interação PQ Ru-NO	106
5.2.4	Avaliação da liberação de NO fotoinduzida pelo PQ540 ao complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (4-ampy)NO] ³⁺	106
5.2.5	Estudos Fotoquímicos quantitativos	116
5.2.5.1	Avaliação Fotoquímica do complexo de Rutênio na ausência de PQs	119
5.2.6	Avaliação Fotoquímica do complexo de Rutênio na presença de PQs	122
6	Análise de Imagem e avaliação da citotoxicidade em células tumoriais	128
6.1	Análise da Interação entre os compostos por eletroforese	128
6.2	Análise de imagem por Microscopia FLIM	129
6.3	Análise de Imagem por Microscopia de fluorêscencia Confocal	131
6.3.1	Teste de internalização celular e posterior análise por espectroscopia de absorção atômica em células B16-F10.	134
6.4	Ensaio de Citotoxicidade	134
7	Considerações Finais e Perspectivas Futuras	142
	Referências Bibliográficas	144
	Anexos	155
	Estruturas Químicas	155

1 *Introdução*

1.1 Aspectos gerais do Óxido Nítrico

O Óxido nítrico (NO) é uma molécula que tem sido amplamente estudada nos últimos anos devido sua intrigante função na química de sistemas biológicos e suas possíveis aplicações terapêuticas [1, 2]. Inicialmente, o que se conhecia sobre o óxido nítrico era sua ocorrência nos subprodutos da queima de combustíveis fósseis, sua contribuição para a chuva ácida e para a destruição da camada de ozônio [3].

Em 1981, Green e colaboradores relataram a produção de óxidos de nitrogênio no organismo humano e o aumento na sua concentração em condições inflamatórias [4]. Desde então, estudos sobre essa molécula foram intensificados abrangendo suas diversas áreas de atuação como na resposta da pele a certos estímulos externos como calor, irradiação ultravioleta, infecção e cicatrização [5]. Uma das áreas de pesquisa que mais se desenvolveu nas ultimas décadas investiga a ação vasodilatadora do óxido nítrico no organismo [6, 7].

Importantes contribuições realizadas no estudo da bioquímica do NO mudaram o conceito que se tinha sobre esta molécula. De acordo com Ignarro e colaboradores[3] o NO é produzido a partir da conversão do aminoácido L-arginina por um mecanismo enzimático, que envolve uma família de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintase (NOS). Foi reportado ainda que esta molécula endógena é envolvida em vários processos biológicos, tais como na vasodilatação , na inibição da agregação plaquetária e comunicação neural. Além disso, foi verificado efeito citotóxico do óxido nítrico após ser eliminado por macrófagos ou por outras células do sistema de defesa de seres vivos.

A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro biológico, reunindo propriedades como neurotransmissor, mediador constitutivo induzível e agente citotóxico. Participa na regulação da pressão sanguínea, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões [8, 1, 9].

A produção de NO pelas isoformas da enzima NOS, como a enzima constitutiva Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOSe) e Óxido Nítrico Sintase Neural (NOSn), ocorre em baixa concentração e de maneira constante [9]. A enzima Óxido Nítrico Sintase (NOSi), isoforma indutível, pode ser expressa em uma variedade de células em resposta à estímulos inflamatórios como por lipossacarídeos (LPS) de bactérias. A superprodução de NO por macrófagos e outras células brancas ativadas por citocinas pode causar complicações como súbita queda da pressão arterial, disfunção renal e choque séptico [10]. Conforme observado, a concentração intracelular de NO deve ser controlada para que não ocorra outras reações paralelas proveniente da oxidação do NO quando em altas concentrações. Essa concentração é controlada pelo consumo mitocondrial e por sequestrantes *scavengers* como a oxihemoglobina, de modo a prevenir a formação de espécies radicalares reativas que podem desnaturar biomoléculas [9].

Baseado neste fato, NO não depende de transportadores específicos nem de canais de passagem intracelulares, difundindo-se pela célula tanto em meio hidrofílico como lipofílico [1].

É importante ressaltar que a produção não-enzimática do NO pode ocorrer nos sistemas biológicos por redução do nitrito em meio altamente redutor, situação esta comum em estados patológicos [11].

A atividade biológica da molécula de NO está diretamente relacionada à sua concentração e tipo celular. Dependendo do tipo de célula a concentração de NO pode apresentar tanto efeito tumorigênico quanto tumoricida. Este último é favorecido quando a concentração de óxido nítrico no meio celular é elevada [12].

Baseado no conhecimento adquirido durante as últimas décadas, o papel do óxido nítrico pode ser dividido em duas vertentes, como sinalizador, comunicando-se célula-célula e como um agente efetor do sistema imune, apresentando citotoxicidade ou atuando como citoprotetor. Por isso, para melhor compreensão da ação fisiológica desta molécula, deve-se conhecer suas propriedades físicas e químicas.

1.2 Propriedades físico-químicas da molécula NO

Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio, de massa molar 30,01, é gás lipofílico, incolor cuja a solubilidade em meio aquoso é $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ [13].

O comprimento de ligação dessa molécula é 1,15 Å, [13]. É uma molécula diatômica, paramagnética de configuração eletrônica $(\sigma_{1s})^2(\sigma_{1s}^*)^2(\sigma_{2s})^2(\sigma_{2s}^*)^2(\sigma_{2p}, \pi_{2p})^6(\pi_{2p}^*)^1$.

Apesar de ser um radical livre, NO não reage de imediato com a maioria das moléculas orgânicas, porém reage rapidamente com radicais orgânicos que já possuam um elétron desemparelhado. Isto se deve, em parte, ao NO possuir um elétron desemparelhado no orbital π^* antiligante (π^*), localizado entre o oxigênio e nitrogênio do NO [11].

A ligação entre o metal e a molécula de óxido nítrico é estável devido à doação de densidade eletrônica dos orbitais do tipo σ do NO para o metal. Em alguns casos e dependendo do íon metálico, além da ligação σ , há uma doação de densidade eletrônica dos orbitais d do metal para o orbital π^* do NO ($d\pi(M) \rightarrow \pi^*(NO)$), constituindo-se em uma retrodoação (Figura 1.1).

Figura 1.1: Esquema dos orbitais moleculares envolvidos na ligação de um metal com ligante nitrosil.

A interação entre a molécula de NO e o metal (M) pode ocorrer tanto pela ligação através do átomo de nitrogênio como pelo átomo de oxigênio, originando as formas nitrosilo ou isonitrosilo, respectivamente [14]. Através da espectroscopia na região do infravermelho os complexos nitrosilos podem ser caracterizados pela visualização da banda de estiramento do NO $\nu(NO)$. Essa energia vibracional é influenciada pela intensidade da retrodoação que quanto maior, menor é a força

da ligação entre o átomo de nitrogênio e de oxigênio da molécula de NO e por consequência maior número de onda (cm^{-1}).

Os valores da energia vibracional para o óxido nítrico em seus três possíveis estado de oxidação estão relacionados na Tabela 3.1 porém existem vários fatores que afetam a intensidade da retrodoação, como o efeito eletrônico dos ligantes e a estrutura do complexo (efeito estéreo).

	NO^+	NO^0	NO^-
ν (NO) (cm^{-1})	2377	1875	1470

Tabela 1.1: Comparação entre energia vibracional na região do infravermelho para as espécies NO^+ , NO^0 e NO^- .

O processo de oxidação ou redução do óxido nítrico gera diferentes espécies. A espécie NO^+ (íon nitrosônio) é formada pela retirada do elétron desemparelhado no orbital π^* [2], e a espécie NO^- (ânion nitróxido), que é formada pela adição de um elétron ao orbital π^* [8].

O comportamento químico da molécula de NO em meio biológico é bastante complexo, seus efeitos biológicos podem ser subdivididos segundo as reações químicas específicas dependentes de NO: efeitos diretos e efeitos indiretos. Efeitos diretos são causados pela interação do NO com biomoléculas e metalo enzimas do meio enquanto que os efeitos indiretos são originados pela reação do NO com o oxigênio (O_2) ou ânion superóxido (O_2^-) na formação de espécies radicalares ERONs.

A atividade biológica do NO é dependente da sua concentração, e este tem como fator limitante o seu curto tempo de vida podendo reagir com outras moléculas que contenham um elétron desemparelhado, consequentemente há necessidade iminente do desenvolvimento de compostos que possam controlar a sua liberação. Esse controle abrange tanto no aspecto de suprimento de NO, servindo como fonte de NO, como na remoção deste quando em excesso. Compostos de coordenação são indicados como promissores candidatos a este fim, pois além de produzir complexos estáveis, estes compostos liberam NO por meio de estímulos químicos, eletroquímicos e fotoquímicos [15, 16, 17, 18, 19].

1.3 Complexos Metálicos

O uso dos metais na medicina vem sendo praticado há aproximadamente 5000 anos. Os egípcios usavam cobre para esterilizar a água 3000 anos a.C. e o ouro era empregado na fabricação de medicamentos na Arábia e na China há 3500 anos, mais em razão da natureza preciosa do metal do que de suas propriedades medicinais [20]. Dentre alguns usos dos metais na medicina encontram-se o alumínio, bismuto, os alcalino terrosos como cálcio e magnésio, na forma de carbonatos, usados como antiácidos, sendo alguns deles usados desde a antiguidade e idade média [21].

A Química Inorgânica Medicinal teve suas origens nos trabalhos de Paul Ehrlich, prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1908. Fundador da quimioterapia, ele introduziu as primeiras idéias sobre as relações estrutura-atividade e o conceito de índice terapêutico, utilizando complexos metálicos de arsênio. Alfred Werner, considerado o pai da Química de Coordenação, pelo desenvolvimento de sua teoria que explicou a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos de cobalto, foi o primeiro químico inorgânico a receber um prêmio Nobel de Química em 1913 [22].

Complexos metálicos são compostos que apresentam um ou mais íons metálicos de transição coordenados a um ou mais ligantes e podem ser classificados como substâncias endógenas (como metaloproteínas) ou exógenas. Os complexos metálicos exógenos são administrados ao organismo de modo controlado, como em casos de produtos farmacêuticos (droga) ou de forma não controlada, como pelas vias aéreas (poluentes) [23].

A atividade farmacológica dos compostos de coordenação, em geral, depende ou do metal, ou do ligante ou da interação de ambos. Entre outros exemplos de atividade farmacológica, pode-se citar antidiabéticos utilizando vanádio, zinco e cobre, o carbonato de lítio no tratamento do transtorno bipolar; os compostos de platina e rutênio, utilizados no tratamento de câncer, assim como os compostos de ouro utilizados no tratamento de artrite [24]. Em muitos casos, o mecanismo de ação de certas metalo-drogas não é bem conhecido. Porém, um bom entendimento destes mecanismos pode propiciar um aumento na eficiência das metalo-drogas e uma diminuição de efeitos indesejados.

Nos últimos anos ocorreu um aumento no estudo dos metais e de seu papel no organismo. O papel das metaloproteínas na saúde humana e nas doenças tem direcionado estudos em direção à Química Bioinorgânica.

Os metais possuem uma característica que os torna importantes como componentes (funcionais e estruturais) dos seres vivos, a sua propensão em perder elétrons formando íons com cargas positivas enquanto as biomoléculas como proteínas e DNA são ricas em elétrons. Essa atração entre cargas opostas conduz a uma interação entre íons metálicos exógenos com moléculas biológicas, ligantes naturais no organismo que desempenham diferentes funções [23]. Há inúmeras possibilidades de formar estruturas diferentes devido aos variados números de coordenação. Essa diversidade é acrescida pela associação de diferentes metais, ligantes e tipos de reações.

Desde o século *XIX* alguns complexos metálicos liberadores de óxido nítrico nitrosilo continuam sendo utilizados com aplicação médica, dentre eles o nitroprussiato de sódio, $Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$, sintetizado a partir do azul da prússia, constitui um potente vasodilatador administrado via intravenosa em paciente no caso de emergência hipertensiva que carrega um ligante nitrosilo [23]. O uso destes compostos encontra, às vezes, limitado devido às reações secundárias àquela desejada, que no caso nitroprussiato de sódio, é a liberação de cianeto (CN^-).

No intuito de desenvolver novas alternativas de doadores de NO, houve um aumento na pesquisa de complexos nitrosilos que atuem promovendo uma liberação de NO a partir de um estímulo específico. A redução química e a eletroquímica são exemplos de estímulos externos, pois o ligante nitrosilo perde sua afinidade pelo metal ao ser reduzido a NO^0 .

Metalodrogas, cujo centro metálico é o rutênio, apresentam boa aplicação clínica, devido à baixa toxicidade pelo metal. Alguns autores acreditam que devido às semelhanças das propriedades físico-químicas do rutênio com as do ferro, o organismo protege-se dos efeitos causados pelo seu excesso através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro como a transferrina e a albumina [25]. Entre os diversos metalofarmacos de rutênio merece destaque o composto $[RuCl_4(DMSO)(Im)]^-$, sendo Im = imidazol, denominado NAMI-A (Figura 1.2) é um exemplo de complexo de rutênio com atividade antitumoral cujos ensaios se

encontram na fase pré-clínica e toxicológica [26].

Figura 1.2: Representação da estrutura do $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]^-$, NAMI-A.

Haja visto que a toxicidade do metal também está relacionada com o seu estado de oxidação, pode-se afirmar que um outro fator da baixa toxicidade do rutênio é sua habilidade de atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico. Provavelmente, isto ocorra devido às reações redox causadas pela enzima citocromo oxidase, ou pela glutatona ou pelo ascorbato [25].

1.4 Complexos nitrosilos de rutênio

A molécula de NO tem se mostrado uma das moléculas mais versáteis presente em todos os seres vivos, apresentando uma diversidade de funções biológicas. Quando em altas concentrações torna-se prejudicial à saúde, podendo reagir com oxigênio ou supersóxido formando ERONs que danificam lipídeos, proteínas e DNA. Por isso estratégias terapêuticas têm surgido a fim de controlar seus níveis, que dependendo da patologia podem estar aumentados ou diminuídos.

Para casos em que o objetivo é diminuir a concentração de óxido nítrico no organismo, desenvolveu-se uma série de metalo-drogas, chamadas de "*scavengers*", que formam um complexo estável com o NO, removendo-o do meio. Como exemplo destes complexos, pode-se citar $\text{K}_2[\text{Ru}(\text{Hedta})\text{Cl}]$ (Figura 1.3[10]). A redução dos níveis de NO foi resultante da ação sequestrante do NO pelo complexo e não por ação inibitória da enzima NOSi. O NO presente no meio coordena-se ao rutênio substituindo a molécula de cloreto e o novo complexo formado seria eliminado pelo organismo.

Figura 1.3: Estrutura do complexo $K_2[Ru(Hedta)Cl]$, 'scavenger' de NO. Fonte: Fricker, 1997.

Em situações que necessitam altas concentrações de NO, uma estratégia é utilizar compostos que sejam termicamente estáveis e fotoquimicamente ativos, ou seja, liberam NO quando submetidos a algum tipo de indução fotoquímica [27].

No intuito de contribuir no estudo fotoquímico e desenvolvimento de novos compostos para aplicação biológica (atividade vasodilatadora e antitumoral), o nosso grupo BicLab (Laboratório de Bioinorgânica), vem estudando complexos nitrosilos que apresentem liberação de NO em meio aquoso quando submetidos à irradiação luminosa e/ou redução eletroquímica [16, 18, 17, 19, 28, 29].

1.5 Recentes avanços e aplicações dos complexos nitrosilos de rutênio desenvolvidos no grupo coordenado pelo prof. Roberto S. da Silva

O grupo de pesquisa BicLab prioriza os estudos na área de Bioinorgânica, com enfoque no desenvolvimento de novos complexos rutênio nitrosilos doadores de NO e o estudo do comportamento desses em meio biológico. Desde 2001, este grupo tem se dedicado às atividades de síntese e ao estudo das propriedades físico-químicas e fotoquímicas dessas novas espécies [16, 18, 17, 30, 19, 28]. Inicialmente, os estudos basearam-se em ligantes polipiridínicos, um dos ligantes mais estudados nas últimas décadas devido sua propriedade diversificada como estabilidade química, capacidade de redução e oxidação e reatividade no estado excitado. Esses ligantes apresentam orbitais σ doadores localizados nos átomos de nitrogênio e orbitais π doadores e

π^* receptores delocalizados nos anéis aromáticos. Quando no estado excitado, esse complexo promove um elétron do orbital $d\pi$ do metal para o orbital π^* do ligante resultando numa transferência de carga metal ligante (TCML) [31]. Esse processo de transição pode ser aplicado em diversas áreas de estudo como fotoquímicos, fotofísicos, eletroquímicos e luminescência (transferência de energia e / ou elétrons) [32]. A substituição por outros ligantes no metal pode alterar a reatividade da molécula final.

Embora, os estudos físico-químicos apresentem um papel fundamental no entendimento das propriedades desses compostos, a importância do óxido nítrico nos processos fisiológicos direcionou o grupo ao estudo da atividade biológica dos complexos nitrosilo de rutênio doadores de NO. O primeiro composto nitrosilo a ser avaliado biologicamente foi o complexo macro cíclico *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO](PF₆)₂, ([15]aneN₄ = 1,4,8,12-tetraazociclopentadecano) que exibiu atividade vasodilatadora promovida pela liberação de NO por processo redutimétrico [30]. Vários estudos têm sido direcionados para a elucidação dos mecanismos de ação deste complexo na vasodilatação e resultaram na publicação de 13 artigos científicos. Posteriormente, foi observado que a atividade vasodilatadora demonstrou ser dependente da concentração de noradrenalina, sendo que esta relação foi favorecida pela intermediação do grupamento fosfato devido a formação de uma espécie supramolecular entre a noradrenalina e o *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO](PF₆)₂ com o ânion HPO₄²⁻ atuando como ponte [33].

O complexo *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO](PF₆)₂ também se mostrou efetivo em testes in vivo contra a Doença de Chagas, parasitemia causada pela picada de um tripanossomatídeo que debilita o sistema imune do paciente. O tratamento mostrou-se eficaz, promovendo a cura em cerca de 90 % dos animais, quando a droga de referência benzonidazol foi associada ao composto nitrosilo. [6].

Outro importante ligante utilizado em complexos Ru(II) polipiridínico é o ligante tridentado terpiridina. As propriedades fotoquímicas e farmacológicas dos seguintes complexos [Ru(L)(tpy)NO]³⁺ L = bpy (2,2-bipiridina), NH.NHq (quinonodiimina) e NH₂.NH₂cat (o-fenilenodiamina) foram estudadas obtendo-se os seguintes rendimentos quânticos de liberação de NO, 0,14; 0,47 e 0,46 mol einstein⁻¹ para L = bpy, NH.NHq e NH₂.NH₂cat, quando irradiado em 355 nm e

0,0065 mol einstein⁻¹ e quando sob irradiação em 532 nm para o complexo [Ru(NH . NHq)(terpy)NO]³⁺. Foi observado que, assim como o macrociclo, o complexo [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ também apresentou importante ação vasodilatadora em tecido de aorta de ratos.

As fotoreações envolvidas em compostos de coordenação podem ocorrer de diferentes formas dentre as quais é possível citar: fotossustituição, fotoaquação, fotoredox e transferência de elétron e/ou de energia [34].

De modo geral, o mecanismo proposto para a liberação fotoquímica de NO dos complexos nitrosilos de rutênio está relacionado com a fotolabilização do ligante seguido da coordenação de uma molécula de solvente (fotoaquação) conforme as equações abaixo:

Entretanto, um dos problemas da aplicação de complexos nitrosilos de rutênio em meio fisiológico é que este converte-se ao isômero nitrito, resultante do ataque nucleofílico da espécie hidroxila junto ao grupo nitrosil (Equações abaixo) [35]).

Este poderia ser um fator limitante ao uso de complexos Ru-NO na formação de óxido nítrico (NO⁰) coordenado, porém, os complexos Ru-NO₂ podem ser utilizados como uma fonte geradora alternativa de NO. Este mecanismo fotoquímico, descrito pela primeira vez em 1975 por Treinin e Hayon [36], confirma a produção de NO e formação de O₂^{-*} (ânion superóxido) sob irradiação de luz ultravioleta (200-400nm), conforme a seguinte equação:

De fato, observou-se que o complexo [RuCl(dcbpy)₂NO]²⁺ em pH 7,4 é convertido no correspondente Ru-NO₂ e o mesmo apresentou ação vasodilatadora

em anéis de aorta de rato devido a redução em $[Ca^{2+}]$ [29]. O composto $[Ru(bpy)_2(py)NO_2]^+$ também atua como doador de NO e o mesmo foi capaz de promover vasodilatação em tecido de aorta de ratos mesmo sem irradiação [37, 38].

Outra importante ação biológica do NO é a sua atividade antitumoral. Vários trabalhos têm sido descritos na literatura relacionando o NO e sua ação tumoricida. Neste sentido produzir compostos que possam liberar NO por irradiação na região do visível é fundamental. Com o intuito de investigar a atividade fotoquímica de complexos nitrosilos contendo a ligação $Ru^{II}-NO^+$ e diferentes coligantes, Sauaia e colaboradores [39, 18] relataram a liberação de NO por irradiação na região do visível (532nm) pelo complexo nitrosilo de rutênio $[RuL(NH_3)_4(pz)Ru(bpy)_2NO](PF_6)_5$ onde pz = pirazina, obtendo rendimento quântico de NO de $0,025 \text{ mol einstein}^{-1}$ para $L = NH_3$, $0,036 \text{ mol einstein}^{-1}$ quando $L = 4\text{-acetilpiriridina}$ e $0,038 \text{ mol einstein}^{-1}$ para $L = py$ [40].

No que diz respeito ao combate ao câncer, a terapia fotodinâmica (TFD) é alvo de muita pesquisa devido aos relevantes resultados obtidos. Ftalocianinas são compostos utilizados na TFD, os quais produzem oxigênio singlete por ação da luz. Nesse sentido, aliar compostos que possam gerar oxigênio singlete e óxido nítrico de forma sinérgica pode ser uma estratégia de sucesso no tratamento do câncer. Nosso grupo tem direcionado os trabalhos visando a obtenção de compostos que possam ser geradores de óxido nítrico e oxigênio singlete e seu estudo em células cancerígenas.

Em um trabalho do grupo, o sinergismo foi avaliado através da interação por ligação de hidrogênio, entre a ftalocianina $Na_4[Tb(TsPc)(acac)]$ ($TsPc$ = ftalocianina tetrasulfonada; $acac$ = acetilacetona) e o complexo $[RuCl(dcbpy)_2NO]^{2+}$ [41, 42]. Quando o sistema foi irradiado em 680 nm observou-se um rendimento quântico devido ao NO e 1O_2 de $[NO] = 1,21 \pm 0,14 \text{ mol L}^{-1}$ and $\phi_{OS} = 0,67$. Testes de citotoxicidade em linhagem de células tumorais B16-F10 resultaram em um decréscimo da viabilidade celular de 80 % quando as células foram irradiadas. Ainda tendo como foco a TFD, no grupo foi sintetizado o complexo $[Ru(NO)(ONO)(pc)]$ (pc = ftalocianina) e caracterizado quanto as propriedades físico-químicas. Este sistema mostrou-se capaz de produzir oxigênio singlete e NO quando irradiado em 660 nm e mostrou citotoxicidade sobre células tumorais B16-F10 quando comparado às células não irradiadas (controle escuro). Ainda no mesmo trabalho

observou-se que o complexo encapsulado em lipossoma foi 25% mais ativo do que o correspondente em tampão fosfato [43].

1.6 Introdução à Fotoquímica

O estudo da interação entre a luz (ultravioleta ou visível) e o comportamento dos estados eletronicamente excitados da matéria (ou molécula), estão inseridos nas áreas de estudo de Fotofísica e Fotoquímica. Esta, é baseada em dois princípios fundamentais: a primeira e a segunda Lei da Fotoquímica.

A Primeira Lei da Fotoquímica estabelece que somente a luz absorvida pelo sistema é efetiva em produzir uma reação fotoquímica que modifica a molécula e gera um fotoproduto. A lei de **Lambert-Beer** estabelece uma relação exponencial da fração de luz absorvida e a concentração em mol.L^{-1} da substância, sendo que esta radiação absorvida independe da intensidade da radiação incidente. Baseado neste conceito, ressalta-se que átomos e moléculas absorvem somente em frequências específicas de radiação de acordo com suas configurações eletrônicas [44].

Uma molécula no estado fundamental (S_0) ao absorver radiação luminosa (do infravermelho, visível ou luz ultravioleta) é excitada ao primeiro estado singlete (S_1) formando assim uma nova espécie. Nesse estado mais energético e mais instável, o elétron retorna ao seu estado fundamental ou para um nível menos energético, dissipando a energia ganha na absorção por meio de diferentes rotas.

Sendo assim, os processos de desativação do estado excitado podem ser divididos em radiativos ou não-radiativos. Os processos não-radiativos incluem relaxação vibracional; conversão interna; conversão externa e cruzamento intersistema. Os processos radiativos englobam a fotoluminescência, que compreende a fluorescência e a fosforescência. Os processos descritos acima são apresentados no Diagrama de Jablonski (Figura 1.4).

A desativação por relaxamento vibracional é resultante de colisões entre a molécula excitada e o solvente. É um processo de alta eficiência com o tempo de vida médio estimado na ordem de 10^{-12} s. A conversão interna é um processo não radiativo que envolve a desativação de estados excitados da mesma multiplicidade de spin (exemplo singleto-singleto S_3 , S_0 , etc). É importante salientar a relevância desse

Figura 1.4: Diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado: Stomayor (2008)

tipo de desativação, haja vista o efeito expressivo do solvente sobre a intensidade de fluorescência [45].

O processo de cruzamento intersistema é caracterizado pela inversão do spin eletrônico sendo favorecido pela supressão entre os estados vibracionais [45].

A Fotoluminescência é a emissão de fótons dos estados eletronicamente excitados podendo ser dividida em dois tipos conforme a natureza do estado fundamental ou estado excitado, singlete ou tripleto. A fluorescência consiste no retorno de uma espécie no estado excitado singlete para o estado fundamental sem alteração na orientação de seu spin apresentando um tempo de vida médio (período de tempo que o fluoróforo permanece no estado excitado) na escala de 10^{-9} segundos. Entretanto a fosforescência requer a mudança na orientação do spin para que o estado excitado tripleto retorne ao estado fundamental singlete. Por utilizar parte da energia para esta finalidade, o tempo de vida médio é maior que a fluorescência, entre 10^{-3} a 100s [46].

A fluorescência pode também servir de ferramenta nos estudos sobre a interação entre diferentes moléculas, permitindo obter parâmetros sobre os processos que envolvem transferência de energia entre a substância de interesse e outras moléculas presentes na solução, possibilitando entender os mecanismos que envolvem a supressão da energia dos estados excitados.

O uso da fotoluminescência permite o controle experimental sobre o processo de excitação, pois ao controlar o comprimento de onda da luz incidente, a energia

fornecida ao sistema pode ser direcionada a um componente específico otimizando o processo fotoquímico que seria usado pelo sistema inteiro.

A segunda Lei da Fotoquímica afirma que a absorção de radiação por uma molécula é um processo uni-quântico; cada quantum de radiação eletromagnética absorvido provoca um equivalente de uma reação fotoquímica.

A eficiência da reação fotoquímica é expressa em termos de quantidade, chamada rendimento quântico (ϕ) definido como a razão entre o número de moléculas excitadas na reação pelo número total de fótons absorvidos (equação abaixo) [44].

$$\phi = \frac{n^{\circ} \text{fotons}_{\text{emitidos}}}{n^{\circ} \text{fotons}_{\text{absorvidos}}} \quad (1.5)$$

Reações de transferência eletrônica em sistemas moleculares são fundamentais para os processos vitais. A fotossíntese é um exemplo clássico em que luz é convertida em energia química através de vários processos de transferência de carga fotoinduzidos.

Na tentativa de mimetizar a natureza, muitos grupos de pesquisa estudam sistemas artificiais captadores de energia luminosa que são capazes de convertê-la em energia química. Tais sistemas podem ser constituídos por subunidades moleculares, onde a primeira funciona como captadora de energia luminosa e como doadora (D) de elétrons/ou energia e a outra subunidade (A) comporta-se como aceptora de elétrons, sendo que D e A podem estar diretamente conectadas ou possuírem entre elas moléculas intermediárias, que se comportam como espaçadoras, ou ligante de ponte [13].

Os efeitos controlados pela luz tem algumas vantagens como rapidez (ordem de até femtosegundos dos processos); uso de instrumentos ópticos (lasers, detectores, etc.) e ausência de envolvimento desses materiais na reatividade [13].

Moléculas que tenham alta capacidade de absorver a luz podem ser usadas como um sistema artificial na transferência de elétrons e/ou processos de transferência de energia. Nesse contexto, os Pontos Quânticos (PQs) mostram-se candidatos em potencial no sistema proposto. PQs são compostos capazes de captar energia luminosa podendo ser aplicados como sistema de liberação de biomoléculas ativas como o NO por processos de transferência de elétron e/ou energia. Além disso, sua fluorescência pode ser utilizada no acompanhamento e detecção de imagem *in*

vitro e in vivo.

1.7 Pontos Quânticos (PQs) ou Quantum Dots (QDs)

Os Pontos quânticos são nanocristais semicondutores que emergem como uma nova classe de fluoróforos com grande potencial para serem usados como sistemas de liberação de drogas. Sua composição química, tamanho e forma são parâmetros que podem ser variados possibilitando a sua ligação com diferentes fármacos e o seu direcionamento para locais específicos do organismo. [47]. Com tamanho entre 1 e 10 nm, os PQs podem possuir centenas a alguns milhares de átomos. O material semicondutor consiste num núcleo coloidal e heterogêneo (core em inglês) formado por átomos inorgânico (CdS, CdSe, CdTe, InAs, GaN), podendo ser capeado por uma camada de molécula surfactante chamada de ligante, que favorece uma repulsão suficiente entre os cristais a fim de evitar a aglomeração entre eles. [48].

O grande interesse nos PQs ocorre devido a sua intrigante propriedade óptica dependente do tamanho, podendo emitir fluorescência em diferentes comprimentos de onda apenas alterando-se o seu diâmetro.

Sendo um material semicondutor, a distância entre a zona de valência e a de condução, chamada de *gap* de energia ou *band gap*, diminui com o número de átomos adicionados à molécula. Essa mesma tendência é observada nos nanocristais constituídos do mesmo material porém de tamanhos diferentes. (Figura 1.5). Quanto maior for a nanopartícula, maior será o comprimento de onda de emissão de fluorescência, deslocando-se para estados de baixa energia próximas à região do infravermelho.

Numa molécula simples ou mesmo em um íon, os níveis individuais dos átomos se desdobram em uma série de níveis de energia ligeiramente diferentes conhecidos como bandas de energia. O orbital molecular de mais alta energia ocupado é chamado de HOMO e o orbital molecular de mais baixa energia não ocupado é chamado LUMO.

No caso de sistemas no estado sólido, semelhante ao sistema manométrico dos PQs, à medida que os átomos são aproximados a separação entre estes níveis

Figura 1.5: Fluorescência dos PQs dependente do tamanho. Adaptado de [49].

Figura 1.6: Representação das zonas de energias de diferentes materiais: isolante, condutor, semicondutor, ponto quântico e molécula. Adaptado de Murphy and Coffre[50]

aumenta. A última banda de energia ocupada é conhecida como zona de valência (HOMO) a próxima banda é conhecida como zona de condução (LUMO). A separação entre o mínimo de uma zona de condução e o máximo de uma zona de valência é conhecida como banda proibida ou *gap* de energia (Figura 1.6). Compostos semicondutores apresentam um *gap* de energia de valor intermediário quando comparados com materiais isolantes ou condutores.

Os PQs, quando submetidos à irradiação (Figura 1.7, processo 1) promovem o elétron ao nível mais energético gerando o par elétron-buraco. A partir desta

etapa outros processos podem ocorrer como o retorno à banda de valência por processo térmico (não-radiativo) ou emissão de luz (processo radiativo) (processo 2) ou os elétrons podem ficar presos à superfície (processo 3) favorecendo o processo de transferência de elétrons interfacial (processo 4) reduzindo um aceptor (A) ou transferência de energia (processo 5).

Figura 1.7: Processos de fotoreações dos PQs. Adaptado de Kisch et al. 2002 [51].

O mecanismo geral para a formação dos PQs é dividido em duas etapas, a nucleação, com a formação dos cristais, e em seguida o crescimento.

Os ligantes utilizados para recobrir a superfície do núcleo são chamados de agente passivadores ou surfactantes que apresentam grupo polar porção terminal (-SH, -COOH, -NH) controlando as propriedades ópticas desses. De acordo com seu comportamento dinâmico em torno dos PQs, podem influenciar favorecendo o crescimento destes ou bloqueando-os. O desempenho dos ligantes é influenciado por alguns fatores como sua concentração e extensão da cadeia carbônica, temperatura da reação e tipo de solventes [52].

Como estratégia no controle das propriedades ópticas dos PQs, como o aumento da fluorescência e maior estabilidade contra fotooxidação, surge-se a opção de semicondutores do tipo concha-núcleo, com o crescimento adicional de uma concha (ou *shell* na língua inglesa).

Essas nanoestruturas podem ser subdivididas em diferentes grupos da tabela periódica, compostos de II-IV, II-V e IV-VI, como exemplo CdS/ZnS, CdSe/ZnS, CdSe/CdS, e InAs/CdSe (núcleo/concha). De modo geral as estruturas

núcleo/concha podem ser classificadas em dois tipos: Tipo I, cujo material da concha é um semicondutor de maior *band gap* e no núcleo ocasionando separação espacial dos portadores de carga, uma vez que os buracos e elétrons ficam confinados na região do núcleo. Já no sistema do tipo II são caracterizados por apresentarem uma separação espacial dos portadores de carga, uma vez que os elétrons ficam confinados na região da concha, e os buracos, na região do núcleo. A vantagem desse sistema é a possibilidade de alterar propriedades ópticas pela variação da espessura da concha [52].

O controle da espessura da concha (*shell*) é um ponto delicado na fabricação das NPs pois se a camada for muito fina, a passivação do núcleo será ineficiente com redução da fotoestabilidade enquanto que, com o aumento da espessura, serão formados defeitos. A nova técnica utilizada para obter um controle preciso da espessura da casca é pelo método chamado SILAR (*Successive Ion Layer Adsorption and Reaction*) que baseia-se na formação de uma monocamada por vez alternando a injeção de precursores catiônicos e aniônicos [53].

PQs podem ser sintetizados tanto em solvente polares como apolares. A síntese em solvente orgânico pode ser dividida em dois principais métodos: Injeção à quente (*hot injection*) ou elevação da temperatura (*heating up*). Bawendi e colaboradores foram os pioneiros na síntese de PQs monodispersos (CdS, CdSe, CdTe) pela via de injeção à quente [54] sendo revolucionária na década de 90 e utilizou TOP (trioctinilfosfina) e TOPO (trioctinilfosfinóxido) como solventes coordenantes.

No decorrer desses 25 anos de estudo, novos métodos de passivação do core (uso de grupamento tiol) e otimização no controle do tamanho resultaram em materiais aptos para aplicação como células voltaicas na emissão de luz por diodos (LEDs) e recentemente usados em provas biológicas. Apesar de obter rendimentos quânticos de até 80% esse método utiliza precursores extremamente tóxicos, pirofóricos, de custo elevado e que necessitam de altas temperaturas de reação.

Com o advento da aplicação de nanopartículas em meios biológicos tornou-se mais interessante e seguro a obtenção de PQs solúveis em meio aquoso em comparação às reações em meio orgânico em altas temperaturas [55]. Os

procedimentos de estabilização dos primeiros CdS para controlar as etapas de nucleação e crescimento dos PQs incluíam peptídeos e micelas [56]. O desenvolvimento das sínteses em água foi impulsionado pela síntese aquosa de CdTe utilizando tióis de cadeia curta (quatro carbonos) como agentes estabilizadores. Há uma grande classe de agentes estabilizadores de cadeia curta da família dos tióis com diferentes grupos funcionais (amino, carboxílico, hidroxílico, etc) e os mais populares são ácido tioglicólico ou ácido mercaptoacético (ATG), ácido mercaptopropiônico (AMP) e 2 mercaptoetilenodiamina (cisteína). Os dois primeiros compostos favorecem a síntese dos PQs mais estáveis em solução aquosa apresentando carga negativa devido à superfícies com grupos carboxílicos [57].

Os PQs, além de apresentarem boa estabilidade e alta fluorescência, destacam-se como produto nanotecnológico pela possibilidade de serem customizados, funcionalizados pela modificação da sua superfície [58].

Devido ao seu tamanho, os PQs apresentam inúmeras opções de funcionalizações, podendo ser utilizados apenas com sua estrutura básica, núcleo, como também pela adição de uma camada externa chamada de concha ou *shell*, constituída de outro material semicondutor, que além de aumentar a fluorescência protege contra oxidação. Ambos compostos podem ser revestidos com diferentes agentes passivantes que podem alterar a polaridade e proporcionar novas interações químicas ampliando seu campo de aplicações biológicas quando conjugados à biomoléculas (como peptídeos, ácidos nucleicos ou anticorpos tipo célula-específico e bioencapsulados por polímeros [59, 60] (Figura 5.2).

As funções biológicas não podem ser determinadas por uma simples elucidação de estruturas celulares ou moleculares. As células de mamíferos possuem aproximadamente 10 μm de diâmetro e contém uma infinidade de estruturas subcelulares na escala micro. É necessário um estudo da organização temporal - espacial e distribuição intracelular das moléculas reguladoras como proteínas (1-20 nm) com acompanhamento dinâmico em tempo real das interações molecular [55].

Técnicas atuais de captação de imagem, como a microscopia confocal e eletrônica, auxiliam na elucidação de estruturas intracelulares como também na localização específica dessas nanopartículas. PQs permitem visualizar componentes intracelulares em alta resolução, seletividade, precisão e alta fluorescência [61].

Figura 1.8: Estrutura multifuncional de um PQ. Adaptado de GAO, (2005).

Dentre as várias aplicações dos PQs incluem-se os marcadores celulares, possibilitando o acompanhamento dinâmico de moléculas através de sua fluorescência. Nos testes *in vivo*, um dos objetivos é captar imagens tanto em sítios patológicos como normais, entretanto não se limita apenas à localização mas também à detecção e ao acompanhamento da progressão degenerativa de tecidos ou da sua gradual recuperação. Estudos farmacocinéticos *in vivo* desses compostos envolvendo o seu modo de excreção pelo organismo demonstraram que partículas cujo o raio hidrodinâmico foi menor que 5,5 nm foram efetivamente eliminados pela urina [62].

Os PQs que absorvem na região do infravermelho mostraram capacidade de penetração tecidual acima de 6mm [63]. Entretanto mais estudos são necessários para caracterização, otimização de suas propriedades, como se comportam no sistema *in vivo* e quanto tempo necessário para sua eliminação do organismo

Uma das áreas que mais tem avançado é a área de diagnóstico, onde os PQs são utilizados como sondas fluorescentes. No tratamento contra o câncer, por exemplo, onde ainda há falhas na identificação precoce de tumores, frequentemente usa-se técnicas invasivas para detecção. As biópsias de tecidos, dependendo de sua localização, são de difícil acesso e os corantes utilizados atualmente não conseguem distinguir tumores malignos invasivos dos benignos. Os estudos na área de proteômica e genômica podem auxiliar nessa detecção baseados no perfil de expressão gênica específicos de cada tipo celular [61]. Por isso há necessidade de

novas ferramentas diagnósticas que permitam a detecção simultânea de proteínas sem perder a sensibilidade. PQs apresentam-se versáteis marcadores patológicos em fluidos biológicos (urina, sangue) ou em microscopia por *real-time* [64, 65, 66].

Dentre outras possibilidades recentes de uso dos PQs, destaca-se sistemas de liberação de drogas, principalmente em terapias contra o câncer. Dependendo de sua composição e tamanho emitem fluorescência intensa e estável do visível ao infravermelho e com alto coeficiente de absorção em uma larga faixa espectral [67]. Essa capacidade de transferir energia e elétrons possibilita utilizar os PQs como fotossensibilizadores em fototerapias, principalmente na terapia do câncer. Ford e colaboradores relataram a liberação de NO de nitro-complexos de cromo quando associados à PQs (CdSe/ZnS) pelo processo de transferência de energia. As vantagens de utilizar a luz como um estímulo externo é a capacidade de controlar a localização, o tempo de liberação da droga e a dose.

Terapia Fotodinâmica é uma modalidade médica de terapia que consiste na combinação de luz e fármaco fotossensibilizador e o oxigênio molecular. Entretanto, nas neoplasias de tumores sólidos de grande porte, a hipóxia limita a aplicação da TFD pois a deficiência de oxigênio nos tecidos inviabiliza a produção de EROs e consequentemente diminui a eficiência da terapia [7].

A idéia de unir um sistema doador-receptor de elétrons fotoquimicamente induzido à liberação de óxido nítrico é bastante viável no que tange a aplicação em sistemas biológicos, especialmente na fototerapia. Ou seja, parece plausível a construção de sistemas artificiais doador-receptor (D-A), que contenham os pontos quânticos que funcionariam como subunidade D, e complexos nitrosilos de rutênio, que seriam a subunidade A.

A transferência eletrônica fotoinduzida seria indubitavelmente comprovada pela detecção de NO gerado que, como alternativa em situação de hipóxia, pode produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) possibilitando a morte de tumores que sobrevivem na ausência de oxigênio [68, 3].

2 *Objetivos*

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e investigar a associação entre complexos nitrosilos de rutênio associados a pontos quânticos, com o intuito de modular a liberação de NO em diferentes regiões do espectro, auxiliando em imagem diagnóstica quando em análise em meio biológico .

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização do complexo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₃;
- Síntese e caracterização dos PQs: CdS-ATG, CdSe-TOPO e CdTe-AMP utilizando diferentes agentes passivantes e diferentes métodos de sínteses;
- Caracterização fotofísica e avaliação fotoquímica de transferência eletrônica fotoinduzida na liberação de NO da interação PQ-complexo rutênio-nitrosilo.
- Análise de imagem e avaliação da atividade citotóxica dos compostos em linhagem de células tumorais, B16-F10.

3 *Experimental*

Os reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia. A Tabela 3.1 apresenta cada com a devida procedência.

Tabela 3.1: *Reagentes utilizados*

Reagentes	Procedência
Solventes	
Acetona	Synth
Clorofórmio	J. T. Baker
DMSO	Sigma Aldrich
Etanol	Synth
Éter Etílico	Synth
Ligantes	
4 - aminopiridina	Sigma Aldrich
3 - mercaptopiridina	Sigma Aldrich
Ácido tioglicólico	Sigma Aldrich
2,2'- bpirina	Sigma Aldrich
[15]aneN ₄	Sigma Aldrich
Ácido tri - octinilfosfina TOP	Sigma Aldrich
Hexadimetildisilatiane	Sigma Aldrich

Continua na próxima página. . .

Tabela 3.1 – Continuação

Reagentes	Procedência
TOPO	Sigma Aldrich
Outros	
Acetato de cádmio	Synth
Borohidreto de sódio	Sigma Aldrich
Brometo de Potássio Br ₂	Sigma Aldrich
CdCl ₂ .2H ₂ O	Synth
Dietilzinco	Sigma Aldrich
NaNO ₂	Sigma Aldrich
NaS	Synth
Hexafluorofosfato de amônio	Sigma Aldrich
Hexafluorofostato de tetrabutilamônio	Sigma Aldrich
Hidróxido de sódio	Neon
RuCl ₃ .nH ₂ O	Sigma Aldrich
Telúrio	Sigma Aldrich
Acetato de cádmio.2 H ₂ O	Synth
Óxido de cádmio	Sigma Aldrich
MTT	Sigma Aldrich

3.1 Síntese e caracterização dos complexos nitrosilos

A síntese do complexo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₃, foi relatada previamente na literatura [69, 70, 18] com algumas modificações conforme Figura 3.1 .

Figura 3.1: Rota sintética do complexo de rutênio *cis*-[Ru(NO⁺)(bpy)₂(L)](PF₆)₃.

3.1.1 Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O

Em um balão de 50 mL contendo 8 mL de dimetilformamida, adicionou-se 1,000 g de cloreto de rutênio (III) (RuCl₃.3H₂O) (3,8 x10⁻³ moles), 1,200 g de 2,2-bipiridina (bpy) (7,7 x 10⁻³ mol) e 1,100 g de cloreto de lítio (LiCl) (2,6 x 10⁻² mol), conforme literatura [69]. Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento por banho de glicerina. A solução atingiu o refluxo a uma temperatura de 130 °C e a reação processou-se por um tempo de 8 horas. Ao

término do tempo de reação, desligou-se o aquecimento; após o resfriamento da solução, adicionou-se aproximadamente 40 mL de acetona. O balão foi levado à geladeira por 1 hora. A solução foi filtrada e o sólido escuro recuperado foi lavado com várias porções de éter. A massa obtida de 1,452 g. Rendimento de 73,0 %.

3.1.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O

Em um volume de 100 mL água destilada/etanol (25:75 v/v), contida em um balão de 250 mL de 2 bocas, foi submetido a aquecimento (80 °C) e borbulhamento de argônio por um período 15 min para retirada de oxigênio. Foram dissolvidos, neste balão, 0,300 g do composto *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] 2H₂O (5, 8 x 10⁻⁴ mol), como descrito[70]. Após 15 min, a solução quente foi filtrada e ao filtrado adicionou-se 0,900 g de NaNO₂ (1,3 x 10⁻² mol) previamente dissolvido em água destilada e desaerada. Deixou-se reagindo, a 80 °C, durante 1h e 30 minutos. Colocou-se o balão sob refrigeração por 1 hora, filtrou-se e obteve-se um sólido vermelho intenso, o qual foi lavado com várias porções de éter. Após a secagem, a massa obtida foi de 0,240 g. Rendimento de 79,5 %.

3.1.3 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO)(NO₂)₂(bpy)₂](PF₆)₂

Ainda referente ao trabalho de Godwin & Meyer[70], suspendeu-se em 30 mL de metanol uma massa de 0,230 g do complexo *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O.(4,6 x 10⁻⁴ mol), sem aquecimento e sob agitação, gotejou-se 2 mL de HPF6 concentrado. Após 15 min, filtrou-se a solução e o sólido amarelo retido foi lavado com metanol e éter etílico. A massa obtida foi de 0,298 g. Rendimento de 87,0 %

3.1.4 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO₂)(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₂

Uma massa de 0,150 g (1,9 x 10⁻⁴ mol) do complexo *cis*-[Ru(NO₂)(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₂ foi dissolvida em cerca de 20 mL de acetona, em seguida gotejou-se uma solução de 0,013 g (1,9 x 10⁻⁴ mol) de azida de sódio (NaN₃) dissolvida em 5 mL de metanol, conforme descrito [71]. Após 10 min acrescentou-se 0,5 mL do ligante, 4-aminopiridina (6,6 x 10⁻³ mol). O balão foi coberto com papel alumínio e deixou-se a solução sob agitação durante 17 horas. Ao término do tempo de reação, evaporou-se a acetona e acrescentaram-se 3 mL de água destilada contendo 0,500

g de NH_4PF_6 ($3,1 \times 10^{-3}$ mol) e 0,5 mL de etanol. O etanol ajuda na formação do precipitado. Colocou-se o balão na geladeira por 1 hora, filtrou-se a solução e o sólido de cor laranja retido no filtro foi lavado com porções de éter. Rendimento de 78,9 %.

3.1.5 Síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_3$

Uma massa de 0,100 g da espécie *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)$ ($1,0 \times 10^{-4}$ mol) foi dissolvida em 20 mL de acetonitrila. A esta solução adicionou-se 1 mL de HPF_6 concentrado, deixou-se reagir por 15 min. Evaporou-se a acetonitrila e acrescentaram-se 2 mL de água destilada. Prontamente formou-se um precipitado amarelo que após ficar sob refrigeração durante 1 hora, foi recuperado por filtração, lavado com éter e colocado no dessecador por 24 h. Rendimento de 78,0 %.

3.1.6 Síntese do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}([\text{15}] \text{aneN}_4)](\text{PF}_6)_2$

A síntese do complexo *trans*- $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}](\text{PF}_6)_2$ foi realizada conforme descrito por Oiveira e colaboradores (2004) (Figura 3.2).

Figura 3.2: Rota sintética do complexo de rutênio *trans*- $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}](\text{PF}_6)_2$.

3.1.7 *trans*- $[\text{RuCl}_2([\text{15}] \text{aneN}_4)]\text{PF}_6$

Foi dissolvido 0,509 g de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($1,9 \times 10^{-3}$ mol) foi dissolvido em 200 mL de etanol à 70 °C [72]. Borbulhou-se argônio durante 30 min e depois borbulhou-se de hidrogênio para redução do outro metal Ru^{III} - Ru^{II} até a obtenção de uma solução azul (cerca de 4 h).

Posteriormente iniciou-se a adição de 0,600 g ($2,8 \times 10^{-3}$ mol) do ligante $[\text{15}] \text{aneN}_4$ dissolvidos em 50 mL de etanol. Esta adição durou cerca de 1 h e o

sistema foi mantido em refluxo por 15 h. A solução foi filtrada e um precipitado preto-esverdeado foi removido.

Em seguida, foram adicionados 5 mL de HCl concentrado e o refluxo mantido por mais 1 h. A solução foi resfriada e seu volume foi reduzido até aproximadamente 10 mL com auxílio de um rotoevaporador. Manteve-se na geladeira por aproximadamente 14 h, mas não houve a formação de precipitado. Adicionou-se então 1 g de NH_4PF_6 ($6,1 \times 10^{-4}$ mol), aproximadamente, havendo formação instantânea de precipitado marrom, que foi imediatamente filtrado. Rendimento: 54,0 %

3.1.8 Síntese do complexo *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)](PF₆)₂

Foram dissolvidos 0,330 g ($6,2 \times 10^{-4}$ mol) de *trans*-[RuCl₂([15]aneN₄)]PF₆ em 90 mL de água a 75 °C, como literatura [30]. Após a dissolução do sólido, o balão foi suspenso do aquecimento e foram adicionadas algumas pastilhas de zinco amalgamado sob borbulhamento de argônio durante 1 h. A solução foi filtrada para a retirada das pastilhas de zinco, aquecida sob refluxo e adicionado 0,43 g de NaNO₂ ($6,2 \times 10^{-3}$ mol) dissolvidos em pequena quantidade de água. O refluxo foi mantido por 60 min, foram adicionados, lentamente, 5 mL de HCl concentrado e o refluxo mantido por mais 30 min. O volume da solução foi reduzido, com o auxílio de rotoevaporador, até o aparecimento de um precipitado branco, o qual foi removido da solução. Foi adicionado etanol à solução até o aparecimento de precipitado que foi recolhido por filtração e lavado com éter etílico. Rendimento 32,0 %.

3.2 Caracterização do complexos de rutênio

3.2.1 Medidas de pH e Espectroscopia na região do infravermelho

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se o pHmetro Digimed modelo DM-20.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com Espectrofotômetro Prestige-21 Shimadzu 02190 sendo realizada uma média de 25 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} na região de 400 a 4000 cm^{-1} . As amostras foram diluídas em

brometo de potássio (KBr) e prensadas na forma de pastilhas. As medidas realizadas no Perkin Elmer Spectrum Two UATR FT-IR, varredura de leitura calibrada na região de 650 a 4000 cm^{-1} foram realizadas na Universidade da Califórnia de Santa Barbara. Neste aparelho uma pequena quantidade de amostra é utilizada podendo ser esta no estado sólido ou líquido, não sendo necessário o uso das pastilhas de KBr.

3.2.2 Análise Elementar

Os compostos foram submetidos à análise elementar, a qual foi usada como um dos critérios de pureza e no auxílio da caracterização dos mesmos. Estas análises foram realizadas no Analisador Elementar da Leco Instrumentos - modelo TruSpec CHNS-O do Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas-MG.

3.2.3 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

OS espectros na região UV-visível dos complexos foram realizados em um espectrofotômetro UV-visível-NIR Hitachi modelo U-3501. Para isso, o sólido isolado foi dissolvido em solvente apropriado e a solução foi submetida à varredura espectrofotométrica na região de 800 nm a 200 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar (ϵ).

3.3 Síntese de Pontos Quânticos (PQs)

Os PQs apresentam como característica única a relação direta entre o comprimento de onda de emissão e o diâmetro da nanopartícula de PQ. Apresentam um largo espectro de absorção e uma banda de emissão estreita e simétrica observando-se um pequeno deslocamento de **Stokes** (diferença dos picos máximos nos espectros de absorção e de emissão de um fluoróforo) [48].

A solubilidade dos PQs depende dos tipos de moléculas orgânicas estabilizadoras (ou passivadoras) que aderem à superfície do PQ durante a síntese [73]. Os grupos hidrofílicos tais de cadeia-curta, como ácido tioglicólico e ácido mercaptopropiônico, comumente são utilizados como ligantes estabilizadores [74].

Esses grupos hidrofílicos aumentam a biocompatibilidade biológica e a proteção contra aglomeração e repulsão entre as partículas [75].

Há várias metodologias para síntese dos PQs através das diferentes combinações de elementos dos grupos II-IV, II-V e IV-VI, como exemplo CdS/ZnS, CdSe/ZnS, CdSe/CdS, e InAs/CdSe (núcleo/concha). Durante a realização deste trabalho foram sintetizados três tipos de PQs: sulfeto de cádmio (núcleo: CdS); seleneto de cádmio (núcleo/concha: CdSe/ZnS) e telureto de cádmio (núcleo: CdTe). O primeiro, CdS, foi sintetizado sem *shell* por uma rota de síntese mais simples realizada em meio aquoso; o segundo, CdSe foi revestido com *shell* de ZnS e a síntese foi conduzida em meio orgânico em temperaturas mais elevadas; o terceiro, CdTe foi sintetizado de duas maneiras: primeira em meio aquoso, com adição do precursor NaHTe na solução de Cádmio e o segundo pelo método mais recente de síntese one pot, que não há necessidade de adicionar o precursor à reação. Os PQs sintetizados, CdS, CdSe/ZnS e CdTe, foram revestidos com diferentes agentes ligantes (cappings), ácido tioglicólico (ATG), trioctilfosfinóxido (TOPO) e ácido mercaptopropiônico (AMP).

3.3.1 Síntese do PQ Sulfeto de Cádmio - (core: CdS)

Inicialmente foram preparadas as seguintes soluções: sulfeto de sódio, dissolvendo-se 0,240 g ($3,1 \times 10^{-3}$ mol) do sal Na₂S em 100mL de água destilada; solução de ácido tioglicólico (ATG) solubilizando-se 20 μ L ($2,9 \times 10^{-6}$ mol) em 20 mL de água destilada.

A síntese do PQ CdS seguiu um procedimento similar ao descrito na literatura por Yu e colaboradores [73]. Em um balão volumétrico de 250 mL adicionou-se 0,266 g ($1,0 \times 10^{-5}$ moles) de acetato de cádmio (Cd(CH₃COO)₂·2 H₂O) e 100 mL de água destilada. Deixou-se a mistura sob agitação até completa solubilização. Adicionou-se gota-a-gota a solução de ácido tioglicólico (proporção CdS : ATG = 1:0,001) através de um funil de adição. O gotejamento foi realizado lentamente e sob forte agitação, a 25° C. Após deixar reagindo por 10 minutos, trocou-se o funil de adição e gotejou-se a solução de Na₂S, que também foi adicionada lentamente. Deixou-se a mistura reagindo por 1 hora e observou-se alteração de cor da solução, passando de incolor para amarelo-claro, com formação de precipitado amarelo. A

solução foi centrifugada e lavada com água e etanol.

O composto obtido apresentou coloração amarela e não apresentou solubilidade visual em água, etanol, metanol, acetonitrila e clorofórmio, sendo um pouco solúvel em tolueno. Devido à dificuldade de solubilização, algumas tentativas de variação no método de síntese foram realizadas. A princípio, o valor do pH da mistura CdS- ATG foi elevado para 11, utilizando-se uma solução de NaOH 0,1 mol/L, antes da adição da solução de Na₂S, conforme descrito na literatura [76]. Porém, observou-se a formação de precipitado branco, Cd(OH)₂. De acordo com a literatura [77], repetimos a síntese, porém a proporção utilizada de Cd: ATG foi alterada para 1:10. Nesse caso, após a mistura das soluções de cádmio e ATG, o pH foi elevado para 11 e não houve a formação do precipitado de Cd(OH)₂; isto é devido à complexação do cádmio por várias moléculas de ATG, agora em excesso. Adicionou-se, então, a solução de Na₂S, com um funil de adição, lentamente, sob forte agitação e temperatura ambiente. Após o final da adição, a mistura reagiu por 2,5 horas, formando uma solução de cor amarelo intenso e sem precipitado. A esta solução foi adicionado isopropanol para que ocorresse a precipitação do PQ. O sólido amarelo foi isolado por centrifugação, lavado com etanol e seco em dessecador com sílica gel.

3.3.2 Síntese do PQ Seleneto de cádmio revestido com sulfeto de zinco (core/*shell*: CdSe/ZnS)

O PQ CdSe/ZnS foi sintetizado pelo método *hotinject* segundo procedimento descrito por TOMASULO em trabalho de 2006 [78]. Em um balão volumétrico, de 25 mL, preparou-se uma solução estoque de selênio, dissolvendo-se 0,050 g de Se em pó em 2,0 g ($5,4 \times 10^{-3}$ moles) de tri-octilfosfina (TOP), sob aquecimento a 100 °C. Em outro balão volumétrico, de 25 mL, uma mistura de 0,051 g ($3,9 \times 10^{-4}$ moles) de óxido de Cádmio (CdO), 0,223 g de ácido tetra-n-duodecilsulfônico e 3,777 g ($9,8 \times 10^{-4}$ moles) de trioctilfosfinóxido (TOPO) foi aquecida a 320 °C, sob atmosfera de argônio, até completa dissolução do CdO. Em seguida, a temperatura da solução foi reduzida a 200 °C e adicionada a solução de selênio. A reação foi mantida por 40 minutos a 200 °C e a temperatura foi novamente reduzida, agora para 120 °C; foram, então, adicionados gota a gota uma solução de 1,6 mL ($1,5 \times 10^{-5}$ moles) de

dietilzinco (ZnEt_2) e hexametildisilazano (0,30 mL) em tri-octilfosfina (5 mL) e a reação foi mantida por 5 horas a 70 °C. O precipitado foi isolado por filtração a vácuo e um sólido de coloração avermelhada foi obtido. Este não apresentou nenhuma solubilidade visual nos seguintes solventes: água, etanol, metanol, acetonitrila e DMSO. Entretanto foi observada solubilidade parcial em clorofórmio e em tolueno.

3.3.3 Síntese do PQ Telureto de cádmio (core: CdTe)

3.3.3.1 Síntese CdTe em solução aquosa (PQ540)

A síntese das nanopartículas de CdTe revestidas por ácido mercaptopropiônico (AMP) seguiu a metodologia descrita em literatura [79] com algumas modificações. Esta síntese consiste de uma preparação prévia de duas soluções: do precursor de Cádmio e do precursor NaHTe. A proporção utilizada de Cd:Te:AMP = 1:0,2:4. Em um balão de 3 bocas de fundo redondo o precursor Cd foi preparado por dissolução de 0,080g ($3,6 \times 10^{-4}$ mol) de $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 80 mL de água destilada sob agitação. Em seguida adicionou-se 120 μL ($1,4 \times 10^{-3}$ moles do ligante AMP, sob forte agitação ajustando o pH da mistura em 10 utilizando-se solução 1,0 mol/L de NaOH. Durante a adição do NaOH, observou-se a formação de um precipitado floculoso que desapareceu à medida que o pH foi elevado ($\text{pH} > 6$), resultando assim numa solução translúcida ($\text{pH}=10$). Essa solução foi preparada em temperatura ambiente e mantida em atmosfera inerte por no mínimo 30 minutos. Em seguida a solução foi aquecida a 100°C.

O precursor telúrio, NaHTe, foi preparado num balão de 3 bocas de fundo redondo de 25 mL, adicionando-se 0,100 g de Te metálico, 0,060 g ($1,6 \times 10^{-3}$ moles) de NaBH_4 e 20 mL de água destilada, sob atmosfera de Ar. A mistura foi aquecida a 80°C e a reação foi mantida sob agitação por 30 minutos. Durante o aquecimento observou-se alterações de cor da solução, variando de translúcida a cor roxa (vinho). Neste momento, transferiu-se 4 mL do precursor de NaHTe, com auxílio de uma seringa, para o balão contendo o precursor de Cd, que já estava na temperatura de 100 °C. O balão contendo a mistura foi mantido em refluxo por 3 horas, sob agitação. Após este período o aquecimento foi retirado e o balão de reação foi resfriado rapidamente em um banho de gelo e água. A solução resultante apresentou coloração alaranjada devido a formação do PQ CdTe:AMP. A Figura 3.3

mostra um esquema de montagem da síntese descrita.

Figura 3.3: Montagem esquemática utilizada na síntese do PQ CdTe-AMP.

3.3.3.2 Precipitação Seletiva do PQ CdTe-AMP

Geralmente a distribuição de tamanho dos PQs coloidais em água é relativamente grande. Uma das técnicas pós-preparo empregadas para otimizar o controle do tamanho destas partículas é a precipitação seletiva que consiste na adição de um solvente, acetona neste caso, que faça diminuir a solubilidade dos PQs no meio reacional resultante. Devido as forças de van der Waals, as partículas maiores tendem a agregar primeiro que as menores e após centrifugação ou filtração, são isoladas.

Portanto, sob agitação, adicionou-se acetona suficiente para a formação de uma solução turva. Manteve-se a agitação por 15 minutos e, em seguida, centrifugou-se a mistura a 3400 rpm, durante 5 minutos, para separar o precipitado do sobrenadante. Se o sobrenadante apresentar luminescência, indica existência de partículas menores na solução e o procedimento citado anteriormente deve ser repetido com nova adição de solvente. Esse processo pode ser repetido quantas vezes for necessário.

Quando preparado em grandes quantidades, antes de iniciar a precipitação, pode-se reduzir o volume do meio reacional por rotoevaporação a 30°C, à pressão reduzida, até 2/5 do seu volume inicial. O aquecimento a temperaturas mais elevadas deve ser evitado, pois as nanopartículas podem retornar à etapa de crescimento, aumentando seu tamanho. Essa solução foi primeiramente centrifugada, para separar algum sólido escuro (Te metálico) que pode ter oxidado durante a adição do precursor ou durante a reação.

3.3.3.3 Síntese CdTe em meio orgânico (PQ600)

A síntese das nanopartículas de CdTe-AMP em solvente orgânico pelo método foi realizada segundo metodologia descrita na literatura [80] com algumas modificações.

Em um balão de 3 bocas de fundo redondo de 100 mL adicionou-se os reagentes: 0,052 g ($9,2 \times 10^{-5}$ mol) de miristato de cádmio, 0,013 g (1×10^{-4} mol) de Te metálico, 0,5 mL ($1,2 \times 10^{-3}$ mol) de TOP e 10g ($4,0 \times 10^{-2}$ mol) de 1 octadeceno. Sob vácuo e agitação aquecer o meio inicialmente a 100 °C, em seguida troque o vácuo por argônio elevando a temperatura a 180 °C. Através da mudança de coloração, que ocorre em alguns minutos, retira-se o balão da fonte de aquecimento, resfria-o através de ar comprimido (para que o resfriamento ocorra mais rápido). Quando a temperatura estiver aproximadamente a 90 °C, adicionar à solução acetona em grande volume. Através de centrifugação, a solução foi concentrada e armazenada protegida da luz.

3.3.3.4 Troca de ligante (Exchange)

Para que a troca de ligante ocorra é necessário que este possua porção tiol para se ligar ao núcleo do PQ. Num bequer, sob agitação e proteção da luz, foi adicionado 5mL da solução concentrada (0,1 mmol) de PQ. Evaporou-se parte do solvente e adicionou-se a solução do ligante AMP em excesso (>10 vezes) em água. Esta reação foi mantida em agitação por 12 h e a separação entre o PQ conjugado ao AMP do ligante livre foi feita por centrifugação utilizando um tubo de centrifuga (Amicon® ultra-15 centrifugal filter) contendo filtro interno utilizado para concentrar amostras e purificar componentes por exclusão de tamanho.

3.4 Caracterização dos PQs

3.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta - visível

As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia na região UV-visível realizada em um espectrofotômetro UV-visível-NIR Hitachi modelo U-3501. Para isso, o sólido isolado foi dissolvido em solvente apropriado e a solução foi submetida à varredura espectrofotométrica na região de 200 nm a 800 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar (ϵ).

3.4.2 Espectroscopia de Fluorescência

Espectros de excitação e emissão dos PQs, em solução, foram obtidos a temperatura ambiente no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC, utilizando-se cubetas de quartzo com quatro lados polidos, de 1,0 cm de caminho óptico. As fendas de emissão (f_{em}) e excitação (f_{ex}) foram iguais a 5 nm.

3.4.3 Medidas de Tempo de vida

Medidas do decaimento da intensidade de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de correlação temporal de fótons únicos (TCSPC), no Departamento de Física da FFCLRP-USP.

O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons da excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. A fonte de excitação foi um laser de titânio-safira (Tsunami 3950 - Spectra Physics), bombeado pelo segundo harmônico de um laser de diodo Nd:YVO4 (Millenia Spectra Physics) e com frequência dobrada para 465 nm in um cristal LBO (GWN-23PL- Spectra Physics). O tempo de vida foi determinado para as amostras em solução aquosa.

3.4.4 Rendimento Quântico de fluorescência para o PQ CdTe-AMP

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) para CdTe-AMP foi determinado através do método relativo, utilizando-se um padrão como referência, conforme a equação:

$$\phi = \frac{A_p F n^2}{A F_P n_P^2} \quad (3.1)$$

Onde o subscrito p refere-se ao padrão, A e A_p são respectivamente as absorções da amostra e do padrão nos respectivos comprimentos de onda de excitação, F é a área sob a curva de emissão, n índice de refração do solvente onde se encontra a amostra e n_P é índice de refração do solvente onde se encontra o padrão [44, 81].

Foram preparadas cinco soluções aquosas do composto padrão Rodamina B ($\phi_P = 0,31$) e do PQ CdTe-AMP, de concentração conhecida, e realizou-se medidas de absorbância das mesmas, em 355 nm e registrou-se também os espectros de emissão ($\lambda_{ex} = 355$ nm) das soluções, para calcular a área abaixo da curva. As absorbâncias no comprimento de onda usado apresentaram valor entre 0,1 e 0,01 nm para evitar o efeito filtro (reabsorção pela amostra). De acordo com a equação acima, foi determinado o rendimento quântico de fluorescência do PQ.

3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho dos PQs foram obtidos com os espectrofotômetros Prestige-21 Shimadzu 02190 sendo as amostras analisadas no estado sólido utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr). Foi realizada uma média de 25 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

3.4.6 Cálculo do tamanho dos PQs

Os cálculos para a determinação do tamanho de PQ e da concentração das nanopartículas foram realizados de acordo o procedimento descrito na literatura [82]. De acordo com a Equação X, utilizando-se o comprimento de onda máximo de absorbância do composto para calcular o tamanho da partícula. A partir desse

valor, é possível calcular o coeficiente de absorvidade molar (ε) e determinar a concentração dos PQs numa solução (Equações X, Y, Z).

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - (194,84) \quad (3.2)$$

$$CdTe \rightarrow \varepsilon = 10043(D)^{2,12} \quad (3.3)$$

$$CdSe \rightarrow \varepsilon = 5857(D)^{2,65} \quad (3.4)$$

$$CdS \rightarrow \varepsilon = 21536(D)^{2,3} \quad (3.5)$$

3.4.7 Difração de raio X

A estrutura cristalina dos PQs CdS, CdSe e CdTe podem ser tanto a estrutura *wurtzite* como blenda de zinco. As amostras sólidas foram submetidas à difração de raio X pelo método do pó, realizada no difratômetro de raio X D5005 X - Bruker AXS, do Departamento de Química da FFCLRP-USP. As análises foram realizadas, a 25°, com 2θ variando de 10 a 70°, incremento de 0,02° e tempo de integração de 1 s. Utilizando-se os difratogramas de raio X foi possível estimar o tamanho de microcristalito obtido, através da fórmula de Scherrer [83].

3.4.8 Determinação do tamanho e da distribuição do tamanho por espalhamento de luz

As análises dos tamanhos das partículas, da distribuição de tamanho e polidispersividade foram efetuadas em um equipamento de espalhamento de luz a laser DLS - (Zetasizer Nano, Malvern, Inglaterra). Soluções aquosas de PQs, foram analisadas em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico com controle da temperatura. As amostras foram preparadas em triplicata (n=3), e cada uma foi analisada trinta vezes. A análise do tamanho das partículas foi efetuada com varredura de 1 a 3000 nm para obtenção da curva da distribuição de tamanho, cálculo do diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersividade.

3.4.9 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas foi determinada utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão. As amostras foram suspensas em etanol e grades de cobre foram mergulhadas nessas suspensões para deposição das amostras. Esperou-se o solvente secar e as medidas foram realizadas num microscópio de transmissão JEOL 100DB da FMRP- USP.

3.4.10 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

As análises de ressonância paramagnética eletrônica para o composto PQ CdTe-AMP foram realizadas no espectrômetro de RPE modelo JES-FA 200, JEOL, do Departamento de Física da FFCLRP-USP, usando os seguintes parâmetros: modulação: 0,3 mT; constante de tempo de integração: 0,03 s; tempo de varredura: 1min. As medidas foram efetuadas com o PQ em solução aquosa antes e após irradiação com laser de 532 nm, em determinados intervalos de tempo. As amostras foram acondicionadas em capilares de quartzo, com volumes definidos.

3.5 Análise Fotoquímica

A capacidade de liberar NO dos complexos rutênio-nitrosilos, (RuNO), e da associação com PQs foram inicialmente realizados através de testes qualitativos, utilizando o sensor NOmeter (amino-700) pela técnica amperométrica. Numa segunda etapa foram realizadas análises quantitativas utilizando o Analisador de Óxido Nítrico, NOA 280i, por quimioluminescência, no laboratório de Fotoquímica da Universidade da Califórnia de Santa Bárbara, UCSB, durante o período de estágio Sanduíche sob supervisão do Prof. Dr. Peter C. Ford. Para analisar a interação entre ambos compostos foram realizados estudos fotofísicos e fotoquímicos qualitativos dessa associação seguido dos estudos fotoquímicos quantitativos utilizando os dados obtidos pelo NOA para a execução dos cálculos na determinação dos rendimentos quânticos de liberação de NO.

Os experimentos foram realizados utilizando diferentes fontes de irradiação, lâmpada de Mercúrio, 365nm, laser em 532 nm, e LEDs (*Light Emitting Diode*) nas

seguintes regiões, 480 nm, 530 e 560 nm combinados à filtros de barreira de longa passagem.

3.5.1 Determinação amperométrica do NO liberado

A fotólise foi realizada com acompanhamento in situ da liberação de NO gasoso, detectada diretamente por um sensor amperométrico, NOmeter (Amino-700), desenvolvido pela World Precision Instruments. Este sensor possui uma membrana seletiva de NO gasoso, com sensibilidade na faixa de 1 nM a 20 μ M, e com tempo de resposta relativamente curto, compatível com o sistema pulsado de irradiação proposto. O sinal analógico é digitalizado e registrado temporalmente utilizando um sistema de detecção CR-7 da Shimadzu e convertido ao PC pelo programa DUO.18 v 1.1.

Na avaliação amperométrica qualitativa da liberação de NO, a fonte de luz laser (Colibri, QuantumTech), foi posicionada a uma distância de 5 cm da amostra. Foram utilizados os seguintes comprimentos de onda de excitação: 355, 447 e 532 nm. A potência do laser (em mW) nesta condição foi obtida pelo radiômetro FieldMastII-TOP (Coherent). As amostras de complexo nitrosilo de rutênio e da mistura de RuNO e PQs em solução aquosa foram irradiadas. Primeiramente a solução do complexo nitrosilo foi colocada em cubeta de quartzo com alíquotas em torno de 3 mL, após estabilização da corrente e sob agitação magnética foi adicionado alíquota (50-200 μ L) da solução estoque de PQs 10^{-6} M. Aguardou-se alguns minutos para a interação dos compostos e prosseguiu-se o experimento com a irradiação da amostra. As soluções estoques de PQs foram preparadas a fim de obter concentração final de aproximadamente 100 nM na cubeta.

3.5.2 Determinação de NO liberado utilizando Analisador de Óxido Nítrico (NOA)

Na avaliação de liberação de NO pelo NOA foi utilizado uma cubeta de quartzo no formato Y (para manutenção do fluxo e gás de arraste He) com alíquotas de 3 mL, sob agitação magnética. Diferentes valores de pH e soluções tampões foram utilizadas para o estudo fotoquímico dos compostos envolvidos. A fotólise foi realizada acompanhando-se a liberação do NO gasoso in situ, detectado diretamente

por um sensor altamente sensível que utiliza a tecnologia ozônio-quimioluminescente NOA 280i (NOA), desenvolvido pela General Electric Company. Através desse método é possível medir concentrações que abrangem a escala de 1 nM a 1 mM.

Devido a instabilidade da molécula de NO, esta reage com ozônio produzindo um produto quimioluminescente (NO_2^*), cuja intensidade de luz emitida é proporcional à concentração de NO na amostra. Através de uma curva de calibração, o número de mols de NO liberado é calculado pela integral da área sob a curva dos picos obtidos pelo sinal do aparelho.

Na primeira etapa do estudo foi avaliado a liberação de NO do complexo nitrosilo em diferentes comprimentos de onda de excitação. As fontes de excitação utilizadas foram lâmpada de mercúrio (365 nm) e 2 diferentes lâmpadas de LED, (Light Emitting Diode), que emitem luz visível nas regiões azul (475 nm) e verde (530 nm). Posteriormente o estudo foi repetido avaliando a associação do complexo nitrosilo e dois pontos quânticos PQ540 e 600, ambos compostos complexo nitrosilo de rutênio e pontos quânticos) em soluções tampão citrato, pH = 3,6 e fosfato, pH = 7,4 nas concentrações de 10 mM e 50 mM respectivamente. Nessa segunda etapa duas fontes de irradiação LED foram utilizadas, azul verde (530 nm), ambar (560 nm).

3.5.3 Calibração do NOA

A calibração do aparelho NOA foi realizada através de soluções diluídas do padrão NaNO_2 em diferentes concentrações, 0 a 100 μM em água milique. O suprimento de O_2 ($6 \pm 0,2 \psi$) e o fluxo de gás de arraste He (pressão entre 5-11 torr) foram mantidas em todos os experimentos. A leitura de cada amostra injetada (5 μL) nas diferentes concentrações foi repetida 3 vezes. O aumento da concentração de NO liberado foi proporcional à concentração do padrão.

A calibração é baseada na liberação de NO resultante da reação:

3.5.4 Medida da intensidade de luz incidente (I_s)

A intensidade de luz incidente é o número de fótons por segundo emitidos pela fonte de luz. Nos experimentos usando LEDs como fonte de excitação os valores de I_s foram determinados pelo método Power Meter". No caso da lâmpada de Hg o cálculo de rendimento quântico foi determinado utilizando-se o método de actinometria.

3.5.5 Procedimento para a actinometria

De acordo com a IUPAC[84], a actinometria é utilizada para determinar o rendimento quântico em um determinado comprimento de onda de modo acurado. No caso do estudo fotoquímico com lâmpada de mercúrio, $\lambda_{ex} = 366$ nm, ferrioxalato de potássio será usado como padrão.

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução A: ferrioxalato de potássio $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$ $6,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} : preparada pela diluição de 0,147 g do sal em 5,0 mL de ácido sulfúrico 1,0 mol L^{-1} e diluído a um volume final de 50,0 mL.
- Solução B: preparada pela mistura de 60,0 mL de acetato de sódio 1,0 mol L^{-1} e 36,0 mL de ácido sulfúrico 1,0 mol L^{-1} e diluído a um volume final de 100,0 mL (pH = 1,00).
- Solução C: solução 0,10 % de 1, 10-fenantrolina.

A actinometria foi realizada em ambiente protegido da luz (sala escura) mantendo-se apenas uma luz vermelha acesa. Numa cubeta de quartzo foram adicionados 3,0 mL (V_1) de solução A e 2,0 mL a um balão volumétrico de 5,0 mL (solução controle).

A solução na cubeta foi irradiada durante um determinado tempo (t), em 365 nm. Desta solução irradiada foram transferidos 2,0 mL (V_2) para um balão volumétrico de 5,0 mL (V_3). A este balão, assim como ao balão da solução controle, foram adicionados 1,0 mL da solução B e 0,4 mL da solução C. Os volumes dos balões foram completados com água. As soluções foram agitadas e deixadas no escuro durante 1 h.

Mediu-se a absorbância da solução controle no comprimento de onda de irradiação, 365 nm e em 510 nm. A absorbância da solução irradiada foi medida em 510 nm. Este procedimento foi repetido após irradiação da solução de 30 s.

3.5.6 Cálculo de I_s utilizando-se ferrioxalato de potássio

O ferrioxalato de potássio quando irradiado, principalmente na faixa de 253 nm a 577 nm, sofre várias reações [84]. O produto $[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]^{2-}$ não absorve a luz incidente e os íons Fe(II) podem ser determinados mediante a formação de um complexo vermelho com 1,10-fenantrolina.

A formação do complexo de Fe(II) com 1,10-fenantrolina pode ser acompanhada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 510 nm, sendo dessa forma a intensidade de luz incidente medida pela expressão:

$$I_s = \frac{n_{Fe}}{\phi_{Fe} t (1 - 10^{abs})} \quad (3.7)$$

Sendo: ϕ_{Fe} = rendimento quântico de formação do ferro (1,22 em 355 nm);
 t = tempo de irradiação;
 abs = absorbância da solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ no comprimento de onda de excitação (355 nm).

O número de íons Fe(II) formado na solução actinômetro é determinado através da fórmula:

$$n_{Fe} = \frac{6,02 \times 10^{20} abs(510nm) V_1 V_3}{\varepsilon v_2 l} \quad (3.8)$$

Onde: $abs(510 \text{ nm})$ = medida da densidade óptica da solução em 510 nm;
 V_1 = volume da solução do actinômetro irradiado (mL);
 V_2 = volume da alíquota tomada para análise (mL);
 V_3 = volume final para o qual a alíquota foi diluída (mL);
 l = comprimento da cubeta espectrofotométrica (cm);
 ε = valor do coeficiente de absortividade molar do complexo de Fe(II) com fenantrolina ($1,11 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$).

Os valores de $(I_s \times t)$ calculados foram colocados em um gráfico em função do tempo de irradiação t (5s, 10s, 15s e 20s). A inclinação da reta obtida foi o valor de

I_s utilizado para calcular os rendimentos quânticos. Esse procedimento faz com que a influência da variação de energia da rede elétrica do laboratório seja minimizada.

3.5.7 Cálculo do rendimento quântico (ϕ)

Através dos dados amperométricos obtidos pelo eletrodo de NO foi possível determinar o número de mol de óxido nítrico que sofreu reação fotoquímica, considerando-se a fotoaquação do NO. Pôde-se, dessa forma, calcular o rendimento quântico em relação a esse ligante (ϕ_L) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\phi_L = \frac{n_L}{I_s t (1 - 10^{-abs})} \quad (3.9)$$

Onde: n_L = número de mols de NO liberados pela fotoreação;

I_s = intensidade da luz incidente ;

t = tempo de fotólise (s);

$1 - 10^{-abs}$ = quantidade de luz absorvida pela amostra, onde abs é o valor da absorbância da amostra no comprimento de onda de irradiação.

3.6 Estudo de cinética na interação PQ e o complexo nitrosilo

O experimento de cinética foi utilizado para determinar o tempo de vida dos transientes formados e os comprimentos de onda adequados foram escolhidos acompanhando a reação por meio de variação espectral na região do UV-Vis. A reação foi estudada em condição de pseudo primeira ordem com excesso de complexo nitrosilo em relação ao PQ. O experimento foi realizado com solução tampão em pH 5,0 (tampão citrato). A temperatura ($25 \pm 0,2$ °C) foi controlada por meio de um banho termostático. O estudo de cinética utilizou um espectrofotômetro com sistema de stopped-flow, PBP Spectra Kinetic monochromator 05-109 Photophysics, localizado no laboratório do Prof. Dr. Ford.

3.7 Análise da Interação entre os compostos pela equação de Stern-Volmer

A equação de Stern-Volmer, proposta por Otto Stern e Max Volmer, relaciona a extinção da fluorescência do fluoróforo na presença de diferentes concentrações de um agente supressor ou *quencher* (Q).

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3.10)$$

I_0 e I são as intensidades das fluorescências na ausência e na presença do *quencher*; $[Q]$ = concentração da espécie supressora e K_{SV} = constante de Stern-Volmer [44].

Através do gráfico construído a partir dos resultados, obtêm-se a constante de Stern-volmer para o processo. Pela análise dos dados em diferentes temperaturas pode-se inferir qualitativamente o mecanismo de interação envolvido no processo, podendo ser este estático ou dinâmico. Pela modificação da equação de Stern-Volmer outros parâmetros podem ser determinados como constante de ligação e números de sítios de interação.

3.8 Análise da Interação entre os compostos por eletroforese

Neste experimento o protocolo de execução e preparo do gel sofreu algumas alterações: Numa cuba de eletroforese, o gel de agarose 1%, preparado sem adição do brometo de etídio, foi submergido no tampão de corrida, solução TAE 1X (Tampão Tris-Acetate - Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). As amostras contendo apenas o PQ (CdTe-MPA) e a mistura de PQ e *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]₃₊ em diferentes concentrações foram aplicadas em cada poço após adição de 4 μ L de solução aquosa de glicerina (30%). A corrida foi realizada a 90 V por 20-50 min, em seguida as bandas no gel foram observadas sob a luz ultravioleta.

3.9 Ensaios biológicos e análise de Imagem

3.9.1 Estudos *in vitro*

No intuito de avaliar a atividade citotóxica e antitumoral do complexo nitrosilo de rutênio, do PQ CdTe-AMP e a associação de ambos, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando células de linhagem de melanoma murino (B16-F10).

3.9.2 Material biológico ou material celular

As células de fibroblasto e melanoma foram adquiridas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células B16-F10 são melanócitos extraídos a partir de melanoma de pele de camundongos (*Mus musculus*) (C57BL/6J) (BCRJ CR010).

3.9.3 Meios de Cultivo Células melanoma murino (B16-F10)

Para o cultivo das células de melanoma da linhagem B16-F10 usou-se o meio de Cultura RPMI-1640 (Sigma-aldrich®) com 25 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio). O meio foi preparado em cerca de 900 mL de água, onde foi adicionado o conteúdo do envelope e acrescentados 4,500 g de glicose e 1,500 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, o pH da solução foi ajustado a 7,4 e o volume completado para 1 L. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 mm filtro e recolhido em frasco estéril. Para verificação de eventuais contaminações, foram reservadas duas alíquotas de 5 mL as quais permaneceram incubadas por 48 horas em estufa (5% CO₂) a 37°C.

Antes do meio ser utilizado no cultivo das células foram acrescentados penicilina (10.000 Ui) e estreptomicina (10 mg/mL) como antibióticos, anfotericina B (Gibco, USA) como antimicótico (25µg/mL) e 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco, USA), previamente esterilizado. As células da linhagem B16-F10, melanoma murino, foram cultivadas em garrafas de cultura, em meio RPMI e mantidas em atmosfera úmida com concentração controlada de 5% CO₂, com troca de meio em média a cada 2 dias.

3.9.4 Ensaios de citotoxicidade dos compostos

Ao atingir aproximadamente 90 % de confluência nas garrafas de cultura, as células foram tripsinizadas utilizando-se solução de Tripsina/EDTA e 2×10^4 células/poço foram plaqueadas em placas contendo 96 poços, valor mantido como referência durante toda a pesquisa. As placas foram em seguida incubadas em estufa com controle de temperatura, umidade e CO_2 e ao completar 24 horas para a adesão das mesmas às placas, o meio de cultura foi trocado e foram adicionadas as soluções do veículo (água) e dos compostos *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) $_2$] $_{3+}$, PQ540 CdTe-AMP e solução contendo a mistura.

Depois desta etapa, as células tratadas foram mantidas em estufa por diferentes períodos de incubação (4, 24 horas). Foram realizados no mínimo dois experimentos independentes em triplicata para cada tempo analisado. Posteriormente, foi analisado a resposta citotóxica dos compostos quando submetidos a irradiação, utilizando placa de 96 poços contendo LEDs posicionados individualmente em cada poço. O comprimento de onda de excitação foi de 527 nm. Em seguida todos os experimentos (na ausência e presença de irradiação) foram submetidos a análise da viabilidade celular.

3.9.5 Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

Após o período de incubação, foi retirado o meio e adicionados 180 mL do mesmo meio, sem o indicador vermelho de fenol. A cada um dos poços também foram adicionados 20 μL de solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio].

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico comumente usado como medida de capacidade das enzimas mitocondriais reduzirem o sal de tetrazolio MTT ($\lambda_{\text{MAX}} = 600\text{nm}$; cor amarelada) a formazan, em um produto de coloração violácea ($\lambda_{\text{MAX}} = 470\text{nm}$). O princípio deste método consiste no fato de que células vivas, em crescimento têm mitocôndrias competentes (promovendo a respiração celular), portanto irão converter o MTT no produto corado violeta. Já as células mortas ou em processo de morte celular, essa função mitocondrial encontra-se comprometida, não havendo conversão do MTT no produto corado. Este é um ensaio de medida

de viabilidade celular por método colorimétrico, cuja intensidade da cor permite a determinação da quantidade de células viáveis, partindo da quantidade de enzimas presentes nas mitocôndrias das células vivas capazes de realizarem a reação.

Após a adição do MTT, as células foram incubadas em estufa, nas mesmas condições já descritas, por mais 3 horas [85]. Em seguida o conteúdo foi removido, sendo adicionados posteriormente 200 μ L de DMSO para solubilizar o precipitado formado pela redução do sal. As absorbâncias foram obtidas 570 nm em leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%celulasvivas = (D.O.experimento/D.O.controle) \times 100\% \quad (3.11)$$

Para a interpretação dos resultados, as médias de viabilidade celular obtidas foram subtraídas do valor médio de absorbância do grupo branco, no qual não foi adicionado o complexo e sim quantidade equivalente de água mili-Q, a mesma utilizada para solubilizar os complexos. Os valores foram expressos em percentuais e comparados com o grupo controle não tratado (somente células com meio de cultivo). Quando a absorbância é menor do que a obtida para o grupo controle tem-se um indicativo de proliferação celular reduzida ou morte celular.

Dentre os fatores que podem interferir nesse tipo de ensaio estão relacionados a possíveis contaminações do reagente com substâncias redutoras, células ou microorganismos; a exposição da placa à luz; aos erros relacionados ao cálculo do número de células por poço ou ao volume pipetado; a diminuição do tempo de incubação da cultura com a solução de MTT, a diminuição do tempo de incubação necessário para solubilização e as técnicas de cultura inadequadas que venham a comprometer o crescimento celular [86].

3.9.6 Teste de internalização celular e posterior análise por espectroscopia de absorção atômica em células B16-F10.

A internalização do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ nas células de melanoma B16-F10 foi quantificada pela presença de átomos do íon metálico rutênio utilizando a técnica de espectroscopia de absorção atômica (ELAN

Figura 3.4: Representação da reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais.

DRC II PerkinElmer) com plasma indutivamente acoplado. As células foram incubadas por 4h (6×10^{-4} células/poço em placas de 12 poços) com o complexo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]₃₊, tripsinizadas, lisadas (CellLytivtmM Cell-sigma) e centrifugadas (1200 rpm) a fim de se obter a fração citosólica. No momento da análise, as amostras foram diluídas (1:50) em HNO₃ (1%). Desempenho de ICP-MS: Potência (W) = 1100; Fluxo de gás (L min⁻¹) = 0,52.

3.9.7 Análise de Imagem por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Confocal

As imagens foram observadas com a utilização do equipamento Time-resolved Fluoresce Microscope, Microtime 200-Pico Quant na FFCLRP. A cultura de 24 horas das células da linhagem B16-F10 foi observada utilizando λ_{exc} 470nm e filtro em 488nm, 4 horas após adição dos compostos.

As imagens observadas no microscópio confocal Leica TCS-SP5 AOBS foram obtidas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) situado no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP utilizando λ_{exc} 488nm e λ_{em} entre 514-570 nm. As imagens obtidas no microscópio de fluorescência Eclipse Ti, Nikon, foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Roberto Santana. Para a análise das imagens foram utilizados os filtros DAPI e GFP de λ_{exc} nas regiões de 340-380 nm e 440-480 e λ_{em} em 435-485 nm e 535-550 nm respectivamente. O corante Hoechst foi utilizado para demarcar o núcleo celular, emitindo fluorescência em 416 nm (de coloração azul) quando λ_{exc} 350 nm.

3.9.8 Encapsulamento do CdTe-AMP em lipossoma.

O uso de sistemas particulados como microemulsões e lipossomas tem sido utilizados como carreadores de fármacos que auxiliam na melhor permeabilidade e proteção do fármaco no organismo promovendo uma concentração terapêutica através da liberação prolongada.

Os PQs CdTe-AMP foram encapsulados em lipossoma unilamelares, preparados por injeção etanólica de uma mistura de 1- α -fosfatidilcolina (DPPC) e colesterol sob 5 mL de solução aquosa do PQ CdTe-AMP (1×10^{-7} M), sob agitação, a um fluxo constante de 300 $\mu\text{L/h}$, a 56 °C (Figura 3.5). No final da reação, a solução foi levada para análise de tamanho de partículas por DLS. Espectros de absorção no UV-vis e de fluorescência foram realizados.

Figura 3.5: Equipamento utilizado para encapsulamento do PQ CdTe-AMP.

4 *Síntese e Caracterização dos Complexos nitrosilos de rutênio e Pontos Quânticos*

4.1 Síntese dos complexos nitrosilo de rutênio

Complexos nitrosilo de rutênio são geralmente descritos como Ru(II) e o ligante como NO⁺ [87, 88, 89].

Para obtê-los, existem diferentes possibilidades de rotas sintéticas:

- Borbulhamento de NO gasoso em uma solução aquosa de uma espécie precursora que contenha o fragmento Ru^{III}-H₂O. .
- Adição de ácido à solução de uma espécie precursora que contenha o ligante NO₂⁻ coordenado ao metal (conhecidos como nitro complexos de rutênio):

Essa reação é reversível e depende do pH, considerada como um equilíbrio ácido-base [35, 18].

4.1.1 *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₃

A síntese desta espécie foi baseada na rota descrita por Ershov (2004) [18]. Algumas modificações em relação àquela descrição durante a precipitação do sólido nas etapas descritas nos itens 3.1.4 e 3.1.5, resultaram em maior rendimento. A inserção do ligante L derivado piridínico na esfera de coordenação do íon metálico Ru(II), descrita no item 3.1.4 da Parte Experimental ocorre após reação de redução do ligante NO⁺ da espécie *cis*-[Ru(NO)(NO₂)(bpy)₂]²⁺ com azida de sódio e coordenação da molécula de solvente (S).

O ataque nucleofílico do íon azoteto é esperado em complexos nitrosilo de rutênio em que o ligante nitrosil possui forte caráter eletrofílico [88, 89].

4.1.2 *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)]²⁺

Na síntese do complexo nitrosilo *trans*-[Ru((NO)Cl([15]aneN₄))] ²⁺ a redução do complexo *trans*-[RuCl₂([15]aneN₄)]PF₆ foi realizado com amálgama de zinco com posterior adição de NaNO₂. Com isso, formou-se uma espécie intermediária, *trans*-[RuCl(NO₂)([15]aneN₄)] a qual foi convertida em *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)]²⁺ pela adição de HCl concentrado (1,0 mL) conforme a reação química descrita a seguir:

4.2 Caracterização dos complexos de rutênio

4.2.1 Análise Elementar

O complexo nitrosilo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₃ e o complexo nitrosilo *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)]Cl₂ foram submetidos à análise elementar para carbono, nitrogênio e hidrogênio. Os resultados destas análises (Tabela 4.1) foram bastante satisfatórios o que nos permitiu concluir que a fórmula proposta é coerente com a descrição molecular obtida para os complexos nitrosilos estudados neste trabalho.

4.2.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺

Os complexos nitrosilos com ligantes polipiridínicos tem sido estudados desde a década de 70 [70] e vários compostos foram sintetizados tendo suas propriedades químicas e fotoquímicas descritas na literatura [19]. Uma das suas principais características é a capacidade de transferir elétrons e energia no estado excitado. Ao irradiar a banda de TCML, um dos ligantes monodentados iônicos é perdido e uma molécula do solvente (S) é coordenada.

Compostos	% teórica	% experimental
<i>cis</i> -[Ru(NO ⁺)(4-ampy)(bpy) ₂](PF ₆) ₃	C= 30,86	C=31,05
	N = 10,10	N=10,05
	H= 2,22	H=2,28
<i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄)]Cl ₂	C= 29,20	C= 28,90
	N = 15,50	N = 15,00
	H = 4,87	H = 4,77

Tabela 4.1: Resultados encontrados na análise elementar dos compostos nitrosilos.

Espectros na região do UV-visível de complexos de rutênio, com ligantes insaturados coordenados apresentam, geralmente, bandas na região do visível, atribuídas a transições de campo ligante (CL) e a transferência de carga (TCML), e bandas na região do ultravioleta, atribuídas a transições internas do ligante (IL), [90].

- Transições de campo ligante são observadas entre níveis energéticos localizados no metal. As bandas são originadas pela quebra da degenerescência dos orbitais d (transições d→d), que num campo octaédrico podem ser designados por t_{2g} e e_g
- Compostos com rutênio com ligantes insaturados [15] são caracterizados por uma ligação π característica de transições de transferência de carga ou elétron do metal para o ligante (TCML). Estas transições apresentam coeficiente de máxima absortividade molar (ϵ) da ordem de $10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e normalmente localizam-se na região do visível. A ocorrência dessas bandas depende da existência de orbitais de simetria apropriadas no metal e no ligante, com energias pouco diferentes e grau de recobrimento diferente de zero. Uma vez que os elétrons de valência do íon metálico se encontram em orbitais de simetria π e considerando que os orbitais desocupados dos ligantes de menor energia também possuam simetria π , a transição mais provável é, portanto, $d\pi(\text{M}) \rightarrow p\pi^*(\text{L})$.

- As transições internas do ligante (IL) são semelhantes às transições observadas nos ligantes insaturados não coordenados. Por exemplo, os ligantes aromáticos n-heterocíclicos livres, ou não coordenados, geralmente apresentam, na região do ultravioleta próximo e médio, bandas de transição eletrônica atribuídas a $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. As transições envolvendo os elétrons livres (n) ocorrem em regiões de maior comprimento de onda e são relativamente fracas. As transições envolvendo os elétrons π são bastante intensas sendo muito semelhante às observadas para os hidrocarbonetos aromáticos correspondentes.

Godwin & Meyer [35] relataram a síntese e caracterização do complexo *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂] que apresenta bandas de absorção no UV-vis em 230 e 350 nm, atribuídas à IL e TCML, respectivamente. Em meio ácido, este complexo origina a espécie *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)]²⁺ que foi isolada na forma de sal hexafluorofosfato.

Para o complexo *cis*-[Ru((NO)(4-ampy)(bpy)₂)]³⁺, o espectro de absorção na região do UV (Figura 4.1) apresentou uma banda em torno de 300nm e um ombro em 332 nm. As bandas em 248 nm e 300 nm podem ser atribuídas à transição interna ($\pi \rightarrow \pi^*$) do ligante insaturado devido à bipyridina, 4-aminopiridina e ao NO⁺. O ombro na região de 332 nm pode ser atribuído à transferência de carga metal ligante (TCML) devido à transição $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$, ou $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ e/ou $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(4\text{-ampy})$.

Figura 4.1: Espectro de absorção na região do UV-visível, em HCl 0,1 mol.L⁻¹, do complexo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ 2,0 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹.

O espectro eletrônico do complexo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]⁺ é dependente do pH do meio, sugerindo reatividade em função da concentração de íons hidroxilas. A espécie *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]⁺, quando em solução tampão 7,4 por

exemplo, apresenta uma banda em 286 nm, um discreto ombro em 332 nm e uma larga banda em 426 nm (Figura 4.2). Sua caracterização foi realizada em analogia aos dados da literatura descritos por Godwin & Meyer e Sauerbrey [35, 17]). As bandas em 245 e 296 nm foram atribuídas à transição interna ($\pi \rightarrow \pi^*$) dos ligantes insaturados bipyridina e 4-aminopiridina. A banda na região de 426 nm pode ser atribuída à transferência de carga metal ligante (TCML) devido à transição $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ e/ou $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(4\text{-ampy})$ por analogia a sistemas similares [18, 17]).

Figura 4.2: Espectro de absorção na região do UV-visível, em tampão fosfato (pH 7,4) do precursor complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^+ 2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

O estudo espectroscópico torna-se imprescindível naquilo concernente ao entendimento da reatividade fotoquímica. A descrição das naturezas das transições eletrônicas dos espectros mostrados nas Figuras 4.1 e 4.2 serão posteriormente utilizadas na descrição relativa a produção de NO. A dependência do espectro eletrônico em função do pH é característico de compostos rutênio nitrosilo [18, 30, 19, 28] e seus aspectos serão discutidos em item pertinente a reatividade.

4.2.3 Estudo da estabilidade química e fotoquímica dos compostos nitrosilos discutidos neste trabalho

Um dos objetivos desse trabalho é avaliar a liberação de NO dos complexos rutênio-nitrosilo em cultura de células por isso a compreensão e avaliação da

estabilidade dos compostos torna-se imprescindível.

Uma das observações feitas no desenvolvimento do projeto, relaciona-se ao efeito do pH. No intuito de se observar a estabilidade dos compostos, uma solução aquosa do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ ($10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), pH 4,0 - tampão acetato, foi preparada e mantida na ausência de luz e comparada ao perfil espectrofotométrico de outra solução, porém em meio de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 4.3). Claramente se observa alteração espectroscópica daquela solução em pH 4,0, com o surgimento de uma banda na região do visível ($\approx 426 \text{ nm}$), em função do tempo. Variação na região do UV também foi observada. Nenhuma alteração espectroscópica (Figura 4.3) fora feita após o tempo de 180 min.

Figura 4.3: Variação espectral do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ na ausência de luz em (A) solução aquosa em HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ após 24 h ; (B) em tampão acetato (pH 4) no período de 0-180 minutos.

Baseado nestes resultados e considerando-se similaridade de comportamento espectroscópico a compostos previamente relatados na literatura [18], a estabilidade do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ fora feito em função do pH. Para tanto considerou-se tempo de análise espectroscópica de pelo menos 3 horas da dissolução do complexo em solução.

A alteração espectral do complexo foi atribuída ao equilíbrio formado entre duas espécies. À medida que o valor de pH aumenta, observa-se a formação de uma banda em 426 nm (Figura 4.4). O valor de pH onde encontra-se o equilíbrio entre as duas espécies é 4,62 [71]. Esta segunda espécie corresponde à formação do complexo nitro, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^+$ conforme mostrado previamente no

Figura 4.4: Variação espectral do complexo $\text{cis-}[Ru(NO)(4\text{-ampy})(bpy)_2]^{3+}$ em solução aquosa de diferentes valores de pH.

esquema abaixo:

Após a observação de que o complexo $[Ru(NO)(4\text{-ampy})(bpy)_2]^{3+}$ é estável no escuro quando em meio acidificado e sua variação espectral é dependente do tempo e do valor de pH, avaliamos o comportamento espectroscópico e cronoamperométricos deste composto quando na presença de luz, utilizando irradiação em 447 nm.

A incidência luminosa pode propiciar reações de oxidação e redução de ligantes ou mesmo das moléculas de solvente. Este processo tem sido observado entre complexos metálicos com número de oxidação mais baixos, como o rutênio (II), e fortes ligantes π -receptores como NO^+ , piridina e a bipyridina [91].

A variação do espectro de absorção do complexo foi acompanhada em duas soluções tampão de pH diferente, tampão acetato pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,4. O espectro de ambas soluções foi registrada antes e após fotólise como pode ser observado na Figura 4.5.

Após irradiação foi observado diminuição da banda em 426 nm e a formação de uma nova banda na região de 480 nm (Figura 4.5). O surgimento dessa banda é coerente à atribuição da banda de formação do fotoproduto, complexo aquo, quando

Figura 4.5: Variação espectral do complexo $cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)_2]^{3+}$ em (A) solução tampão acetato pH 4,0 e (B) em tampão fosfato pH 7,4, antes da irradiação e após irradiação em 447 nm por 5 minutos.

comparada a sistemas similares como descrito por Sauaia e colaboradores (2003) para o complexo $cis-[Ru(NO)(bpy)_2(py)]^{3+}$ (py= piridina).

Utilizando-se sensor de NO, pode-se registrar a variação da corrente concomitante ao processo de irradiação luminosa. Observou-se perfil de liberação de NO tanto do complexo em solução tampão acetato (pH 4,0) como em solução tampão fosfato (pH 7,4) (Figura 4.6).

Considerando-se a concentração das amostras como sendo as mesmas, a maior corrente observada é diretamente relacionada a maior concentração de NO, o que é evidenciado para o gráfico da Figura 4.5b, em que o composto foi dissolvido em solução tampão pH 7,4. Levando-se em conta o valor relacionado ao pKa para $cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)_2]^{3+}$ (pKa = 4,6) a expectativa é de que a concentração de $cis-[Ru(NO_2)(4-ampy)(bpy)_2]^+$ na solução de pH 4,0, seja realmente menor, se comparado àquela de pH 7,4. Isto é claramente evidenciado pelo espectro do composto da Figura 4.5. Como o equilíbrio $[RuNO]^{3+} \leftrightarrow [RuNO_2]^+$ não é restabelecido imediatamente (Figura 4.4), a quantidade de NO obtida por irradiação luminosa na solução de pH = 4,0 acontece, à sua exaustão, num tempo maior que aquele de pH 7,4.

Em complexos de rutênio polipiridínicos, descritos na literatura [28], pode-se afirmar que a espécie NO^0 é obtida quando o estado de transição TCML $d\pi (Ru^{II}) \rightarrow \pi^* (NO^+)$ é populado ao ser irradiado no comprimento de onda de 355 nm ou

Figura 4.6: Cronoamperograma: liberação do NO do complexo $[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)_2]^+$ em (A) tampão acetato (pH 4,0) e (B) solução tampão fosfato pH 7,4 após fotólise ($\lambda_{exc} = 447\text{ nm}$).

447 nm, com consequente fotolabilização do ligante nitrosilo resultando na espécie $[Ru(4-ampy)(bpy)_2(H_2O)]^{2+}$ como fotoproduto da liberação e o seguinte espectro de UV (Figura 4.7).

Figura 4.7: Espectro de absorção na região do UV-visível, em solução aquosa complexo $cis-[Ru(bpy)_2(4-ampy)(NO)]^{3+}$ $2 \times 10^{-5}\text{ M}$, antes (cinza) e após irradiação (preto) em 447 nm. Detalhe para a formação da banda em 485 nm.

Tendo-se em vista a reatividade fotoquímica discutida em trabalhos do grupo, para compostos do tipo $cis-[Ru(NO_2)(bpy)_2L]^{n+}$ ([19, 18]) é lícito supor semelhante processo para a espécie $cis-[Ru(NO_2)(4-ampy)(bpy)_2]^+$. Neste caso

processo relacionado a cisão homolítica do ligante nitrito é visto como aquele relacionado a produção de NO. Outro mecanismo de fotolabilização de NO de nitro complexos foi descrito propondo a fotoaquação e posterior labilização de NO a partir da excitação fotoquímica do ânion nitrito conforme reação.

Os dados de variação espectroscópica e a liberação de NO após fotólise em 447 nm corroboram no mecanismo fotoquímico proposto, conforme descrito em estudo prévios [28, 17]).

4.2.3.1 *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)]Cl₂

No espectro do precursor *trans*-[RuCl₂([15]aneN₄)]PF₆ (Figura 4.8) observa-se duas bandas na região do UV-vis, em 314nm e 362 nm que são caracterizadas por transições de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM). Essas transições correspondem à excitação eletrônica do orbital de simetria $p\sigma$ ou $p\pi$ do cloro para um orbital $d\sigma^*$ ou $d\pi^*$ de baixa energia do rutênio, consistindo em quatro possíveis transições, $p\pi - d\pi^*$, $p\sigma - d\pi^*$, $p\pi - d\sigma^*$ e $p\sigma - d\sigma^*$, das quais duas são mais facilmente observadas pela região que aparecem e pela intensidade que possuem.

No complexo *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)]Cl₂, duas bandas foram observadas na região do UV-vis (Figura 4.9), sendo uma em 268 nm e a outra em 352 nm. A banda em 268 nm foi atribuída como (TCLM) $\{\pi P(Cl) \rightarrow e_g(Ru)\}$ e a de 352 nm, uma banda do tipo campo ligante: CL (d-d) com provável contribuição de uma segunda banda de TCML do tipo $\{d\pi(Ru^{II})-\pi^*(NO^+)\}$. As atribuições aqui fixadas, deve-se principalmente aos análogos descritos na literatura [72]. Sob irradiação luminosa na região UV, em pH 7,4, o fotoproduto apresenta espectro semelhante à espécie *trans*-[RuCl(OH)([15]aneN₄)]⁺. Assim a

Figura 4.8: Espectro na região do UV-vis do composto $\text{trans-[RuCl}_2\text{([15]aneN}_4\text{)]}^+$ $4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em solução em $\text{HCl } 1,2 \text{ mol L}^{-1}$.

fotólise de $\text{trans-[RuNOCl([15]aneN}_4\text{)]}^{2+}$ gera como único produto, a espécie aquo correspondente (Figura 4.10)

Figura 4.9: Espectro na região do UV-vis do complexo $\text{trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN}_4\text{)]}^{2+}$ em solução tampão pH 7,4 na concentração $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Em todos os complexos nitrosilos descritos nesse trabalho, a banda de TCML apresenta-se como sendo de baixa intensidade e localizada na região do UV. Estas características nos leva a crer em uma grande diferença de energia entre os principais orbitais que compõem o sistema. A discussão é pertinente em função da possibilidade de usar compostos rutênio nitrosilo em ensaios fotobiológicos haja visto que por irradiação luminosa, a população dos orbitais π^* (NO^+) culminaria na sua redução e posterior liberação de NO^0 , e seu aproveitamento em fotobiologia seria limitado

Figura 4.10: Espectro na região do UV-vis do complexo $\text{trans-[RuCl(H}_2\text{O)([15]aneN}_4\text{)]}^{2+}$ (cinza) produto da fotólise do $\text{trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN}_4\text{)]}^{2+}$ em 355nm (preto) na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

face ao uso de irradiação UV. A completa descrição do sistema se fez necessário para fundamentar estudos futuros desenvolvidos com estes compostos.

A Tabela 4.2 resume os dados espectrofotométricos na região do UV-vis dos complexos nitrosilo.

Tabela 4.2: Resultados de análise de espectros na região do UV-visível para o complexo de rutênio em solução aquosa.

Complexo	λ (nm) ($\log \varepsilon$)
$[\text{Ru(NO}_2\text{)}(4\text{-ampy)}(\text{bpy})_2]^+$	286 (4,59); 426 (3,90) ^a
$\text{cis-[Ru(NO)(bpy)}_2\text{(4-ampy)]}^{3+}$	245 (4,52); 300 (4,37); 332 (3,99);
$\text{trans-[RuCl}_2\text{([15]aneN}_4\text{)]PF}_6$	314 (3,19); 362 (3,34)
$\text{trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN}_4\text{)]}^{3+}$	268 (3,65); 352 (2,38)

^a ERSHOV, (2004).

4.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A técnica de absorção na região do infravermelho é muito utilizada para verificar a coordenação de NO^+ ao íon metálico rutênio(II); o espectro do complexo deve apresentar uma banda intensa no intervalo de 1800 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . A variação da frequência de estiramento (νNO) em compostos de coordenação depende

do metal, dos co-ligantes e da estereoquímica do ligante NO [15].

Na Figura 4.11 pode-se observar o espectro infravermelho dos complexos *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂] e *cis*-[Ru(NO)(NO₂)(bpy)₂](PF₆)₂. A ligação entre o metal e o compostos nitro em complexos pode exibir bandas simétrica (ν_S) e assimétrico (ν_{AS}). Na Figura 4.11a, os dois grupos de picos na região de 1335 e 1290 cm⁻¹ correspondem a típicas posições para estiramentos assimétricos e simétricos respectivamente. As bandas observadas na região de 1600 a 1400 cm⁻¹ são características dos anéis aromáticos da molécula bipyridina. Na Figura 4.11b destaca-se a presença da banda em 1948 cm⁻¹ para o composto nitrosilo, que indica a coordenação do NO⁺ ao rutênio. Esta banda, atribuída como estiramento NO⁺ (ν_{NO}) na forma Ru^(II)NO⁺. Outra região característica da bipyridina é encontrada entre 11261 a 1000 cm⁻¹ também considerados característicos da molécula 2,2 bipyridina ligada ao metal [92].

Figura 4.11: Espectro na região do infravermelho dos precursores A) *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂](PF₆) e B) *cis*-[Ru(NO)(NO₂)(bpy)₂](PF₆)₂⁺ obtida em pastilhas de KBr.

O espectro infravermelho do complexo *cis*-[Ru(NO)(4-amp)(bpy)₂](PF₆)₃, Figura 4.12, apresentou uma banda de estiramento na região de 1940 cm⁻¹, característica de complexo de rutênio que contém o ligante NO⁺. Também foram

observadas, para ambos compostos, bandas em torno de 1616 cm^{-1} (C=C) e 1550 cm^{-1} (C=N), características de estiramentos do anel piridínico [93]. Algumas atribuições destas bandas estão destacadas na Tabela 4.3.

Figura 4.12: Fórmula estrutural do complexo $\text{cis-}[Ru(NO)(4\text{-ampy})(bpy)_2]^{3+}$. Átomo Ru (verde escuro); N (azul); C (cinza); O (vermelho).

Tentativa de Atribuição	Estiramento	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
Anéis Pirimídicos	C=C	1400-1600
	C=N	1554
	C=C	730 - 790
Ácido carboxílico	C=O	1690
	O-H	3400 - 2400

Tabela 4.3: Atribuição de algumas das bandas de absorção na região do infravermelho para o complexo $\text{cis-}[Ru(NO^+)(4\text{-ampy})(bpy)_2](PF_6)_3$.

O espectro de infravermelho do composto $\text{trans-}[Ru(NO)Cl([15]\text{aneN}_4)]Cl_2$ e de seu precursor $\text{trans-}[RuCl_2([15]\text{aneN}_4)]PF_6$, Figura 4.13 respectivamente, mostram-se semelhantes para os dois compostos na região de 3500 a 1900 cm^{-1} . Na região abaixo de 1000 cm^{-1} , o espectro do composto $\text{trans-}[RuCl_2([15]\text{aneN}_4)]PF_6$, apresentou duas bandas intensas atribuídas ao PF_6^- . Em 1886 cm^{-1} é observada uma banda a qual indica a coordenação do NO^+ ao rutênio (II).

A baixa energia do modo de estiramento NO^+ , em comparação ao complexo com ligante bipyridina, é tomada como característica de uma forte retrodoação $Ru^{(II)}NO^+$.

A diminuição da energia da banda ν_{NO} nos complexos macrocíclicos de certa

Figura 4.13: Fórmula estrutural do complexo $\text{trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN}_4\text{)]Cl}_2$. Átomo Ru (verde escuro); N (azul); C (cinza); O (vermelho); Cl (verde claro). Espectro na região do infravermelho para o complexo $\text{trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN}_4\text{)]Cl}_2$ (A) e para o seu precursor $\text{trans-[RuCl}_2\text{([15]aneN}_4\text{)]PF}_6$ (B)

forma é esperada, face principalmente ao efeito nefelauxético observado pelo ligante. O ligante macrociclo é uma amina secundária e portanto há uma maior densidade eletrônica sobre o íon metálico. Isto proporciona uma maior densidade eletrônica dos orbitais π -antiligante do ligante nitrosil quando comparado aos complexos com ligantes monodentados.

A característica π -doadora do ligante $[15]\text{aneN}_4$, enriquece a densidade eletrônica dos orbitais t_{2g} do metal e conseqüentemente uma maior interação entre esses orbitais e o ligante π^* (NO).

Tabela 4.4: Energia vibracional do NO^+ dos complexos rutênio-nitrosilos.

Complexos	$\nu_{(\text{NO})}$ (cm^{-1})
$\text{cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)}_2\text{)]}^{3+}$	1940
$\text{cis-[Ru(NO)(py)(bpy)}_2\text{)]}^{3+}$	1947 ^a
$\text{trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN}_4\text{)]}^{2+}$	1886

^a SAUAIA (2003).

Baseados nos resultados resumidos na tabela, os valores de $\nu_{(\text{NO})}$ para os complexos rutênio-nitrosilos diferem entre si devido ao efeito dos co-ligantes

coordenados sobre o ligante nitrosilo. Ressalta-se aqui, o efeito da coordenação em posição *trans*. Espera-se uma variação acentuada de $\nu_{(NO)}$ para complexos em que o ligante encontra-se na posição *trans* ao ligante nitrosilo atribuído ao efeito indutivo dos co-ligantes sobre a força de ligação entre o metal Ru (II) e NO^+ .

4.3 Caracterização do PQ Sulfeto de Cádmio - (núcleo: CdS)

O PQ CdS foi obtido e caracterizado por técnicas espectroscópicas de UV-vis, infra-vermelho, espectrofluorimetria, tamanho de partícula e solubilidade.

PQs estabilizados com ATG apresentaram, a princípio, pouca solubilidade nos seguintes solventes: água, etanol, metanol, acetonitrila e clorofórmio. Após algumas modificações no processo de síntese, como descrito na parte experimental, conseguiu-se obter o PQ CdS-ATG hidrossolúvel.

4.3.0.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

Os PQs CdS-ATG apresentaram espectro de absorção na região do UV-vis, em solução aquosa característico, cujo máximo de absorção foi em torno de 410 nm ($\epsilon = 235.653 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$). Os espectros de absorção e de emissão do CdS-ATG são mostrados na Figura 4.14 (a). O espectro de emissão, quando excitado em 324 nm, apresentou banda com máximo em 520 nm (Figura 4.14 (b)). Os PQs CdS obtidos apresentaram características espectrais descritas já em literatura, com um largo espectro de absorção e deslocamento de Stokes [48], porém o espectro de emissão apresentou uma banda mais alargada com valor de banda de meia altura de 86 nm, o que indica grande distribuição de tamanho de nanopartículas.

Os PQs CdS, mesmo passivados com ATG, por não apresentarem a camada protetora (*shell*), sofrem mais facilmente perdas de energia por mecanismos não-radiativos, o que levou a baixa intensidade de emissão observada no espectro. Este fato provavelmente seja resultante de uma perda por relação vibracional que consiste na interação entre o PQ e as moléculas do solvente.

Figura 4.14: Espectros de (a) absorção na região do UV-vis e de (b) emissão do CdS-ATG em solução aquosa ($\lambda_{ex} = 415\text{nm}$; $f_{ex} = f_{em} = 5\text{ nm}$; temperatura ambiente).

4.3.0.2 Espectroscopia Infravermelho

Através da análise por espectroscopia na região do infravermelho do PQ CdS-ATG (Figura 4.15), pode-se observar as bandas referentes exclusivamente ao ligante estabilizador ATG visto que o núcleo do PQ é constituído basicamente por CdS, que não apresenta frequências dentro da região do infravermelho. Portanto, podemos destacar uma banda em 3420 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação OH; em 2917 cm^{-1} , uma banda referente à deformação axial de C-H, fraca; a banda de deformação axial de C-O de alcoóis é encontrada em 905 cm^{-1} e, em 664 cm^{-1} , uma banda atribuída as ligações C-S [93]. A ausência do estiramento típico de SH na região de 2550 cm^{-1} e a presença de um sinal forte na região de 1580 cm^{-1} , correspondente à ligação C=O, que apresentou deslocamento em relação ao ligante livre (1718 cm^{-1}), sugerem a formação de ligações covalentes tanto dos carboxilatos como do grupamento tiol com os íons Cd^{2+} na superfície do PQ [94].

4.3.0.3 Difração de Raio X

A Figura 4.16 apresenta o difratograma de raio X, realizado pelo método do pó, da amostra de PQ CdS-ATG. Este apresentou-se um pouco amorfo devido a presença da parte orgânica (ATG) como estabilizante, e foi característico do sulfeto de cádmio, fase cúbica. Através do difratograma foi estimado o tamanho de cristalito formado que foi de $2,74\text{ nm}$, o que está em concordância com o valor calculado pelo

Figura 4.15: Espectro de absorção na região do infravermelho do PQ CdS-ATG em pastilhas de KBr.

máximo de absorbância que foi de 2,83 nm descrito anteriormente pela equação abaixo:

$$CdS \rightarrow \varepsilon = 21536(D)^{2.3} \quad (4.7)$$

Figura 4.16: Difratoograma de raio X do pó do PQ CdS-ATG.

4.3.0.4 Modificações na síntese de PQ CdS

Na modificação realizada na síntese do PQ CdS, alterou-se a proporção Cd:SH (SH, representa o agente estabilizador e/ou passivantes, que possui grupos tióis) e observou-se interferência direta na solubilidade do composto obtido. O próximo passo do estudo foi otimizar a síntese do PQ CdS tendo como

critério de avaliação a baixa intensidade de fluorescência e otimização do tamanho de partícula. As principais modificações que mostraram influência foram: a temperatura na decomposição do precursor, o pH na alteração das formas protonadas e desprotonadas do agente estabilizador, a velocidade de adição da fonte de enxofre (Na_2S) e o tempo de duração da reação.

Um dos estudos realizados levou em conta o efeito do pH na formação do PQ. Procedimentos experimentais desenvolvidos com pHs 8, 10 e 11, nos quais a intensidade de fluorescência foi observado em função do tempo, mostrou que a síntese desenvolvida em pH 10 apresentava característica espectroscópica de interesse. Neste processo observamos intensidade e valor de largura de meia banda do espectro de fluorescência, que quanto menor for o valor, mais estreita será a distribuição dos tamanhos das nanopartículas. Haja visto que as outras variáveis como tempo e temperatura foram mantidas constantes, alta intensidade e menor meia largura de banda refletia em característica adequada para síntese de PQs. Da mesma forma, avaliando-se a proporção entre Cd:SH, definiu-se que foi melhor utilizar 1:10. Esta condição de reação foi àquela na qual não se observou formação de $\text{Cd}(\text{OH})_2$ durante a reação, pois o composto obtido nesta condição proporcionou a formação de um sólido bastante solúvel em água. Sendo assim, esta condição foi mantida em todas as sínteses subsequentes.

De todas as variantes testadas, as sínteses que apresentaram formação de PQs com características de tamanho e espectroscópicas com melhores resultados, foram enumeradas abaixo:

- PQ1 - reação em temperatura ambiente, adição lenta de Na_2S e 1 h de reação;
- PQ2 - reação a 100 °C, adição rápida de Na_2S e 20 min de reação;
- PQ3 - reação a 80 °C, adição lenta de Na_2S e reação de 2 hs e 30 min;

Os resultados da análise de tamanho das partículas por dispersão de luz (DLS) são mostrados resumidamente na Tabela 4.5.

Em todos os casos foram encontradas distribuição polimodal de tamanhos. O menor tamanho médio de partículas foi obtido para o PQ3 (27,3 nm), porém, esta síntese promoveu a formação de distribuições bimodal, de tamanhos maiores. Para

n° PG	Tamanho médio (nm)	Diâmetro pico 1 (nm) e intensidade (%)	Diâmetro pico 2 (nm) e intensidade (%)
PQ1	291	9,86 (57,2 %)	140 (42,8%)
PQ2	192	231 (96,4%)	5300 (3,6%)
PQ3	27,3	21,1 (69,5%)	279 (25,3%)

Tabela 4.5: Distribuição do tamanho das partículas dos PQs sintetizados.

PQ1 foi observado distribuição bimodal, apresentando 57,2% de partículas menores, 9,86 nm. A distribuição partículas menores que a média de outros PQs, com 140 nm (42,8%). Conclui-se que, para formação de partículas pequenas e com estreita distribuição de tamanho o método de síntese utilizado para preparação do PQ1 apresentou melhor resultado.

Analisando os espectros eletrônicos e fotoluminescentes dos PQs preparados pelas diferentes variações nas sínteses, observou-se deslocamentos de banda nos espectros de absorção no UV-vis, excitação e emissão. Alguns dos valores estão resumidos na Tabela 4.6. Esses deslocamentos estão relacionados com os diferentes tamanhos de partículas formados nas sínteses e a porcentagem de cada tamanho.

n° PG	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
PQ1	410	410	520
PQ2	425	450	610

Tabela 4.6: Valores de máximos de absorção no UV-vis, excitação e emissão observados nos espectros de PQ1 e PQ2.

Mesmo com a modificação na síntese, os PQs formados ainda apresentaram bandas mais largas de emissão e não muito intensas. Como dito anteriormente, essa característica deve estar relacionada com a ausência da camada *shell*, que confere menor interação do "núcleo" com o meio (o solvente) e, portanto, menos perdas de energia por decaimentos não-radiativos [73].

Com base nos resultados descritos fez-se as seguintes considerações:

- O PQ CdS foi obtido e caracterizado por técnicas espectroscópicas de UV-vis,

infravermelho, fluorescência, raio X e tamanho de partícula.

- Pelo estudo das propriedades eletrônicas e ópticas deste PQ confirmou-se a formação de um composto fluorescente, com espectro de absorção característico que apresentou larga banda de emissão coerente de PQ sintetizado em meio aquoso.
- A ausência da camada *shell* influencia na estabilidade do PQ, pois esta o protege contra oxidação, ou mesmo contra perda de energia por relaxamento vibracional; neste caso, a observação de uma banda larga de emissão, com baixa intensidade, pode estar relacionada com a ausência desta camada.

4.3.1 Caracterização do PQ de seleneto de cádmio revestido com sulfeto de zinco - (núcleo/concha: CdSe/ZnS).

A síntese em solvente orgânico pode ser dividida em dois principais métodos, Injeção à quente (hot injection) ou elevação da temperatura (*heating up*). Bawendi e colaboradores foram os pioneiros na síntese de PQs monodispersos (CdS, CdSe, CdTe) pela via de injeção à quente [54] sendo revolucionária na década de 90 utilizando TOP (trioctinilfosfina) e TOPO (trioctinilfosfinóxido) como solventes coordenantes.

O método de síntese utilizado [78] seguiu o modelo hot inject e levou a obtenção de um PQ com TOPO como agente estabilizador, CdSe/ZnS-TOPO. O CdSe revestido com uma camada de sulfeto de zinco (ZnS) demonstrou ser hidrofóbico devido ao ligante TOPO de cadeia apolar, apresentando solubilidade parcial nos solventes tolueno e clorofórmio.

4.3.1.1 Espectroscopias na região do UV-vis e de fluorescência

O espectro de absorção na região do UV-vis desse PQ, em tolueno, apresentou uma banda na região do visível em 518 nm, bem definida, característica desse PQ com $\varepsilon = 87.145 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. No espectro de emissão, foi observado uma banda com máximo em 540 nm quando excitado em 326 nm (Figura 4.17). A intensidade de fluorescência desse PQ aumentou quando comparado com CdS (núcleo). Pode-se observar maior definição no espectro de emissão sendo este mais estreito e simétrico.

As características dos espectros acima levam a confirmação de que a presença de agentes passivantes hidrofóbicos e do *shell*, utilizados no revestimento da superfície do núcleo, previnem contra oxidação e perda de energia por processo não-radiativo para as moléculas do solvente, aumentando assim a fotoluminescência do PQ.

Figura 4.17: Espectro de (a) absorção no UV-vis e de (b) emissão ($\lambda_{ex} = 326 \text{ nm}$; $f_{ex} = 5 \text{ nm}$) do CdSe/ZnS-TOPO em tolueno; temperatura ambiente.

4.3.1.2 Difração de raio X

A caracterização do CdSe/ZnS-TOPO por difração de raio X revelou, através do perfil do difratograma (Figura 4.18), que a amostra apresentou baixa cristalinidade (picos mais alargados) e a existência de picos de difração que estão de acordo com a orientação hexagonal wurtizite. Há indícios de formação de uma mistura cujos picos marcados com quadrado, estão em concordância com a fase cúbica do CdS, que apresenta picos semelhantes ao ZnS, confirmando a formação do *shell*. Os picos marcados em círculo correspondem a selênio metálico (círculo verde) e de hidróxido de cádmio (triângulo). A presença desses compostos indica contaminação na amostra, o que provavelmente resulta na baixa solubilidade da mesma. O tamanho de cristalito calculado foi de 2,37 nm considerando somente os picos referentes à fase CdSe. O tamanho das nanopartículas calculado pelo máximo da absorbância foi de 2,77 nm, o que está em concordância com valor determinado pela análise de raio X. Entretanto o calculo do tamanho obtido para formação de mistura de fases foi de 15,4 nm.

Figura 4.18: Difratogramas de raio X do pó do PQ CdSe/ZnS-TOPO. Se (esfera), CdS(quadrado), CdOH (triângulo)

Devido a insolubilidade do PQ CdSe-TOPO em diferentes solventes, foi realizada tentativa de uma reação para a troca do ligante estabilizador TOPO pelo ligante AMP (ácido mecaptopropiônico) entretanto esse procedimento não foi bem sucedido.

Observando-se os resultados obtidos do PQ e as observações descritas anteriormente, foram feitas as seguintes considerações:

- Pelo estudo das propriedades óticas e eletrônicas, o PQ apresentou capacidade de emitir fluorescência com banda de absorção larga e espectro de emissão mais estreito e intenso quando comparado ao PQ CdS.
- A presença do shell influenciou na sua estabilidade protegendo-o contra oxidação por outros agentes ou mesmo por perda de energia por outros processos;
- Apesar da intensa fotoluminescência do PQ CdSe/ZnS-TOPO, a síntese realizada em meio orgânico não demonstrou-se viável pois além do uso de temperaturas muito elevadas, os materiais utilizados na síntese são de custo elevado, apresentam alta toxicidade sendo alguns pirofóricos.
- O PQ obtido apresentou uma possível formação de mistura de outras fases como contaminantes.
- Outro fator limitante foi sua solubilidade parcial nos solvente tolueno e clorofórmio, que possuem alta toxicidade tanto para o manipulador quanto

para futuras análises nos estudos biológicos in vitro.

- Segundo relatos da literatura, a síntese em meio orgânico resulta em nanopartículas com menor bioafinidade, aumentando as interações não-específicas durante a difusão. .
- Devido a baixa solubilidade do PQ em meio aquoso e dos complexos nitrosilos de rutênio em solventes orgânicos, impossibilita a execução do estudo da interação entre ambos compostos e da fotoindução de elétrons do PQ para o complexo, visando produção de NO.

De acordo com as observações acima, uma nova tentativa de síntese de PQ luminescente e hidrossolúvel foi realizada em meio aquoso. Nesta etapa foi sintetizado Telureto de cádmio, PQ CdTe-MPA.

4.3.2 Síntese e caracterização do PQ de telureto de cádmio - (núcleo: CdTe-AMP).

CdTe-AMP : Reação em meio aquoso

Obteve-se PQs de telureto de cádmio passivados com ácido mercaptopropiônico (AMP) altamente luminescentes. A Figura 4.19 mostra uma foto do balão reacional durante a síntese, sob irradiação com uma lâmpada UV (λ_{ex} = 366 nm).

Figura 4.19: Imagem do balão de reação durante a síntese do PQ CdTe-MPA e de uma solução do PQ isolado, sob irradiação UV, λ_{ex} = 366nm.

4.3.2.1 Espectroscopias na região do UV-vis e de fluorescência

O espectro de absorção no UV-vis do CdTe-AMP em solução aquosa é apresentado na Figura 4.20. Observou-se uma banda característica do PQ, na região do visível, cujo máximo de absorção foi em 500 nm. O valor do coeficiente de absortividade molar (ϵ) calculado para este PQ, através do espectro de absorção e da Equação 4, foi de $65.400 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$.

Figura 4.20: Espectros de absorção no Uv-vis e de emissão ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$; $f_{em} = f_{ex} = 3 \text{ nm}$) do CdTe-AMP em solução aquosa.

Através do processo de precipitação seletiva, etapa realizada após a síntese, foram isolados dois precipitados de coloração diferente e cujos espectros de absorção e emissão também se diferenciavam. O segundo precipitado (coloração amarela) foi obtido em quantidade muito pequena enquanto o primeiro precipitado (laranja), em maior quantidade, foi utilizado nos testes subsequentes. Na Figura 4.21 são mostrados os espectros de emissão ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$) do meio reacional e dos PQs, de diferentes tamanhos, isolados pela precipitação seletiva. O precipitado laranja apresentou máximo de emissão em 544 nm.

O espectro de excitação do CdTe-AMP (Figura 4.22) é semelhante ao espectro de absorção pois conforme os fundamentos fotoquímicos, para que a emissão de fluorescência ocorra, é necessário que a radiação seja absorvida criando um estado excitado.

4.3.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

O resultado do espectro de infravermelho do PQ CdTe-AMP, realizado em pastilha de KBr (Figura 4.23), mostrou bandas correspondentes ao ligante ácido

Figura 4.21: Espectros de emissão ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$; $f_{em} = f_{ex} = 3 \text{ nm}$) do PQ CdTe-AMP no meio reacional (vermelho) e após precipitação seletiva; 1º precipitado laranja (azul) e 2º precipitado amarelo (preto), ambos em solução aquosa.

Figura 4.22: Espectros de excitação ($\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$) do PQ CdTe-AMP.

mercaptopropiônico. A região entre 2400 e 2700 cm^{-1} é referente à deformação axial de S-H, fraca, pode-se observar a ausência da banda referente ao grupo tiol (S-H) na região de 2570 cm^{-1} . Estiramentos $\nu(\text{C}=\text{O})$ de grupos carboxílicos e estiramento assimétrico $\nu_{as}(\text{C}-\text{O})$ dos carboxilatos são vistos entre 1500 e 1700 cm^{-1} e, em 660 cm^{-1} , uma banda atribuída às ligações C-S) ([93], também é destacada e que possibilita inferir a ligação química existente à superfície do PQ.

O espectro do mesmo PQ revestido com AMP obtido pelo ATI-IR revelou o mesmo perfil, banda larga referente à deformação axial de S-H, fraca; a ausência da banda referente ao grupo tiol (S-H) na região de 2570 cm^{-1} , uma banda abrangendo os estiramentos referentes ao grupo carboxílico e em 660 cm^{-1} , parte da banda atribuída às ligações C-S.

Figura 4.23: Espectro de absorção na região do infravermelho do PQ CdTe-AMP em pastilha de KBr.

4.3.2.3 Difração de raio X

PQ CdTe pode crescer tanto na estrutura cúbica blenda de zinco ou na forma hexagonal wurtzite. Estruturas diferentes possuem energias de formação diferentes. Em temperaturas de reações baixas, a fase cúbica é favorecida porém a altas temperaturas, o cristal preferencialmente cresce na estrutura de wurtzite. A injeção de precursor causa queda da temperatura favorecendo a formação do núcleo blenda de zinco [95]. Após essa etapa a temperatura é recobrada e o crescimento é deslocado para a fase wurtzite.

O difratograma de raio X do CdTe-AMP (Figura 4.24) revelou a existência de três picos de difração na forma cúbica de face centrada: 23,7, 40,4 e 46,6. (GU, 2008).

Figura 4.24: Difratograma de raio X do PQ CdTe-AMP.

A análise de difração de Raio X dos PQs sintetizados mostraram estrutura cristalina de fase cúbica no valor intermediário aos CdTe e CdS. Durante a síntese aquosa sob longos períodos de refluxo na presença de AMP, as moléculas de tiol podem liberar S^{2-} no decurso de refluxo demorados em meio básico, fase de crescimento das nanopartículas (NPs). Sob essas condições, uma mistura de PQs entre $CdTe_xS_{1-x}$ com distribuição de enxofre de dentro da NP para sua superfície é formada, representando assim um tipo de sistema *core-shell* criado pela ligação covalente do grupo mercapto à superfície de cádmio [57].

Figura 4.25: Modelo estrutural de uma superfície de nanocristal CdTe. Alguns átomos de Te foram substituídos por grupo tiol (S-R) (BORCHET, 2003).

Apesar dessa camada rica em enxofre ser fina, esta concha formada é capaz de melhorar a estabilidade e eficiência de luminescência do PQ CdTe-AMP em meio aquoso. A formação da superfície de CdS resultante da ligação entre os átomos de enxofre do grupo tiol ao cristal de CdTe (Figura 4.25) estabelece sistema núcleo-concha semelhante ao tipo I, pois o *gap* de energia do CdS é mais alto que o CdTe [57].

4.3.2.4 Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

A medida do rendimento quântico de fluorescência requer a correção prévia do espectro de emissão do material ou o uso de um padrão fluorescente cujas propriedades do espectro de emissão estejam intimamente relacionadas com a espécie desconhecida, ou seja, o espectro de emissão da espécie de interesse deve estar dentro da faixa de emissão do padrão [96].

O método utilizado foi preferido por sua simplicidade de operação; inclui um

Figura 4.26: Intensidade de área integrada versus absorvância do PQ CdTe-MPA.

padrão secundário, pois envolve o uso de espécies cujo ϕ_F já é conhecido, e conta com a comparação das áreas integradas abaixo dos espectros de emissão do padrão e da amostra.

As absorvâncias das espécies são mantidas em torno de 0,100 para que se evite o problema de efeito filtro. A escolha do padrão segue geralmente a análise da região onde a espécie em estudo emite [96, 81].

O rendimento quântico (ϕ_F) de fluorescência foi calculado para este PQ utilizando-se Rodamina B como padrão, como descrito na parte experimental. O CdTe-AMP, apesar de alta intensidade de emissão apresentou rendimento quântico de 9,2% e o gráfico demonstrando a relação entre a área integrada versus absorvância é mostrado na Figura 4.26. De acordo com a literatura, sínteses em meio aquoso e em baixas temperaturas resultam em baixo valor de ϕ_F [74, 97]. Ford e colaboradores já relataram anteriormente valores menores de rendimentos quânticos de fluorescência de PQs em meio aquoso [97]. Este baixo valor está de acordo com a consideração acima apresentada: presença de defeitos na estrutura cristalina do PQ levando a desativações não-radiativa.

De acordo com a literatura, sínteses em meio aquoso e em baixas temperaturas resultam em baixo valor de ϕ_F [98]. Ford e colaboradores já relataram anteriormente valores menores de rendimentos quânticos de fluorescência de PQs em meio aquoso (NEUMAN, 2007; [74]). Este baixo valor está de acordo com a consideração acima apresentada: presença de defeitos na estrutura cristalina dos PQs levando a desativações não-radiativa.

4.3.2.5 Tempo de vida (τ)

Todo estado excitado, uma vez populado, tende a relaxar ao estado fundamental através de decaimentos radiativos (emissão de fótons) e não-radiativos (como, relaxação vibracional, cruzamento intersistema ou conversão interna, transferência de energia). Os decaimentos radiativos obedecem, em princípio, a um comportamento cinético de primeira ordem ou pseudo primeira ordem, já que a intensidade de decaimento só depende da população inicial do estado excitado [99]. Desta forma a taxa com que ocorre o decaimento da intensidade de emissão é dada pela seguinte equação:

$$\frac{dI}{dt} = -k_1 I \text{ ou } \frac{dI}{I} = -k_1 dt \quad (4.8)$$

onde k_1 é a constante de velocidade e I é a intensidade num tempo t . Integrando-se ambos os termos da equação, temos

$$I = I_0 e^{-kt} \quad (4.9)$$

onde I_0 é a intensidade num tempo $t = 0$, evidenciando assim que o decaimento evolui exponencialmente com o tempo. Por definição, o recíproco do somatório das constantes de velocidade, que podem ser tomadas como probabilidade de transição, é chamado de tempo de vida médio ($\tau = 1/k_1$), onde τ representa o tempo para a população de um estado excitado decair a $1/e$ da população inicial.

Figura 4.27: Curva de decaimento de luminescência da solução aquosa do PQ540 livre (2.2×10^{-5} mol/L) e de sua solução análoga contendo complexo RuNO. (7.0×10^{-6} M) $\lambda_{exc} = 460$ nm. Medidas realizadas no Centro de caracterização óptica da UCSB.

A Figura 4.27 apresenta o espectro de decaimento do tempo de vida da fluorescência do CdTe-AMP em solução aquosa, no seu máximo de emissão ($\lambda_{em}=544$ nm). A curva mostrou um comportamento biexponencial, onde observou-se um decaimento inicial rápido $\tau_1 = 3,7$ ns e um segundo decaimento, um pouco mais lento, de $\tau_2 = 20,74$ ns. O tempo de vida calculado foi relativamente curto. Tempos de vida mais longos, da ordem de 200 ns, são característicos de emissão relacionada a defeitos na estrutura cristalina do PQ. Emissão relativa a defeitos são frequentemente observadas nos PQs, porém são indesejadas [66], pois levam a menor eficiência ou rendimento quântico.

4.3.2.6 Determinação do tamanho de partícula

A análise de tamanho das nanopartículas por diferentes métodos apresentou os seguintes resultados: Baseado na equação que descreve o coeficiente de extinção molar [82], o tamanho do CdTe-AMP foi de 2,04 nm e quando analisado por DLS, o diâmetro foi de aproximadamente 25,3 nm. Entretanto, durante a análise o equipamento indicava algum erro devido ao uso de amostra fluorescente. O tamanho de cristalito calculado pela fórmula de Scherrer (calculado baseado na difração de RX que estima o tamanho de partícula esférica) foi de 1,41 nm.

O índice de polidispersividade medido para a amostra do CdTe-AMP foi de 0,35. Esta propriedade deve ter um valor baixo, menor que 0,1, para o sistema ser considerado como monodisperso ideal, indicando que a amostra apresenta uma distribuição de tamanho numa faixa muito estreita ou monomodal, ou seja, tem-se uma suspensão de nanopartículas de boa qualidade. Valores altos de polidispersividade, de 0,5 até 1, indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanho numa faixa muito ampla ou polimodal. O valor encontrado para o PQ obtido é um pouco maior que 0,1 indicando ainda assim uma distribuição polimodal [100].

Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do PQ foram realizadas para verificação da morfologia e tamanho das partículas.

A fotomicrografia realizada por análise de MET (Figura 4.28), foi realizada após diluição em água e sonicação da amostra por alguns minutos. Porém a amostra apresentou aspecto de coalescência, não melhorando a qualidade da imagem. Mesmo

assim foi possível medir o tamanho das nanopartículas cujo diâmetro médio foi de 2,5 nm.

Figura 4.28: Fotomicrografia eletrônica de transmissão do PQ CdTe-AMP. Barra de aumento 5 nm.

Conforme os resultados observados, apesar das imagens confirmarem o diâmetro dos PQs, as diferentes técnicas revelaram diferentes valores (Tabela 4.7). Dentre as técnicas usadas, apenas os dados obtidos por absorvância (coeficiente de extinção) mostrou-se próxima aos resultados obtidos por MET.

Técnica	Tamanho (nm)
Coeficiente de extensão molar	2,42
DLS	25
Difração R-X	1,41nm
Fórmula de Scherrer	
Microscopia TEM	2,5

Tabela 4.7: Relação de tamanho dos PQs CdTe-AMP e técnica utilizada.

Neste caso da síntese de CdTe-MPA os prováveis interferentes para a determinação do tamanho foram:

- Tamanho do cristalito pela equação de Scherrer: devido à formação de estrutura cristalina de fase cúbica no valor intermediário aos CdTe e CdS, o valor obtido a partir dos cálculos dos picos se tornaram incoerentes;

- Tamanho de partícula por DLS: durante análise o aparelho indicou erro devido a amostra ser fluorescente. Além disso, o laser utilizado apresenta $\lambda_{ex} = 525$ nm, comprimento de onda de valor onde o composto emite.

Dessa forma, ambos resultados serão desconsiderados.

CdTe-AMP: Reação em meio orgânico

4.3.2.7 Espectroscopias na região do UV-vis , fluorescência e Difração de Raio X (CdTe-AMP : Reação em meio orgânico)

O espectro de absorção do PQ CdTe-AMP feita em meio orgânico apresentou o espectro de absorção (Figura 4.29) com pico máximo em 555nm e a emissão em 600 nm. O valor do coeficiente de absorvidade molar é de $\varepsilon = 125.900 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$

Figura 4.29: Espectros de absorção do CdTe-AMP sintetizado em meio orgânico (hexano). A direita: amostra sob luz UV.

Após reação *overnight* para troca do ligante, foi feito as leituras de espectro UV-vis e fluorescência cujos dados na Figura 4.30 mostram absorbância em 540nm e emissão de fluorescência em torno de 610nm. Para efeito de comparação, a Figura 4.31 destaca a diferença de coloração quando da solução aquosa de PQ CdTe-MPA na ausência de luz e sob luz UV.

4.3.2.8 Difração de Raio X

O difratograma de raio X do CdTe-AMP em síntese orgânica apresentaram picos de difração em aproximadamente $23,9^\circ$; $39,3^\circ$ e $46,4^\circ$ (2θ), correspondem aos planos (111), (220) e (311), respectivamente, referentes à estrutura cristalina do tipo blenda de zinco [101].

Figura 4.30: Espectros de absorção em meio aquoso (direita) e espectro de emissão ($\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$) do PQ CdTe-AMP após troca de ligante.

Figura 4.31: Imagem do frasco contendo PQ CdTe-MPA após reação de troca de ligante. Esquerda: sob luz ambiente, direita: sob irradiação UV, $\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$.

Figura 4.32: Difratoograma de raio X pelo método do pó do PQ CdTe-AMP sintetizado em meio orgânico.

4.3.2.9 Tamanho da partícula

Através de fotomicrografia em microeletrônica foi possível visualizar uma homogeneidade no tamanho das partículas dispersas no meio. Apesar do aspecto coalescente a média do tamanho foi de 3,3 nm.

Figura 4.33: Microscopia eletrônica de transmissão do PQ CdTe-AMP em meio orgânico (hexano). Barra de aumento 20nm (A) e 10nm (B).

A fim de simplificar a nomenclatura dos PQs CdTe-AMP, padronizou-se nomenclatura destes pelo valor numérico correspondente próximo ao seu comprimento de onda máximo de emissão. PQ CdTe-AMP sintetizado em meio aquoso será citado como **PQ540** e este novo CdTe-AMP sintetizado em meio orgânico, **PQ600**.

Considerando os resultados obtidos pela caracterização do CdTe-AMP pode-se fazer algumas observações:

- O PQ CdTe-AMP foi a nanopartícula que apresentou os melhores resultados, desde a execução da síntese, com reagente de baixa toxicidade, solubilidade em meio aquoso e alta fluorescência.
- A solução aquosa mostrou-se mais estável em relação aos outros PQs quando armazenada em baixa temperatura e ao abrigo de luz.
- A eficiência de luminescência do PQ CdTe-MPA, em meio aquoso, está relacionada com o fato de que os átomos de enxofre do grupo tiol se ligam ao cristal de CdTe formando uma superfície de CdS [57].

- A síntese orgânica de CdTe-MPA demonstrou rapidez e versatilidade, visto que além de possibilitar o uso em meio aquoso pela troca de ligante TOP por AMP, pode-se obter novas combinações ampliando seu uso pela bioconjugação com moléculas biológicas.

Ressalta-se aqui a importância no controle do tamanho da nanopartícula durante a síntese, pois essa característica interfere diretamente na capacidade luminescente do PQ. Quando constituídos do mesmo material, a emissão das partículas maiores deslocar-se-á para a região mais próxima do vermelho. Dependendo da constituição química do núcleo do PQ, esse espectro de variação será delimitado [48].

4.4 Encapsulação do PQ CdTe-AMP em lipossomas

Diante da obtenção de um sistema PQ/complexo nitrosilo solúvel em água, deparou-se com a necessidade de encontrar um sistema de encapsulamento para melhorar estabilidade e de prolongar a liberação destes.

Os lipossomas além de apresentarem biocompatibilidade são capazes de encapsular moléculas hidrofílicas na sua camada interna enquanto que moléculas hidrofóbicas ou anfifílicas podem ser carregadas nas bicamadas de suas membranas através de interações eletrostáticas. Quando de tamanho menor que 100nm, podem prolongar sua permanência no organismo, retardando a fagocitose. A cedência do compostos ativos também pode ocorrer por outros mecanismos de liberação como: transferência inter-membrana dos componentes lipídicos sem ocorrer a ruptura do lipossoma; por contato com o local-alvo aumentando a permeabilidade da membrana do lipossomo e a liberação do conteúdo; adsorção por forças atrativas ou pela ligação de moléculas da membrana dos lipossomas à receptores específicos (exemplo no uso de anticorpos) [100].

Para a preparação de lipossomas unilamelares foi utilizando o método por injeção etanólica da mistura 1- α -fosfatidilcolina (DPPC) e colesterol sobre uma solução aquosa do PQ CdTe-AMP, sob agitação, a um fluxo constante de 300 μ L/h, a 56 °C.

Espectros de absorção na região do UV-vis para o PQ em solução aquosa

(1×10^{-4} mol/L) e encapsulado são mostrados na Figura 4.34. Pôde-se verificar que ocorre apenas uma leve alteração no máximo de absorbância de 500 para 505 nm, o que deve estar relacionado com o estabelecimento de interações entre PQ e lipossoma.

Figura 4.34: Espectro de absorção na região do UV-vis do PQ CdTe(AMP) em solução aquosa e encapsulado.

Foi possível observar através do espectro de emissão (Figura 4.35) que o PQ encapsulado no lipossoma apresentou maior fluorescência quando comparado à solução aquosa de PQ na mesma concentração e o lipossoma vazio, que não apresentou fluorescência (dado não mostrado). Essa diferença é provavelmente devido a separação que o lipossoma promove entre o PQ e o solvente (água) pois ao encapsular a NP, ocorre a proteção e consequente prevenção da perda de energia por relaxamento vibracional pelo PQ. Também foi notado que o PQ encapsulado apresentou maior estabilidade do que aquele em solução aquosa, após dois dias da preparação observou-se que a solução continuava estável. A determinação da eficiência de encapsulação não foi concluída, pois deseja-se determinar se o composto foi totalmente internalizado ou parte dele encontra-se na porção externa.

O tamanho médio dos lipossomas formados, medidos por DLS, foi de 85,62 nm com baixa polidispersividade (0,191), resultado que confirma preparação de lipossoma de tamanho regular e uniforme (Figura 4.36). O potencial zeta, propriedade que determina a carga de superfície de uma partícula adsorvida no meio em que se encontra suspensa, foi de -22 mV, valor este que se encontra na faixa recomendável de estabilidade (+30 mV a -30 mV). Seu valor negativo está de

Figura 4.35: Espectros de emissão do (CdTe-MPA) em solução aquosa ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$) e encapsulado no lipossoma ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$), $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$, $f_{em} = f_{ex} = 5 \text{ nm}$.

acordo com as propriedades do agente passivante que reveste o PQ, o AMP, cujos carboxilatos encontram-se ionizados em solução, apresentando carga negativa.

Figura 4.36: Distribuição de tamanho do PQ540 encapsulado pelo lipossoma.

5 *Estudo Fotofísico e Fotoquímico da interação entre PQs e complexos nitrosilo de rutênio*

CONFORME descrito no Capítulo 4, os complexos de rutênio *cis* - $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ e *trans*- $[\text{RuCl}(\text{NO})([15]\text{aneN}_4)]^{2+}$ foram sintetizados e caracterizados, assim como os PQs Cds-ATG (sulfeto de Cádmio revestido por ácido tioglicólico), CdSe/ZnS (seleneto de cádmio e sulfeto de zinco revestido por TOPO - trioctinilfosfinóxido) e CdTe-AMP (telureto de cádmio revestido por ácido mercaptopropiônico).

Neste capítulo 5 serão descritos experimentos relacionados à interação entre PQs (CdS e CdTe) e complexos rutênio-nitrosilo, sendo avaliada a capacidade de liberar NO desse sistema. Inicialmente foram realizados testes qualitativos de liberação de NO utilizando o sensor NOmeter (amino-700) pela técnica amperométrica. Numa segunda etapa foram feitas análises quantitativas utilizando o detector NOA 280i do laboratório de Fotoquímica da Universidade da Califórnia de Santa Bárbara, UCSB, durante o período de Estágio Sanduíche realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Peter C. Ford. Para analisar a interação entre ambos compostos foram realizados estudos fotofísicos e fotoquímicos qualitativos dessa associação seguidos dos estudos fotoquímicos quantitativos utilizando os dados obtidos pelo NOA para a execução dos cálculos na determinação dos rendimentos quânticos de liberação de NO.

Primeiramente, para o estudo da interação entre compostos é importante a compreensão de cada molécula individualmente. Para a aplicação dos PQs como fotossensibilizadores deve-se compreender a interação entre a superfície do semiconductor e outras espécies moleculares, o que envolve alterações das propriedades espectroscópicas dos compostos.

Na presença de luz, a transferência eletrônica interfacial entre o material

excitado e as espécies adsorvidas pode competir com os processos de emissão e transferência de elétrons interfacial. PQs, ao absorverem luz quando submetidos a irradiação (Figura 5.1, processo 1) promovem o elétron ao nível mais energético gerando o par elétron-buraco. A partir desta etapa outros processos podem ocorrer, como o retorno à banda de valência por processo térmico (não-radiativo) ou emissão de luz (processo radiativo) (processo 2) ou os elétrons podem ficar presos à superfície (processo 3) reduzindo uma molécula adsorvida (R)(eq. 5.1) (processo 4), enquanto que os buracos gerados na camada de valência podem oxidar uma molécula doadora (D) adsorvida em outro sítio da superfície (eq. 5.2) [23].

Figura 5.1: Processos de fotoreações dos PQs. Modificado de [23, 51]

Destaca-se que dentre as várias possibilidades citadas, um dos principais processos oxidativos é a oxidação de moléculas de água gerando radical hidroxila (HO^*). Já por processos redutimétricos, os buracos na camada de valência podem formar ânion superóxido (O_2^{*-}). Através de reações redox secundárias outras espécies reativas também podem ser geradas, como exemplo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [23].

Os processos que descrevem os eventos subsequentes à desativação de uma molécula através transições radiativas ou não radiativas após a absorção de fótons é chamado de processo fotofísico. Dentre estes, a supressão de fluorescência é de

especial importância pois permite a obtenção de informações relevantes sobre o fluoróforo.

A desativação do estado excitado pode ser resultante de diferentes processos, dentre eles encontram-se os processos de supressão estático e dinâmico (ou colisional). Ambos processos necessitam do contato molecular entre o fluoróforo e o supressor e podem ser descritos pela equação de Stern-Volmer, que relaciona a supressão da fluorescência de um composto pela adição de outra espécie (supressor, Q) no meio. No processo de supressão dinâmica ocorre a desativação da fluorescência por colisão entre o fluoróforo e o agente supressor durante o tempo de vida do estado excitado. De modo geral, após o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas. A supressão dinâmica ou colisional é descrita por

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (5.3)$$

em que F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente; K_q é a constante bimolecular de supressão τ_0 é o tempo de vida na ausência do supressor. A constante de Stern-Volmer, K_{SV} é dada por $\tau \cdot K_q$ e representa também por K_D . Esta constante representa a eficiência da supressão, indicando o grau de acessibilidade do fluoróforo ao supressor.

No processo de supressão estática da fluorescência há a formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Ao absorver luz, o complexo retorna ao estado fundamental sem emissão de fótons. Este processo é descrito pela equação:

$$\frac{I_0}{I_F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (5.4)$$

A dependência de I_0/I_F em relação à $[Q]$ é linear e idêntica àquela observada para a supressão dinâmica. Entretanto, a constante de supressão neste caso equivale à constante de associação. Geralmente o perfil linear resultante da construção do gráfico de **Stern-Volmer** indica a presença de apenas uma classe de fluoróforo, sendo estes igualmente acessíveis ao supressor (Q), enquanto que no caso da presença de duas populações diferentes, o perfil será não linear. Em vários casos a supressão pode ocorrer através dos dois processos na presença da mesma molécula supressora[44].

A medida de tempos de vida é o melhor método para distinguir a supressão estática da dinâmica. Na supressão estática o complexo formado pelo fluoróforo e supressor não é fluorescente e a fração de moléculas não complexadas não é perturbada. Desta forma o tempo de vida permanecerá constante (igual a τ_0) e assim $\tau_0/\tau = 1$. Por outro lado, a supressão dinâmica diminui a quantidade de moléculas no estado excitado pela adição de uma nova taxa de decaimento não radiativo, implicando na redução do tempo de vida de fluorescência.

O processo de supressão pode ser utilizado como ferramenta no estudo de reações fotoquímicas, como a fotoliberação do óxido nítrico em meio biológico, podendo ser acompanhado pelas variações nas intensidades de fluorescência.

5.1 PQs CdS-ATG e complexos de Rutênio

A capacidade de transferir elétrons dos PQs para os complexos de rutênio foi avaliada. Para isso, o sistema $\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$ e pirazina (pz) foi monitorado por espectroscopia de UV-vis. Neste complexo, o íon rutênio apresenta-se no estado de oxidação +3; se o íon rutênio for reduzido para +2, na presença de pirazina, o complexo perde um cloro e uma pirazina se liga ao rutênio +2, o que originaria uma intensa banda de TCML na região de 480 nm [6].

O processo mostrou que, de fato, a redução da espécie pentaaminclororutênio (III) na presença de PQ CdS-ATG e pirazina, gerou o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pz}]^{2+}$, haja vista semelhança espectroscópica descrita na literatura (Figura 5.2) [6]. Banda em 460 nm foi previamente atribuída como sendo de TCML, referente a transição $d_{\pi_{\text{Ru(II)}}} - \pi^*(\text{pz})$. O acréscimo de HCl, suficiente para concentração final 1 M, propiciou o deslocamento da banda TCML para menor energia em função da formação de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pzH}]^{3+}$ (Figura 5.2).

Para verificar se há interação dos compostos, experimentos de supressão da fluorescência foram realizados utilizando a equação de **Stern-Volmer**. Uma solução aquosa do PQ1 CdS-ATG (1 mg/mL) foi preparada e mediu-se um espectro de emissão da mesma ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$). Em seguida, adicionou-se alíquotas de uma solução do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO}^+)(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ em diferentes concentrações: 0,0; 1,7; 3,3; 6,7; 13,0 $\times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e efetuou-se novamente a medida do espectro

Figura 5.2: Evidência de uma reação de transferência de elétrons no sistema CdS-ATG e $\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$. Acompanhamento por espectroscopia eletrônica. (cinza pontilhado) espectro $\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$, (preto) solução após adição de PQ CdS-ATG e (tracejado) adição de HCl 1 mol/L.

de emissão após cada adição de complexo. A Figura 5.3 mostra a diminuição na intensidade de emissão do PQ após cada adição do complexo, observou-se supressão da fluorescência (ou "quenching") do PQ promovida pela interação do mesmo com o complexo. Em alguns experimentos, a supressão de fluorescência do PQ foi quase total devido a alta concentração do complexo em solução.

Figura 5.3: Espectros de emissão do PQ CdS-ATG, em solução aquosa ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), e após sucessivas adições de uma solução aquosa complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^3+$ nas concentrações de a-e: 0,0 a $13,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, monitorada em 520 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{\text{ex}} = f_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$.

É perceptível a supressão da fluorescência com a adição sucessiva de alíquotas do complexo nitrosilo na solução de PQ e não foi observado deslocamento do pico máximo de emissão do CdS como também nenhuma alteração no espectro de absorção do PQ1 durante a interação entre eles.

Analisando o gráfico de **Stern-Volmer**, Figura 5.4, é possível confirmar que o sistema obedece ao mecanismo de supressão da fluorescência [102] devido à associação das duas espécies. Um perfil linear pode ser observado no respectivo gráfico e através da equação de **Stern-Volmer**. Foi possível determinar a constante K_{sv} igual a $1 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear (R) de 0,99 semelhante descrito na literatura e a respectiva equação da reta:

$$Y = 1,017 + 1,008.10^6 x \quad (5.5)$$

Figura 5.4: Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência do PQ1 CdS-ATG ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em 520 nm, na presença de diferentes concentrações do *cis*- $[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)_2]^{3+}$ ($\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$).

5.1.1 Avaliação da liberação de NO fotoinduzida pelo PQ CdS-ATG

Nessa etapa, o experimento fotoquímico utilizando técnica amperométrica, foi conduzido utilizando o complexo nitrosilo de rutênio *cis* - $[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)_2]^{3+}$

para avaliar a liberação de NO fotoinduzida. Numa cubeta de quartzo contendo solução aquosa do complexo a ($1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) foi adicionado 200 μL de uma solução aquosa do PQ1 CdS ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e observou-se imediato aumento da corrente do eletrodo, ou seja, liberação do NO sem que houvesse a irradiação do sistema (Figura 5.5). Dessa forma, o PQ CdS-ATG promoveu a redução direta do NO^+ a NO^0 , seguida da evolução do mesmo. Isso pode ser devido à ação do ácido tioglicólico (agente passivador) como redutor.

Figura 5.5: Cronoamperograma de liberação do NO por redução: solução aquosa do complexo $\text{cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)}_2\text{]}^{3+}$ ($1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) antes e após adição do PQ CdS-ATG. * Adição do PQ.

Neste experimento, portanto, comprovou-se a ocorrência de transferência de elétrons do PQ CdS-ATG para o complexo nitrosilo de rutênio que resultou na liberação do NO por processo redox (redução a NO^0 e oxidação do grupo tiol da superfície do PQ), entretanto esta liberação não ocorreu por fotoativação como havíamos pressuposto.

Com base nos resultados descritos fez-se as seguintes considerações: O PQ CdS-ATG, obtido e caracterizado por técnicas espectroscópicas mostrou interação com complexo nitrosilo de rutênio observado pelo processo de supressão da fluorescência.

A capacidade do CdS em transferir elétrons para o complexo nitrosilo de rutênio favoreceu a liberação de NO por processo redox e não por fotoliberação, princípio usado na terapia fotodinâmica. Com a simples mistura dos compostos, foi

observado a produção de NO.

Visto que o objetivo desse trabalho consiste no estudo da fotoliberação da molécula de NO, a avaliação deste PQ CdS-ATG foi interrompido. Os estudos utilizando o PQ CdSe/ZnS revestido com TOPO foram descontinuados devido a insolubilidade do PQ em meio aquoso e dos complexos nitrosilos de rutênio em solventes orgânicos, o que impossibilita a execução do estudo da interação entre ambos compostos e da fotoindução de elétrons do PQ para o complexo, visando produção de NO. Diante disso, prosseguiu-se os estudos utilizando o PQ hidrossolúvel, CdTe-MPA (PQ540).

5.2 Interação PQ CdTe-MPA com os complexos nitrosilo de rutênio

Seguindo os procedimentos do experimento descrito anteriormente, a interação entre os PQs CdTe, passivado com ácido mercaptopropiônico, e complexos rutênio-nitrosilos (*trans*-[RuCl(NO)([15]aneN₄)]²⁺ e *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺) foi acompanhada pela equação de Stern-Volmer.

Em vias de regra, os complexos nitrosilos de rutênio promovem a liberação de NO por reação de redução ou por fotoliberação, sendo em muitos casos sob irradiação próxima à região do ultravioleta. Essa fotoliberação ocorre na região onde a pele apresenta maior absorção e conseqüentemente promove menor penetração tecidual [63, 60].

A associação dos PQs aos complexos nitrosilos tem por finalidade promover a liberação de NO por um sistema fotossensível que possa ser aplicado a diferentes complexos em diferentes comprimentos de onda de excitação o que inclui sua aplicação na janela terapêutica (região do visível).

5.2.1 PQ CdTe-MPA meio aquoso - PQ540 e complexo nitrosilo *trans*-[RuCl(NO)([15]aneN₄)]Cl₂

O complexo rutênio-nitrosilo *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺, foi sintetizado e caracterizado pelo grupo tendo sido descrito na literatura por sua atividade vasodilatadora resultante da liberação de NO por mecanismo redutimétrico em meio

biológico. A avaliação da sua interação entre o PQ540 foi acompanhada pelo espectro de emissão do PQ540 e sua subsequente supressão à medida que diferentes alíquotas da solução do respectivo complexo eram adicionadas nas seguintes concentrações de $0,4$ a $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Conforme demonstrado na Figura 5.6, o espectro de emissão da fluorescência sofreu uma discreta variação na posição do pico máximo de emissão o que pode ser resultante de uma interação entre as moléculas de ambos compostos. Este efeito pode ser causado por uma conjugação entre o grupamento aniônico do CdTe-MPA e a porção catiônica do complexo nitrosilo [97].

Figura 5.6: Espectros de emissão do PQ CdTe-AMP em solução aquosa ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), e após sucessivas adições de uma solução aquosa do complexo $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)NO]}^{2+}$ nas concentrações a - j: $0,0$; $0,4$; $8,0$; $1,2$; $1,6$; $2,0$; $2,3$; $2,7$; $3,3$ e $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, monitorada em 544 nm ($h_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$.

Com base nos resultados de fluorescência obtidos nos espectros mostrados na figura 5.6, foi construído o gráfico de **Stern-Volmer** acompanhando a intensidade máxima de emissão em 544 nm (Figura 5.7). Utilizando sete pontos do gráfico obteve-se um coeficiente de correlação linear (R) igual a $0,99$ e obtem-se a equação da reta a seguir. A constante de **Stern-Volmer** obtida através do gráfico apresentado

na Figura 5.7, foi igual a $8,4 \times 10^5 \text{ Mol}^{-1}$.

$$Y = 0,985 + 843224,4x \quad (5.6)$$

Figura 5.7: Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência do PQ540 CdTe-AMP em solução aquosa ($5 \times 10^{-6} mol.L^{-1}$), e após sucessivas adições de solução aquosa complexo $trans-[RuCl([15]aneN_4)NO]^{2+}$ nas concentrações de 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,3 $\times 10^{-6} mol.L^{-1}$, monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320nm$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5nm$.

O perfil de supressão observado apresentou-se linear, semelhantemente ao experimento realizado no complexo anterior. De acordo com relatos da literatura, o perfil linear descreve a predominância de um processo de supressão, ou estático, com a formação de um complexo não fluorescente, ou dinâmico. O espectro de absorbância do PQ não demonstrou alteração espectral mesmo após a mistura com a solução de complexo nitrosilo cuja concentração ($4 \times 10^{-6} mol.L^{-1}$) resultou em supressão quase total de sua fluorescência (Figura 5.8).

Estes resultados nos permitem inferir que a mistura de espécies não induziu em alteração estrutural das espécies envolvidas, que permitisse visualizar alteração espectroscópica.

Figura 5.8: Espectros de absorção do PQ540 ($10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença do complexo $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)(NO)]}^{2+}$ na concentração de $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

5.2.2 Avaliação da liberação de NO fotoinduzida pelo PQ CdTe-AMP e complexo $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)(NO)]}^{2+}$

A avaliação da liberação de NO quando submetido a irradiação foi determinada utilizando o sensor NO-meter pela técnica amperométrica. Numa cubeta de quartzo contendo 2,9 mL da solução aquosa do complexo nitrosilo $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)(NO)]}^{2+}$ na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, foram adicionados 50 μL da solução aquosa do PQ540 ($10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) sob agitação e esperou-se alguns minutos para os compostos interagirem. Mergulhou-se o sensor de NO nessa mistura e aguardou-se alguns minutos para a estabilização da corrente do eletrodo e iniciou-se a irradiação com o laser em 532 nm (dentro da faixa de absorção do PQ540). Não observou-se liberação de NO, então nova alíquota de PQ540 foi adicionada sem causar alteração na leitura do NO-meter que indicasse a liberação de NO. Apesar de observar-se uma pequena variação de corrente, de 0,002 μA esta não apresentou o perfil de liberação de NO pois foi semelhante à variação causada apenas pela água na ausência de ambos compostos (Figura 5.9a 3). Neste caso, concluímos que apesar de existir uma interação entre os compostos, esta interação não foi capaz de promover uma transferência de elétrons que resultasse na redução

do NO^+ e sua consequente liberação.

Figura 5.9: A: Cronoamperograma da solução do $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)(NO)]}^{2+}$ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) antes (1) e após adição de $50 \mu\text{L}$ do PQ (2) e somente em água (3). B: Espectro de absorção do complexo [15]ane após adição de $100 \mu\text{L}$ de PQ540 sem liberação de NO

Ao analisarmos os espectros de absorção do complexo, mesmo após adição de PQ540, não houve alteração do perfil eletrônico (Figura 5.9b).

Conforme resultados descritos, à medida que a concentração do complexo foi aumentada, a intensidade de emissão diminuiu porém não foi observado um deslocamento no pico máximo de emissão ou alterações nos espectros eletrônicos. Esse comportamento foi observado mesmo após alguns minutos após a adição do supressor.

A interação entre os compostos (fluoróforo e o supressor) pode ser alterada tanto pelos efeitos de carga como pelos fatores estéreos, devido aos ligantes volumosos de algumas moléculas. Dependendo da sua forma *cis* ou *trans* pode ocorrer interferência na transferência de elétrons entre o grupo doador e o grupo receptor de e^- [103].

Assim sendo, prosseguiu-se os experimentos com outro complexo nitrosilo de rutênio.

5.2.3 PQ CdTe-MPA meio aquoso - PQ540 e complexo nitrosilo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$

Para o PQ540, assim como para o CdS-ATG, o estudo da interação com do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ foi baseado no gráfico de Stern-Volmer.

O teste avaliando supressão da fluorescência pela interação entre os compostos foi realizado seguindo o mesmo detalhamento do experimento anterior (Figura 5.10). Para tanto, uma solução aquosa do PQ540 foi titulada com várias adições 10 μL de solução aquosa $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ do complexo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ e observou-se uma diminuição da fluorescência do PQ após cada adição de complexo e deslocamento do máximo de emissão para a região do vermelho. Os espectros de emissão da solução aquosa do PQ540 ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), foram realizados após sucessivas adições do complexo nitrosilo numa concentração estoque de $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ resultando em diferentes concentrações de 0,35 a $8,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 5.10: Espectros de emissão do PQ CdTe-AMP, em solução aquosa ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), e após sucessivas adições de uma solução aquosa complexo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ em diferentes concentrações de *a-x*: 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 2,0; 2,3; 2,8; 3,0; 3,5; 4,2; 4,5; 5,0; 5,3 e 6,0; 6,4; 6,7; 7,0; 7,4; 7,8; 8,1; 8,5 e $8,8 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$, monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$.

Nos espectros apresentados na Figura 5.10 observa-se a ocorrência do processo de supressão da fluorescência. À medida que a concentração do complexo foi aumentada, a intensidade de emissão diminuiu. Porém foi observado um deslocamento de 544 nm a 560 nm, diferença de aproximadamente 16 nm no comprimento de onda máximo de emissão do PQ540.

Diante dos espectros apresentados no gráfico anterior (Figura 5.10), um comportamento linear pode ser observado pela reta formada com apenas os seis pontos iniciais (Figura ??), podendo-se interpretar como a ocorrência de apenas um processo de supressão.

Figura 5.11: Gráfico de *Stern-Volmer* para a supressão da fluorescência do PQ540 CdTe-AMP em solução aquosa ($5,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), e após sucessivas adições de solução aquosa complexo $\text{cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)}_2\text{]}^{3+}$ nas concentrações de 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$.

Entretanto, ao adicionar maiores alíquotas do supressor, nota-se um deslocamento mais pronunciado do pico máximo de emissão na direção da região do vermelho. Para o estudo desse comportamento foram utilizados todos os pontos do primeiro gráfico. Devido ao deslocamento do pico máximo de emissão, o gráfico foi construído utilizando a concentração de supressor $[Q]$ versus a área integrada da intensidade do espectro de emissão e não o valor máximo de intensidade, modelo semelhante aplicado nos experimentos anteriores. A equação da reta obtida (Figura 5.12), resultou numa equação não linear com coeficiente de correlação (R) igual a 0,99.

$$y = 0,969 + 67514,10x + 7,65 \cdot 10^6 x^2 \quad (5.7)$$

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (5.8)$$

Onde: $K_D = K_{dinamico}$ e $K_S = K_{estatico}$.

Um gráfico de *Stern-Volmer* linear é geralmente indicativo de uma única população de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao supressor. Se duas populações de fluoróforos estão presentes, e uma delas não está acessível ao supressor, então os gráficos de *Stern-Volmer* desviam da linearidade, como mostrado na Figura

Figura 5.12: Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência do PQ540 CdTe-AMP em solução aquosa ($5,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), e após sucessivas adições de solução aquosa complexo $\text{cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)}_2\text{]}^{3+}$ nas concentrações de 0,0 a $8,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Monitorada em 544 nm ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$). Temperatura ambiente; $f_{ex} = f_{em} = 5 \text{ nm}$.

5.12.

O comportamento não linear da curva geralmente é atribuído a combinação de dois mecanismos de supressão da fluorescência, o dinâmico e o estático [102]. A resolução da equação não foi realizada visto que uma das constantes apresentaria valor negativo, o que não é possível. Isso mostra que o mecanismo de supressão com dependência quadrática pode estar associada a outro mecanismo diferente da associação do processo estático e dinâmico, como por exemplo a formação de agregado quando na presença de alta concentração de supressor.

Na tentativa de ajustar eses dados por linearidade, foi utilizado equação de Stern volmer modificada na determinação da fração acessível (f), onde ($K_a = K_S V$). Devido o deslocamento do pico máximo de emissão, não foram utilizados o valores de intensidade máxima de emissão de modo semelhante aos experimentos anteriores. Nesse caso os dados para a construção do gráfico foram obtidos da integral da área da intensidade de fluorescência.

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f} + \frac{1}{f \cdot (K_a)[Q]} \quad (5.9)$$

Utilizando os dados obtidos no experimentos da supressão, foi construído um gráfico obtendo-se um coeficiente linear de 0,99 e a seguinte equação da reta.

Figura 5.13: Gráfico de Stern-Volmer modificado.

$$y = 0,78 + 3,48 \cdot 10^{-6} x \quad (5.10)$$

onde valor $1/f = 0,78$, sendo $f = 1,3$ (K_a) = (K_{SV}) = $2 \cdot 10^5$

O mecanismo de supressão pode ocorrer pela formação de um complexo de transferência de carga (exciplex) entre as moléculas. Este efeito pode ser causado através de uma conjugação entre o grupamento aniônico do CdTe-MPA e a porção catiônica do complexo nitrosilo. Para tanto, essa interação ocorreria por atração eletrostática entre cargas positivas do grupamento amina do complexo com as cargas negativas do grupamento carboxila do PQ resultando numa supressão da fluorescência devido a progressiva adsorção do supressor na superfície do PQ [104]. Quando valores da fração são maiores que 1, considera-se a interação de 1 molécula de complexo nitrosilo de rutênio com vários pontos quânticos, o que indica agregação entre as espécies quando em presença de altas concentrações do supressor, o que causaria o deslocamento do pico máximo de emissão para a região do vermelho.

Outra explicação encontrada na literatura atribuído ao deslocamento do pico máximo de emissão é resultante dos diferentes tamanhos de partículas presente na solução. Em alguns casos, quando o supressor é adicionado, inicialmente as

partículas menores são suprimidas mais rapidamente enquanto que as maiores permanecem na solução, emitindo num comprimento de onda maior, resultando assim no deslocamento do espectro de emissão para a região do vermelho [97]. Mesmo sendo realizado o método de precipitação seletiva, na etapa pós preparo da síntese do PQ, o espectro eletrônico largo apresentado pelo PQ540 revela que há uma distribuição larga de tamanhos de partículas.

No gráfico 5.14 observa-se a alteração na absorbância do complexo nitrosilo pelas adições sucessivas de PQ540 nas concentrações de 1,4 a $8,20 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. A alteração no espectro de absorção do complexo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ quando da mistura com a nanopartícula PQ540, ocorre tanto em água como em tampão, formando um novo espectro eletrônico diferente da espécie inicial, destacando-se uma nova banda em 455 nm.

Figura 5.14: Espectro de absorção de *cis*-[Ru(bpy)₂(4-ampy)(NO)]³⁺ ($5,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações do PQ540 1-7: 0, 1,4; 2,8; 4,2; 5,5; 6,9 e $8,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução aquosa. Solução estoque de PQ540 $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Detalhe: *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ e o ligante livre (AMP).

Para ocorrer a transferência de elétrons entre as nanopartículas e o complexo nitrosilo é necessário o contato entre as moléculas [97, 105]. Devido as alterações espectrais, essas mudanças, provavelmente, são associadas à transferência de carga entre o complexo nitrosilo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ e o PQ540 já que a

alteração do espectro de absorção do respectivo complexo e o surgimento do ponto isosbético (320 nm) indicam uma mudança na estrutura eletrônica da molécula de rutênio, produzindo a mudança da sua simetria. Como já citado, os ligantes coordenados ao metal influenciam a simetria do complexo e ligantes π receptores fortes tendem a diminuir a estabilidade do grupamento nitrosilo, aumentando seu carácter eletrofílico [71].

Um espectro eletrônico similar àquele apresentado na Figura 5.14, foi obtido quando da mistura do ligante livre, ácido mercaptopropiônico à solução aquosa de $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ (Figura 5.15). Isto foi atribuído à formação da ligação S-nitrosotiol. Observações desta reação fora anteriormente destacada para complexos de rutênio(II) [106].

Figura 5.15: Espectro de absorção de $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ ($6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de concentração do ligante livre AMP ($0,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução tamponada pH 5,0 (solução tampão de acetato).

Pode-se conferir na Figura 5.15 a formação de um intermediário de absorção na região de 380 nm e o espectro do produto final apresentou uma proeminente banda em 455 nm, semelhante ao experimento descrito por Roncaroli e Olabe [106] na reação entre complexo nitrosilo de rutênio polipiridínico e cisteína.

Portanto pode-se inferir que a melhor representação da reação de interação entre o PQ540 e o complexo nitrosilo é a descrita na Figura 5.16:

Devido a relativa semelhança entre os espectros do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ e o espectro da associação deste com PQ540, foi realizado um experimento de cinética para verificar a velocidade de formação da nova espécie. Visto que a formação do nitro complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^+$ é dependente do tempo e do pH, foi

Figura 5.16: Proposta de reação entre PQ540 e complexo nitrosilo de rutênio.

utilizado uma solução tampão acetato pH 5,0 para que o pH mantivesse constante mesmo após a adição do PQ.

5.2.3.1 Estudo de cinética na interação PQ Ru-NO

As medidas cinéticas foram realizadas sob condições de pseudo primeira ordem, com excesso de um dos reagentes, PQ540 na concentração de 3×10^{-7} mol.L⁻¹ e duas concentrações diferentes do complexo RuNO 2,5 e 5×10^{-4} mol.L⁻¹ em solução tampão acetato de pH 5,0. Os comprimentos de onda monitorados foram em 280, 320 e 455 nm. Os cálculos de k_{obs} e tempo de meia vida de formação estão demonstrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Valores de constante de velocidade e meia vida.

Banda	k_{obs} (s ⁻¹)	meia vida (s)	k_{obs} (s ⁻¹)	meia vida (s)
280 nm	12,56	0,055	8,619	0,080
320 nm	5,03	0,1378	5,02	0,1380
455 nm	11,91	0,058	7,46	0,0929

Conforme esperado, a reação entre PQ540 e o complexo nitrosilo resulta na formação de uma nova espécie sem formação de intermediários, confirmado pela presença do ponto isobéstico em 320 nm.

5.2.4 Avaliação da liberação de NO fotoinduzida pelo PQ540 ao complexo cis -[Ru(bpy)₂(4-ampy)NO]³⁺

No intuito de avaliar a fotoliberação de NO, numa cubeta de quartzo adicionou-se uma solução do complexo cis -[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂³⁺ a 1×10^{-4}

mol.L⁻¹. Mergulhou-se o sensor de NO nessa mistura aguardou-se alguns minutos para estabilizar a corrente do eletrodo e iniciou-se a irradiação com o laser em 532 nm (comprimento de onda mais próximo da absorção do PQ540). O cronoamperograma não registrou alteração na corrente durante irradiação da solução do complexo isoladamente. Em seguida foi adicionado 100 μ L da solução aquosa do PQ540 (10^{-6} mol.L⁻¹) e esperou-se alguns minutos para os compostos interagirem. Após a adição da alíquota de PQ540 verificou-se a estabilização da corrente e somente sob irradiação pôde-se observar a alteração na corrente do sensor, indicando liberação do NO devido à fotólise da mistura (Figura 5.17).

Figura 5.17: Cronoamperograma de liberação do NO por fotólise ($\lambda_{ex} = 532$ nm): (preto) solução aquosa do complexo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂³⁺ (1×10^{-4} mol.L⁻¹); (cinza) mistura do complexo nitrosilo de rutênio com CdTe-MPA (10^{-6} mol.L⁻¹), em solução aquosa.

Outro experimento de fotoliberação de NO foi realizado variando-se a concentração do PQ540. Observou-se que em concentrações mais baixas de PQ ocorre uma maior liberação de NO (Figura 5.18) e que, conforme a concentração aumenta, passa ocorrer a precipitação do PQ, restando só o complexo em solução. A precipitação deve ser efeito da aglomeração das nanopartículas devido a alta concentração de outra espécie em solução.

A alteração no espectro sugere que o principal processo para a fotoprodução de NO é através de transferência de elétrons, haja vista que para ocorrer a transferência de energia pelo mecanismo de ressonância de Forster (FRET), torna-se necessário a sobreposição da banda de emissão do doador (PQ540) a banda de absorção do receptor (complexo nitrosilo) o que não é favorecido neste caso, como

Figura 5.18: Cronoamperograma de liberação do NO por fotólise ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$), em solução aquosa, da mistura do complexo nitrosilo ($3,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) com diferentes concentrações PQ 540 (azul) $8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$; (rosa) $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; (vermelho) $3,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; (verde) $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

pode ser observado na Figura 5.19.

Figura 5.19: Gráfico a esquerda: Espectro de absorvância do complexo nitrosilo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂³⁺ (preto), e fluorescência do PQ540 (Δ). A direita: Destaque da sobreposição entre as bandas dos compostos na região entre 450-550 nm.

Pode-se conferir que a absorção do complexo no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$) é menor que 0,02, valor semelhante encontrado quando da associação entre o complexo e o PQ.

Outro resultado que corrobora com o mecanismo de transferência de elétrons

é a medida do tempo de vida de fluorescência do PQ540 na presença do mesmo complexo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ (Figura 5.20).

Figura 5.20: Curva de decaimento de luminescência da solução aquosa do PQ540 livre ($2.2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e de sua solução análoga contendo complexo RuNO. ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) $\lambda_{exc} = 460 \text{ nm}$. Medidas realizadas no Centro de caracterização óptica da UCSB.

A Figura 5.20 apresenta a curva cinética de decaimento da fluorescência do PQ540 em solução aquosa, no seu máximo de emissão ($\lambda_{em} = 544 \text{ nm}$). A curva mostrou um comportamento biexponencial, onde observou-se um decaimento inicial rápido com os seguintes tempos: $\tau_1 = 3,7$; $\tau_2 = 20,74$ e $\tau_3 = 74 \text{ ns}$ para a solução de PQ540 livre e $\tau_1 = 1,8$; $\tau_2 = 7,5$ e $\tau_3 = 35 \text{ ns}$ para a mistura. As amplitudes correspondentes para as soluções mencionadas anteriormente foram 0.4; 0.34; 0.06 e 0.5; 0.17; 0.06 respectivamente.

A diminuição do tempo de vida geralmente ocorre devido ao processo de quenching que despopula o estado excitado do fluoróforo sem emissão de fluorescência, resultando na supressão do tempo de vida no estado excitado [44]. Entretanto, o tempo de vida não é influenciado pelo processo de supressão estática porque apenas as moléculas não complexadas, portanto fluorescentes, serão observadas [107]. Concluiu-se que há ocorrência de um processo de transferência eletrônica intermolecular fotoinduzida, reduzindo NO^+ para NO^0 , seguida pela liberação de NO.

A técnica de esetrofluorimetria também foi utilizada para avaliar o número de sítios ligantes no PQ para esse sistema PQ CdTe-MPA interagindo com o complexo nitrosilo de rutênio *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ pelo gráfico de supressão de fluorescência. Esses dados foram utilizados para determinação do

número de sítios ligantes no PQ de acordo com Moeno e colaboradores [108], através da equação modificada de Stern-Volmer:

$$\log\left[\frac{I^0 - I}{I - I_\infty}\right] = \log K_b + n \log[Ru - NO] \quad (5.11)$$

Onde I^0 e I são as intensidades de fluorescência do PQ na ausência e presença do complexo nitrosilo, respectivamente; I_∞ é a intensidade de fluorescência do PQ numa solução saturada com complexo; K_b é a constante de ligação; n é o número de sítios ligantes no PQ. Obteve-se então a seguinte equação da reta:

$$y = 10,43 + 1,86x \quad (5.12)$$

Através do gráfico 5.21, coeficiente de correlação (R) de 0,99 foi calculado o número de sítios ligantes (n) no PQ540 e esse foi igual a 1,86 (± 2), ou seja, cada nanopartícula do PQ está interagindo com 2 moléculas do complexo de rutênio. A constante de ligação (K_b) foi determinada igual a $2,7 \times 10^{10} \text{ Mol}^{-1}$.

Figura 5.21: Relação $\text{Log}(F-F_0)/(F-F_\infty) \times \text{Log}[RuNO]$ para determinação do número de sítios ligantes do PQ540.

A desativação onde o perfil não linear indica a combinação de processos, significa que duas populações diferentes estão envolvidas. Como já discutido, este processo necessita de que ambos compostos estejam em contato e esta difusão é dependente do tempo e concentração.

A acessibilidade do fluoróforo à molécula supressora [Q] influencia a eficiência de supressão, e a frequência de colisões entre as moléculas difundidas está relacionada com a constante de supressão bimolecular (K_q). O valor limite da constante de supressão colisional, K_q , encontra-se próximo a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Considera-se uma supressão de baixa eficiência quando os valores de K_q obtidos são menores que este limite, enquanto que valores maiores indicam algum tipo de ligação envolvida [109].

Conforme demonstrado, na equação abaixo, utilizando o valor médio do tempo de vida do PQ540 excitado na ausência do supressor (gráfico 5.22), pode-se determinar a constante de supressão bimolecular (k_q).

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_{mdio}} \quad (5.13)$$

$$k_q = 2 \times 10^5 \text{ (M}^{-1}) / 40,4 \times 10^{-9} \text{ (s)} = 5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$

O valor de K_q encontrado foi igual a $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que indica uma eficiente supressão pelo complexo rutênio-nitrosilo com formação de possível ligação entre os compostos.

Outros mecanismos podem estar envolvidos na liberação do NO, sendo estes passíveis de ocorrer quando em meio aquoso e na presença de oxigênio por duas diferentes vias: produção de ânion superóxido (O_2^-) [110], o qual promoveria a redução do ligante nitrosilo, levando à produção de NO^0 , ou via transferência eletrônica direta [29]. Ambos os processos são representados na Figura 5.22.

Figura 5.22: Esquema ilustrativo das possíveis vias de transferência eletrônica intermolecular fotoinduzida pelo PQ no complexo de rutênio, em meio aquoso aerado.

A energia de *band gap* (E_{gap}) do PQ CdTe descrito na literatura é de 1,43 eV

[111], valor que se encontra próximo à região do potencial redox para a formação do ânion superóxido $E^0_{O_2(O_2^{*-})} = -0,16 \text{ V}$ [112, 23] tornando esse processo favorável.

Para verificar a possibilidade de produção de ânion superóxido pelo PQ quando irradiado, realizou-se um experimento utilizando-se a técnica de Ressonância Paramagnética Nuclear (RPN) e uma substância que captura (*scavenger*) o ânion superóxido (TEMPO = 2,2,6,6 - tetrametilpiperidina - 1 - oxil; constante de velocidade como *scavenger* de $O_2^{2-} = 3 \times 10^5 \text{ M}$).

A análise é baseada no fato de que quando esta sonda (TEMPO) é oxidada por uma espécie reativa de oxigênio, ocorre uma diminuição no seu sinal de RPN ou EPR. Realizou-se, portanto, medidas de EPR de uma solução aquosa de PQ540 na presença da sonda TEMPO. As medidas foram obtidas para a mistura não irradiada e após irradiação ($\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$) em determinados intervalos de tempo (Figura 5.23).

Figura 5.23: Relação de intensidade de sinal em função do campo magnético de uma solução aquosa de PQ CdTe-MPA irradiada em 532 nm. Período de irradiação variou de 0 a 30 minutos conforme legenda.

De acordo com os resultados observados na Figura 5.24, pôde-se concluir que a irradiação do PQ promoveu a formação de ânion superóxido, porém em baixas concentrações. Isto é verificado pela pequena diminuição do sinal de EPR da sonda TEMPO. Desta maneira, redução do complexo de rutênio via ânion superóxido não é significativa na redução de NO^0 . O mecanismo predominante é o de transferência eletrônica intermolecular fotoinduzida direta.

Figura 5.24: Variação da intensidade do sinal de EPR em função do tempo de irradiação (minutos) em 532 nm da solução aquosa de PQ CdTe-MPA.

Através dos resultados obtidos pode-se fazer as algumas conclusões parciais.

As constantes de **Stern-Volmer** foram determinadas para cada processo de supressão utilizando dois complexos rutênio-nitrosilos como também dois pontos quânticos: CdS-ATG e CdTe-AMP (PQ540),

Na Tabela 5.2 encontram-se as constantes de **Stern-Volmer** obtidas para todos os experimentos:

Tabela 5.2: Constantes K_{SV} para os experimentos de supressão

PQs	Supressor [Q]	Perfil de regressão	$K_{SV}(\text{mol}^{-1})$
CdS-ATG	<i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺	Linear	$1,0 \times 10^6$
CdTe-AMP	<i>trans</i> -[Ru(NO)Cl([15]aneN ₄) ₂] ²⁺	Linear	$8,4 \times 10^5$
CdTe-AMP	<i>cis</i> -[Ru(NO)(4-ampy)(bpy) ₂] ³⁺	Não linear	$K_{SV} = 2 \times 10^5$ f = 1,3
CdSe ^a	TEMPO	Não linear	$K_S = 6,71 \times 10^5$ $K_D = 1240$
CdTe-AMP ^b	Soro fetal bovino (SFB)	Linear	$2,4 \times 10^6$

^a [113] ^b [114]

As constantes obtidas nos experimentos apresentaram valores de grandeza semelhantes entre si e em relação aos dados descritos na literatura.

Ao analisarmos a mistura com PQ CdS-ATG e complexo rutênio-nitrosilo observou-se a liberação de NO por processo redutimétrico. Nogueira e Jardim [115] relataram que a fotoestabilidade dos PQs nem sempre é atingida e por isso

dependendo do comprimento de onda de excitação pode ocorrer fotocorrosão, como, por exemplo, a formação de Cd^{2+} e enxofre.

O PQ540 foi associado a dois complexos rutênio-nitrosilo, *trans* - $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}([\text{15}] \text{aneN}_4)]^{2+}$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$. Ambos complexos mostraram interação com o PQ540, resultando em supressão da fluorescência do fluoróforo e obtendo-se as respectivas equações de **Stern-Volmer**.

A ausência na liberação do NO pelo complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}([\text{15}] \text{aneN}_4)]^{2+}$ quando da sua associação com PQ540 pode ser resultante da influência dos co-ligantes e da posição *trans* em relação ao ligante nitrosil que influencia na força de ligação $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+$. De acordo com a literatura, o ligante na posição *cis* interage com outro orbital do metal diferente daquele responsável pela retrodoação para o NO. O co-ligante bipyridina apresenta um maior caráter π -receptor e por isso uma menor retrodoação $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+$ promovendo liberação do NO [18] enquanto que para a espécie *trans*, estes apresentam maior força de ligação $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+$ [28] e maior retrodoação.

Outro fator também relacionado à geometria dos compostos é o impedimento estérico. O complexo rutênio-nitrosilo na posição *cis* favorece a aproximação dos ligantes 4-aminopiridina e o nitrosilo à superfície do PQ, com consequente formação de uma nova espécie de espectro diferente do inicial. Entretanto no complexo rutênio-nitrosilo na posição *trans* não foi observado alteração espectral quando da associação com o PQ. Conforme Figura 5.25, isto se deve ao impedimento que não favorece a aproximação do ligante nitrosilo ao grupamento tiol da superfície do PQ (Figura 5.25).

A interação entre o complexo nitrosilo *cis* - $[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ e PQ540 revelou-se o melhor sistema qualitativo na liberação da molécula de NO, por isso seus estudos foram prosseguidos.

Outra observação obtida através dos resultados mostrados foi que as constantes de supressão obtidas para este sistema ($\text{PQ540} + \text{cis} - [\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$), indicaram a participação de processo diferente do estáticos e dinâmico, que dependente da concentração do supressor.

Através das equações modificadas de **Stern-Volmer** foram obtidos a fração de acessibilidade, ($f = 1,3$); a constante de agregação (K_a) e constante de ligação

Figura 5.25: Proposta de interação entre PQ CdTe-MPA e complexos *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ (esquerda do PQ) e *trans*-[Ru(NO)Cl([15]aneN₄)]²⁺ (direita do PQ).

(K_b) e o número de sítios de ligação (n). Ressalta-se que apesar de apresentar baixo número de sítios de ligação, a constante K_b , de valor alto, indica interação por eficiente supressão entre os compostos.

A constante de ligação K_b obtida, no valor de $2,7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ apresentou valor superior ao relatado por Tansakul e colaboradores (2010) [113]. No trabalho descritos por esse grupo, foi descrito valor de K_b de $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para a interação entre PQs CdSe revestido por TOPO, de tamanho 3,3 nm, e radicais nitróxidos em tolueno. Todavia, foi observado que quando utilizado PQs de tamanho menor, o valor obtido de K_b é maior, sendo de diferente ordem de grandeza. Portanto, devido ao pequeno tamanho do PQ utilizado neste trabalho, 2,4 nm, considerou-se adequado o valor obtido em relação ao descrito na literatura.

Pela constante de supressão bimolecular (K_q), $0,17 \times 10^{12}$ observou-se uma relação dependente do tempo de contato entre ambas espécies em solução. Um dos valores de k_q mais altos descritos na literatura foi de $9,9 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ demonstrado por Jhonsi e colaboradores [114] ao relatar a interação entre CdTe-AMP e soro bovino desnaturado.

Baseados nos resultados obtidos pode-se propor que a interação entre as espécies ocorre na proporção 1:2, um ponto quântico (carga aniônica) interagindo com 2 moléculas de complexo nitrosilo (carga catiônica) resultando na liberação de NO após transferência eletrônica fotoinduzida.

Conforme resultados observados até o momento, verificou-se que apenas a interação entre o PQ540 e o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ apresentou liberação de NO e o mecanismo de interação proposto é a combinação entre os processos estático e dinâmico demonstrado pelo perfil não linear e a alteração no tempo de meia vida do estado excitado. Portanto os estudos foram continuados utilizando apenas este sistema: PQ540 e o complexo $cis\text{-}[\text{RuNO}(\text{bpy})_2(4\text{-ampy})]^{3+}$. Os estudos seguintes foram delineados a fim de quantificar a liberação de NO deste sistema em comparação ao complexo isolado.

Nesta segunda etapa os processos fotoquímicos da liberação de NO foram avaliados de modo quantitativo. O complexo nitrosilo escolhido para prosseguir os estudos foi $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2]^{3+}$ nomeado por Ru-NO, e os PQs utilizados foram os PQ540 e PQ600.

5.2.5 Estudos Fotoquímicos quantitativos

Estudos fotoquímicos utilizando o aparelho de NOA e diferentes fontes de excitação foram realizados após adaptação do sistema para este projeto. O processo para esta adaptação consistiu em ajustar o sistema de captação de NO pelo aparelho NOA ao conjunto de lentes e filtros. Conforme mostrado na figura abaixo, este arranjo consiste em:

Fonte de excitação utilizada: lâmpada de mercúrio (365 nm) e 3 diferentes lâmpadas de LED, (Light Emitting Diode), que emitem luz visível nas seguintes regiões: azul (470 nm), verde (530 nm) e âmbar (570 nm),

No caso dos LEDs fez-se algumas modificações: Essas lâmpadas não monocromáticas como o laser apresentam espectro com uma largura de banda relativamente estreita, mas significativa. Com o intuito de excitar a amostra em um comprimento de onda melhor definido, utilizamos a configuração conforme descrito na Figura 5.26a.

O primeiro componente após a fonte emissora de luz é a lente. Sua função é focalizar o feixe de luz, reduzindo a perda de energia por espalhamento e consequentemente aumentando a potência do feixe final. O segundo elemento é um filtro de longa passagem, responsável por restringir comprimentos de onda mais curtos do que o desejado. Por fim, o obturador, assim como nas câmeras fotográficas,

Figura 5.26: Sistema acoplado ao aparelho de NOA para os testes fotoquímicos: Direita para esquerda: (A) Fonte de excitação LED, (B) lente, (C) filtro de passagem, (D) obturador e (E) suporte para a mostra contendo cubeta de quartzo no formato Y e (F) agitador magnético.

abre e fecha controlando com precisão o tempo de exposição da amostra a luz. A amostra foi colocada numa cubeta no formato de Y que é acoplada às cânulas que direcionam o fluxo de gás ao aparelho NOA. O formato da cubeta em Y onde um dos orifícios é destinado à entrada do gás de arraste e o outro para a saída do mesmo gás somado à molécula de NO fotoliberada.

Como exemplo, na Figura 5.27, o espectro emitido pelo LED azul mostra-se estreito com um pico máximo em 475-480 nm, porém para impedir interferência de comprimentos de onda menores que este foi utilizado um filtro passagem longa cujo espectro de transmissão de 50% corresponde a 470 nm.

Figura 5.27: Espectro de emissão LED azul à esquerda e filtro de passagem à direita.

O aparelho NOA foi calibrado conforme descrito em metodologia. Utilizando diferentes concentrações de uma solução estoque do padrão NaNO_2 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) construiu-se um gráfico pelo número total de moles de NO_2^- (5, 25, 50, 250 e 500 $\times 10^{-12}$ Mols) versus área integrada obtida pelo aparelho, obtendo-se a seguinte equação da reta:

$$y = 33.494 + 9 \times 10^{12} x \quad (5.14)$$

Figura 5.28: Espectros de liberação de NO avaliado pelo NOA durante sua calibração. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das soluções. A direita: gráfico construído pelo número total de moles de NO_2^- vs. área integrada de NO liberado.

Para conhecer a fotoquímica dos compostos, a liberação de NO foi avaliada em diferentes condições: na presença e ausência do PQ, em diferentes soluções tampão de diferentes pHs (3,6 e 7,4) e em diferentes comprimentos de onda de excitação, levando em consideração o espectro de absorção de cada sistema.

A potência das diferentes fontes de excitação foi determinada usando as equações descritas na metodologia e os resultados foram:

- Lâmpada de Mercúrio em 365 nm: $2,28 \times 10^{15}$ fótons/sec, valor este determinado por actinometria.
- LEDs: $3,22 \times 10^{15}$ fótons/sec para: $2,40 \times 10^{15}$ fótons/sec e $6,17 \times 10^{15}$ fótons/sec para os respectivos máximos de excitação em 475, 530 e 570 nm.

5.2.5.1 Avaliação Fotoquímica do complexo de Rutênio na ausência de PQs

Como descrito anteriormente, o pK_a do complexo $cis\text{-}[\text{RuNO}(\text{bpy})_2(4\text{-ampy})]^{3+}$ é de 4,62. Sendo assim, pode-se obter duas espécies diferentes dependendo do pH, RuNO e RuNO_2 . No intuito de se avaliar a liberação de NO de cada uma das espécies em diferentes comprimento de onda de excitação, foram preparados duas soluções de complexos de rutênio em tampão citrato e fosfato a $6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ nos pH 3,7 e 7,4.

Figura 5.29: Espectro de absorção do complexo de rutênio ($6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em tampão citrato pH 3,6 (cinza) e em pH 7,4 (preto).

No espectro de absorbância das espécies, (Figura 5.29), pode-se observar o surgimento de uma banda na região do espectro do visível, em 426 nm , que é característico de complexos com fórmula $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{L})]^{3+}$ [18, 19]. Ambas soluções foram irradiadas nos seguintes comprimentos de onda por diferentes fontes de excitação: 365 nm por lâmpada de mercúrio, 475 nm LED de cor azul e LED verde em 530 nm . Para efeito de comparação, parte dos resultados de liberação de NO obtido pelo equipamento NOA foram apresentados nos gráficos da Figura 5.30.

Quando o complexo RuNO é irradiado em 365 nm na ausência de PQ, observa-se maior liberação de NO da solução tampão de pH 3,6 quando comparado à solução tampão de pH 7,4. Isso ocorre devido a esta região corresponder à banda de transição TCML $d\pi\text{Ru} - \pi_{\text{NO}}$, gerando os possíveis fotoprodutos $[\text{Ru}^{\text{III}}(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$ ou a espécie $[\text{Ru}^{\text{II}}(4\text{-ampy})(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.

Já o mecanismo proposto para a produção de NO pelo complexo nitro em pH 7,4 sob irradiação a 365 nm corresponde a cisão homolítica do grupo nitrito e

Figura 5.30: Sobreposição das curvas de liberação de NO avaliadas pelo NOA sob irradiação de lâmpada de mercúrio (365 nm) em tampão pH 3,6. Picos da esquerda para direita: correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 30 s, 60 s e 90 s finalizando com 5 minutos de irradiação.

posterior formação de NO.

Entretanto, pela análise da Figura 5.31, observa-se que o composto RuNO em, pH 7,4, libera NO em maior quantidade que quando irradiado na região de 475 nm em comparação ao de 365 nm. Fator que pode corroborar para este mecanismo envolve a eficiência da cisão homolítica em comparação a transferência de carga. Aparentemente o primeiro processo é mais eficiente.

Figura 5.31: Sobreposição dos espectros de liberação de NO avaliados pelo NOA sob irradiação de LED azul (475 nm) em soluções tampão pH 3,6 e 7,4. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 30s, 60s, 5s e 10s.

O decaimento da intensidade de corrente, que é proporcional a concentração de NO, observado na Figura 5.31, deve-se provavelmente ao efeito filtro interno, produção do $[\text{Ru-H}_2\text{O}]^{2+}$, como também pode ser devido à diminuição da concentração de Ru-NO na solução.

O complexo Ru-NO também foi irradiado no comprimento de onda em 530 nm (LED verde) (Figura 5.32). Observou-se pequena alteração no sinal do NOA pela irradiação quando em tampão acetato, porem insignificante se comparado ao composto irradiado em pH 7,4 (Figura 5.32).

Figura 5.32: Sobreposição dos espectros de liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED verde (530nm) em soluções tampão de pH 3,6 e 7,4. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 30s, 60s, 90s e de 5 minutos apenas realizado em pH 7.4.

Resumidamente, todos os dados obtidos pelo NOA e as respectivas variações de corrente relativo a de liberação de NO, originados apenas do complexo de rutênio, estão descritos na Tabela 5.3. Para efeito de comparação os dados correspondem ao mesmo tempo de irradiação de 30s.

Conforme esperado, os maiores valores de rendimento quântico foram obtidos na região do ultravioleta em 365 nm para o complexo RuNO, na qual a banda irradiada corresponde à TCML $d\pi\text{Ru}-\pi^*\text{NO}$. Outro valor de quantidade de NO semelhante fora encontrado para a espécie RuNO_2 porem com processo fotoquímico relacionado à cisão homolítica do ligante nitro coordenado ao Ru(II).

Quando excitado em 530 nm, observou-se um aumento de pMols de NO liberado após conversão da forma nitrosilo para nitrito. Ressalta-se aqui que o

Tabela 5.3: Relação de rendimento quântico de NO resultante da reação fotoquímica de diferentes soluções do complexo de rutênio submetidos a 30s de irradiação. Os Resultados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 3 leituras diferentes no mesmo tempo de irradiação.

λ_{exc}	Sol. Tampão	pH	pMol*NO	ϕ_{NO}
365 nm	Citrato	3,6	354	0,79
365 nm	Fosfato	7,4	182	0,40
475 nm	Citrato	3,6	138	0,08
475 nm	Fosfato	7,4	1126	0,72
530 nm	Citrato	3,6	25	0,02
530 nm	Fosfato	7,4	330	0,28

aumento foi resultante da maior absorção da espécie nitrito na região de excitação.

5.2.6 Avaliação Fotoquímica do complexo de Rutênio na presença de PQs

Após observação dos resultados acima descritos, o experimento foi repetido seguindo os mesmos parâmetros do procedimento anterior porém nesta etapa as nanopartículas (PQ540 nm e PQ600 nm) foram adicionadas às soluções de rutênio recém preparadas. A adição do PQ540 foi realizada durante a irradiação com LED verde (λ_{max} 530 nm) enquanto que o PQ 560 nm na irradiação pelo LED ambar (λ_{max} 560 nm). Ressalta-se que na concentração utilizada no experimento com PQ600, ambos compostos apresentaram pouca absorção no comprimento de onda no qual foram excitados.

Procedeu-se então os estudos fotoquímicos comparando a liberação de NO na ausência e presença da nanopartícula PQ 490.

O sinal obtido do NOA a mistura PQ RuNO foi irradiada em 530 nm esta mostrado na Figura 5.33. Pode-se observar quatro picos sendo: o pico 1 correspondente a uma pequena liberação de NO enquanto que os picos 3 e 4 correspondem à mesma solução acrescida de 100 μ L da solução de PQ540 cuja concentração em solução foi aproximadamente de $3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida novas

leituras foram realizadas utilizando a mesma solução inicial porém em diferentes tempos de irradiação (60, 90 s e 5 minutos) o que mostrou reprodutibilidade.

Figura 5.33: Liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED em (λ_{exc} 530 nm). Picos 1-4: 1) solução tamponada pH 3,6 de RuNO ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) sob irradiação de luz por 30s; 2) pico resultante abertura do sistema para adição de 100 μL de PQ ($3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) (pico desconsiderado); 3) mesma solução RuNO+PQ490 sob irradiação por 30s; 4) repetição do procedimento descrito no pico 3

Estudos recentes publicados por Ford e colaboradores [105] descrevem que o uso de PQ aumentou a eficiência quântica na liberação de NO de um complexo de cromo baseado no processo de transferência de energia. Entretanto ainda não foi descrito liberação de NO de complexos nitrosilos de rutênio por processo de transferência eletrônica fotoinduzida.

Novamente, em outro experimento, os estudos fotoquímicos avaliaram a liberação de NO na ausência e presença da nanopartícula em pH 7,4.

Nas Figuras 5.34 e 5.35, referentes à fotólise na ausência e presença de PQ540, em solução tampão de pH 7,4, pode-se observar a diferença na variação do sinal em função da adição do PQ540 à solução RuNO. Os resultados obtidos estão descritos resumidamente na Tabela 5.4.

Em seguida, realizou-se o mesmo protocolo para avaliação de NO liberado na ausência e presença do PQ600 quando em solução tampão de pH 7,4 (Figura 5.36). Conforme observado, pequena liberação de NO foi obtida quando da irradiação em λ_{max} 560 nm para o complexo livre. Isto pode ser racionalizado pelo fato de que λ_{max} irradiado localiza-se em região onde há baixa absorção pelo complexo RuNO em pH

Figura 5.34: Liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED (λ_{exc} 530 nm) em solução tamponada pH 7,4 de RuNO (10^{-4} mol.L $^{-1}$). Picos da esquerda para direita correspondem às repetições das soluções de RuNO sob os respectivos tempos de irradiação: 2, 5, 10, 30 e 60 s.

Figura 5.35: Liberação de NO avaliado pelo NOA sob irradiação de LED (λ_{exc} 530 nm) em solução tamponada pH 7,4 de RuNO (10^{-4} mol.L $^{-1}$) na presença de PQ540. Picos da esquerda para direita correspondem às repetições de irradiação das respectivas soluções de RuNO : 2, 5, 10, 30 e 60 s.

7,4 (Figura 5.29). Ao se adicionar o PQ600 à solução do complexo de rutênio, observou-se que a fotólise conduzia a um aumento significativo de NO, semelhante àquele ocorrido em pH 3,6 (Figura 5.33).

Esta mesma solução contendo o PQ600 (Figura 5.36) foi submetida a novas irradiações com tempos de exposição à irradiação de 30s e 60s confirmando reprodutibilidade do sistema. Aparentemente cisão homolitica fora favorecida por

Figura 5.36: Espectro de liberação de NO irradiação de LED ambar (λ_{exc} 560 nm) em tampão 7,4. Picos da esquerda para direita correspondem a repetições das respectivas soluções de RuNO sob irradiação de 2, 5, 10, 30 e 60s. O símbolo (*) refere-se ao momento da abertura do sistema para injeção do PQ600. Na sequência, as irradiações nos tempos de 2, 5, e 10s.

este processo.

O resultado mostrado na Tabela 5.4 revela a diferença na liberação de NO quando comparada a solução do complexo de rutênio antes e após adição dos PQs. A intensificação ou aprimoramento do sistema de liberação de NO utilizando PQ540 em solução tampão pH 3,6 foi de 6 vezes maior quando comparado à solução de complexo sozinha, sem adição dos PQs. Em pH 7,4, na presença e ausência de pontos quânticos resultados semelhantes foram obtidos quando a irradiação do PQ 540 fora realizada em 530 nm. Para os mesmo experimentos com PQ600, a liberação de NO parece estar diretamente relacionada ao tipo de sensibilização ocasionada pelo PQ ao RuNO₂. A cisão homolítica do grupamento NO₂⁻ parece ser beneficiada nesse processo em detrimento à transferência de carga entre PQ e complexo de rutênio. Acrescenta-se ainda que p PQ em solução de valor de pH mais baixo que 4,0 mostrou-se menos estável em solução.

O aumento na liberação de NO pelo sistema utilizando PQ600 e o mesmo

Tabela 5.4: Relação de pico mols de NO resultante da reação fotoquímica de diferentes soluções tampão citrato (pH 3,6) e fosfato (pH 7,4) do complexo de rutênio submetidos a 30s de irradiação.

	λ_{exc}	pH	pMol*NO
RuNO	530 nm	3,6	20
RuNO + PQ540	530 nm	3,6	157
RuNO	530 nm	7,4	336
RuNO + PQ540	530 nm	7,4	252
RuNO	560 nm	3,6	-
RuNO+ PQ600	560 nm	3,6	67
RuNO	560 nm	7,4	25
RuNO+ PQ600	560 nm	7,4	403

complexo em pH 7,4 foi cerca de 15 vezes maior quando comparado ao complexo isolado.

Os dados não mostrados na tabela foram ocasionados pelo baixo rendimento da reação impossibilitando assim a determinação da área e posterior cálculo de pMols de NO liberado.

Mediante os resultados obtidos pode-se fazer algumas conclusões parciais: A liberação de NO do complexo RuNO na ausência de PQs mostrou-se eficiente e com alto rendimento quântico, o que está de acordo com seu espectro de absorção, visto que as respectivas bandas de excitação (365 e 475 nm) encontram-se na mesma região das bandas atribuídas às transições TCML e d-d.

Ao utilizarmos o PQ como antena na captação de energia, observou-se que apenas o sistema PQ540 + RuNO em solução tampão 3,7 apresentou melhor rendimento que o complexo sozinho, obtendo-se aumento de aproximadamente 6 vezes. Esse mesmo comportamento não foi observado quando em solução tampão em pH 7,4.

O sistema PQ600 + RuNO apresentou o melhor rendimento em número de mols de NO liberado em tampão 7,4 mesmo quando comparado ao complexo isoladamente como também do conjugado em tampão pH 3,6. Este aumento no

rendimento foi observado em relação ao número de pico mols da molécula de NO liberada.

Comparando o rendimento entre os dois sistemas, observa-se que o valor em pico mols e do segundo sistema, PQ600 irradiado no LED âmbar, foi dobrado em relação ao sistema usando o PQ540 irradiado pelo LED verde. Esse aumento mostra a relação que existe entre o número de fótons emitidos e absorvido, pois a potência do LED âmbar é de quase o dobro do LED verde o que demonstra que a reação fotoquímica de liberação depende da potência da fonte de irradiação.

Destaca-se então que as reações fotoquímicas com maior produção de NO foram as reações resultantes da alta absortividade molar do complexo isoladamente próximas λ_{exc} . Entretanto, deve-se ressaltar que a melhor atividade dos PQs foi demonstrada nas regiões de baixa absorção pelo complexo apenas. Aliás, tais λ_{exc} em ambos sistemas PQ + RuNO foram irradiados fora do pico máximo de absorção do PQs. Este fato corrobora na afirmação de que os PQs apresentam alta absortividade molar pois mesmo não irradiando no seu comprimento de onda máximo, pode-se excita-lo ao irradiar numa região próxima.

Portanto pode-se inferir que PQs apresentam-se como promissores fotossensibilizadores para a captação de luz sendo hábil a promover o processo de transferência eletrônica intermolecular fotoinduzida. Essa transferência pode ocorrer pela redução do NO^+ para NO^0 , seguida pela liberação de NO ou por fotoaquação e consequente fotoredução do nitrito em solução.

De modo geral a liberação de NO do complexo de rutênio contendo as espécies nitrito ou nitrosil podem ocorrer por transferência de carga direta e ou cisão homolítica dde nitrito.

6 *Análise de Imagem e avaliação da citotoxicidade em células tumorais*

UMA das maiores aplicações dos PQs é em diagnóstico como sonda fluorescente devido suas propriedades óticas e eletrônicas únicas. Seu tamanho e composição permitem com que eles emitam fluorescência intensa e estável do visível ao infravermelho e apresentem alto coeficiente de absorção em uma larga faixa espectral.

Este capítulo descreve a aplicação de PQs em eletroforese como método de avaliação da interação do PQ540 e o complexo rutênio-nitrosilo *cis*-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺, (RuNO), acompanhando seu comportamento sob influência de uma corrente elétrica sobre os compostos separadamente e de suas misturas. Também avaliou-se a possibilidade de aplicação dos PQs e de seu conjugado como marcadores celulares, analisados por microscopia de fluorescência em tempo real (FLIM) e confocal, assim como sua atividade citotóxica em linhagem de célula tumoral B16F10.

6.1 *Análise da Interação entre os compostos por eletroforese*

A mobilidade eletroforética do PQ540, complexo RuNO e do conjugado é dependente da carga de cada espécie. No intuito de avaliar a carga final da espécie conjugada, foi realizado um teste utilizando a técnica de eletroforese. Numa cuba de eletroforese (Figura 6.1) em gel de agarose, os compostos foram aplicados nos poços em diferentes proporções e combinações da solução de glicerina 30%. Neste primeiro teste, as amostras foram aplicadas nos poços presentes no centro do gel, de maneira que ao se aplicar o potencial, as espécies migraram em direção às suas

cargas contrárias.

Pode-se observar na Figura 6.1 que enquanto o PQ540, de carácter aniônico migrou para o lado positivo, o complexo RuNO, catiônico e não fluorescente, migrou para o lado positivo. A solução contendo a espécie conjugada em diferentes proporções, apresentou corrida eletroforética diferente para cada amostra.

Através desse resultado, demonstrado na Figura 6.1, confirmou-se que a interação entre o PQ540 e RuNO é suficiente para causar alteração na corrida eletroforética do fluoróforo. Foi possível visualizar o deslocamento dos PQs, com carga negativa, no sentido do pólo positivo. Enquanto que o complexo sozinho, carga positiva, deslocou-se para o pólo negativo.

Figura 6.1: Efeito da mobilidade e intensidade luminescente das bandas do fluoróforo PQ540 e de seu conjugado PQ540-RuNO. A, B e C correspondem às soluções aquosa de PQ ($3,5 \times 10^{-6}$ M); mistura de PQ-RuNO ($1,4 \times 10^{-3}$) e o complexo sozinho ($2,5 \times 10^{-3}$) respectivamente.

Num segundo experimento (Figura 6.2) com os mesmos compostos e parâmetros, ressalta-se a coloração observada tanto na imagem submetida a luz branca quanto pela luz UV emitida exclusivamente pelos PQs.

Estes resultados corroboram com a atribuição de "associados" à espécies RuNO e PQ's.

6.2 Análise de imagem por Microscopia FLIM

Baseado nos dados acima e considerando-se os ensaios necessários postulados para o desenvolvimento deste projeto relacionados a aplicação biológica, outro experimento baseado na fluorescência dos PQs foi realizado pela técnica de

Figura 6.2: Bandas do fluoróforo PQ e PQ-RuNO sob luz branca (A) e luz UV (B). Direita para esquerda: solução aquosa de PQ; mistura de PQ em concentrações

FLIM (imagem de tempo de vida de fluorescência-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Nesta, varredura comparativa entre as regiões que apresentam luminescência e regiões não luminescentes são confrontadas.

Na Figura 6.3 resultados relativos a ensaios em células B16F10, contendo PQ, são destacados. É possível visualizar que na figura A não há luminescência, pois não é distinguível o contraste com outras áreas no mesmo campo de visão. Esta região corresponde às células controle, sem adição de composto. Quando comparado ao background, figura A, as figuras B, C e D apresentaram contraste entre a região sem luminescência. Isto nos permite inferir que o PQ foi internalizado pelas células, haja visto se tratar da única espécie luminescente no meio estudado.

Este resultado preliminar revela que o PQ540 pode ser encontrado distribuído nas células de melanoma e é capaz de ser utilizado como biomarcador.

De modo a avaliar se essa interação entre o PQ540 e as células é capaz de alterar as propriedades do PQ, o tempo de vida dessa espécie foi medido em diferentes localizações no meio de cultura. Pela análise qualitativa de imagem por fluorescência foi observado que o tempo de vida médio das nanopartículas, quando comparado a porção de maior luminescência, em relação a regiões de menor luminescência, apresentaram diferentes decaimentos no tempo de vida do estado excitado (Figura 6.4).

Aparentemente o tempo de vida do PQ nos leva crer na sua estabilidade, tal como observado em solução.

Figura 6.3: Microscopia de FLIM das células B16-F10 incubadas com PQ540 por 4h. A) amostra controle sem PQ540; B) célula contendo PQ540; C e D imagens em diferentes ângulos, XZ e ZY respectivamente.

6.3 Análise de Imagem por Microscopia de fluorescência Confocal

Numa cultura de células da linhagem melanoma murino B16-F10, após o período de incubação para crescimento e adesão das células às placas de cultura, foi adicionado solução aquosa de PQ540 (10^{-9} M) e de sua mistura com complexo RuNO (10^{-6} M). A análise da amostra em microscópio confocal foi realizada seguida da incubação com os compostos por 4 h (Figura 6.5).

Neste resultado preliminar podemos observar que o PQ540 pode ser encontrado distribuído nas células de melanoma e é capaz de emitir fluorescência. Pressupõe-se a continuidade da associação PQ-RuNO, tal como observado em meio aquoso.

Figura 6.4: *Diferentes Tempos de vida da luminescência dos PQs no sistema biológico. Figura interna indica região correspondente para cada tempo de vida: interior da célula -Azul (A); parte externa da célula-Preto (P) e porção não celular-Vermelho (V).*

Figura 6.5: *Imagem de células B16-F10 incubadas com as nanopartículas PQ (1) e mistura PQ-RuNO (2) por 4 h. (A) Imagem em campo claro sem luz de excitação λ exc 490 nm; (B) espécie fluorescente internalizada e células controle (C) sem PQ540. Barra de escala 20 μ m.*

- **Microscopia de fluorescência utilizando filtros (GFP e DAPI)**

Seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente, os PQs foram incubados por 3 horas em meio RPMI conforme protocolo. E após esse tempo

as células foram lavadas três vezes em PBS e posteriormente incubadas em meio RPMI por 20 minutos com o corante de núcleo Hoechst para melhor visualização da estrutura celular e localização do PQ internalizado.

Através do microscópio de fluorescência combinado a filtros específicos (GFP e DAPI), pode-se visualizar os PQs na concentração de 10^{-9} M internalizados na cultura de células B16-F10.

Figura 6.6: Imagem de células B16-F10 incubadas com as nanopartículas PQ540 por 3 h. (A) Imagem em campo claro, sem luz de excitação; (B) núcleo corado com Hoechst, sob filtro UV; (C) espécie fluorescente internalizada utilizando filtro GFP (D) sobreposição das imagens B e C.

Através das imagens obtidas é perceptível observar a internalização dos PQs pela delimitação da região fluorescente. Note o padrão de distribuição intracelular do fluoróforo, em verde, difuso pelo citoplasma enquanto que o corante de núcleo encontra-se localizado no núcleo da célula.

Pela análise das imagens observa-se maior tendência de agregação citoplasmática perinuclear do PQ, próximo ao limite do citoplasma celular.

6.3.1 Teste de internalização celular e posterior análise por espectroscopia de absorção atômica em células B16-F10.

Confirmada a interanálise dos PQs nos testes anteriores, foi avaliado a quantidade do complexo que de fato foi internalizada pelas células durante o mesmo período de incubação do teste descrito na Figura 6.5. Para isso foram realizados ensaios de up take celular utilizando espectrofotometria de absorção atômica para análise do metal. A técnica analítica é seletiva e constitui-se em uma forma precisa de se saber qual concentração do complexo foi responsável pelos efeitos observados. Análise da espectroscopia de absorção atômica indica a quantidade de rutênio (%) no interior das células através de análises de ICP-MS. Na concentração de 1×10^{-6} M, cerca de 0,46% do complexo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]³⁺ foi internalizado pelas células B16-F10 após 4 h de incubação, resultado semelhante também foi mostrado pelo grupo utilizando outros complexos nitrosilos de rutênio [43].

Baseado nessas informações é possível inferir que PQ540 mesmo na presença de RuNO, foi capaz de emitir fluorescência servindo como marcador celular e possível carreador de fármacos.

6.4 Ensaios de Citotoxicidade - Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

A atividade citotóxica do complexo e do PQ foi avaliada por análise da viabilidade celular obtida para cada um dos dois compostos, em diferentes concentrações, sem fotoestímulo (ausência de irradiação) e sob irradiação de diferentes comprimentos de onda na dose de 4 J/cm^2 . Foram realizados ensaios para determinação de alguns parâmetros como o tempo de incubação e a concentração máxima dos compostos que não causasse toxicidade sem fotoestímulo. As soluções de PQ540 utilizadas foram obtidas de diluições seriadas da solução estoque de concentração inicial de 10^{-6} M (1 mg/mL).

Durante a realização dos experimentos de citotoxicidade dos complexos de rutênio através do método de MTT, acompanhamos por meio de fotografia as diferentes etapas envolvidas no cultivo celular, Figura 6.7. Esse acompanhamento

é de extrema importância uma vez que possibilita a visualização de quaisquer alterações no meio de cultura, no cultivo ou ainda eventuais contaminações.

Nesse período foram realizados testes de citotoxicidade para o complexo nitrosilo *cis*-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)₂]₃₊ nas linhagens celulares de melanoma murino (B16-F10).

Figura 6.7: *Imagens analisadas em Microscópio Biológico invertido binocular durante os experimentos de viabilidade celular. A. Células melanoma murino, linhagem B16-F10. B. Células melanoma, linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com MTT (formação de cristais de formazan de coloração púrpura). C. melanoma murino, linhagem B16-F10 após tripsinização.*

Foram utilizadas as células da linhagem B16-F10 como modelo de células tumorais, essa linhagem é especializada em invadir a circulação e induzir metástases, portanto é considerada um modelo ideal para estudar o tratamento de melanoma maligno metastático.

Pode ser observado na Figura 6.8, que o PQ540 não apresentou citotoxicidade nas concentrações utilizadas e o tempo de exposição de 4 ou 24 horas não causaram danos sobre as células.

Figura 6.8: Efeito do PQ540 na viabilidade celular de células tumorais B16-F10 avaliado por MTT. As células foram tratadas e pré-incubadas por 4 horas e 24 horas com PQ540 nas concentrações de 10^{-10} M; 10^{-9} M e 10^{-8} M. Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle

Determinada a condição na qual o PQ não mostrava toxicidade no escuro, novo teste fotoestimulando as células foi realizado após 24 horas de incubação na presença dos compostos.

Nesta etapa foi modificado o meio de cultura utilizado para irradiação, trocando o RPMI contendo fenol red- indicador de pH pelo RPMI sem indicador, devido o primeiro apresentar banda de absorção na região de excitação.

O complexo RuNO nas concentrações de 5×10^{-5} M e 1×10^{-5} M foram adicionadas para verificação de sua toxicidade quando fotoestimulados a (4 J/cm^2) separadamente.

As diferentes concentrações de complexo de rutênio não se mostraram tóxicas quando irradiadas separadamente, exceto o PQ540 na maior concentração (10^{-8} M), que apresentou toxicidade de 30% em relação ao controle quando na ausência de irradiação. Por isso prosseguiu-se para averiguação das concentrações 10^{-9} e 10^{-10} M do PQ e do efeito em células quando combinados ao complexo. No experimento seguinte (Figura 6.10), as células da linhagem B16-F10 foram tratadas com solução da mistura de PQ540 e complexo cis-[Ru(NO)(bpy)₂(4-ampy)]³⁺ em

Figura 6.9: Efeito do PQ540 e complexo $\text{cis-}[Ru](NO)(4\text{-ampy})(bpy)_2]^{3+}$ na viabilidade celular de células tumorais B16-F10. As células foram tratadas e pré-incubadas por 4 horas com ambos compostos separadamente e irradiados a 527 nm na dose de 4 J/cm². Os dados apresentados representam as médias S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle.

duas concentrações diferentes, na proporção 1:1 e fotoestimuladas em dois diferentes comprimentos de onda de excitação: 470 nm e 527 nm com tempo de irradiação de 8 minutos que correspondem a uma dose de 4 J/cm².

O resultado reafirma a ausência de atividade citotóxica do complexo RuNO sobre linhagens de células de melanoma (B16-F10). Entretanto não houve alteração da atividade citotóxica entre os compostos mesmo após submetidos a irradiação. Novo teste foi realizado variando a dose de irradiação pois conforme descrito no capítulo anterior (Capítulo 5) pode-se perceber que quanto maior o tempo de irradiação sobre a amostra, maior número de mols de NO são liberados. As doses utilizadas foram calculadas baseadas no tempo de irradiação: para 4 minutos, 2 J/cm² ; 8 minutos, 4 J/cm² e 12 minutos, 6 J/cm².

Os resultados celulares realizados demonstraram baixa citotoxicidade quando comparados aos tratamentos na ausência de irradiação e os submetidos a irradiação.

Figura 6.10: Efeito citotóxico do complexo $cis-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)_2^{3+}$ sobre linhagens de células tumorais B16-F10, na ausência e presença do PQ540. As células tratadas foram irradiadas (4 J/cm^2) após 4h de incubação com os compostos e a viabilidade celular avaliada após 24 horas do tratamento. Os dados apresentados representam as médias S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle.

Como estratégia para proteger os compostos dos interferentes do meio foi proposto a encapsulação destes. Existem diferentes formulações farmacêuticas que podem auxiliar na entrada de diferentes compostos nas células de modo a promover um aumento na atividade citotóxica e da concentração intracelular, dentre elas destaca-se os lipossomas.

Lipossomas são vesículas formadas por uma bicamada fosfolipídica e devido sua constituição, é capaz de encapsular tanto compostos polares como apolares.

Figura 6.11: Viabilidade celular do complexo $cis-[Ru](NO)(4-ampy)(bpy)_2\}^{3+}$ sobre linhagens de células tumorais B16-F10, na ausência e presença do PQ540 em diferentes doses de irradiação após 4h de incubação com os compostos e a viabilidade celular avaliada após 24 horas do tratamento. Os dados apresentados representam as médias S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Resultados de viabilidade expressos em porcentagem em relação ao controle.

Essa nanopartícula foi utilizada a fim de incorporar o conjugado PQ e o complexo RuNO para verificarmos se de fato haveria algum ganho significativo na atividade citotóxica. Entretanto, apenas o PQ encapsulado foi avaliado em teste *in vitro* para efeito de comparação entre sua forma não encapsulada. Sabe-se que as vesículas de lipossomas estão em suspensão e portanto não é possível o uso de unidades de

medida em gramas ou mesmo peso molar e sim porcentagem em relação ao volume final de cada poço da placa de cultura. Por isso, os compostos foram avaliados nas proporções 10 e 25% v/v e comparados com o controle, ausência de droga, tendo por controle positivo a água.

A atividade citotóxica do PQ encapsulado comparado com a solução do PQ não encapsulado na concentração de 10^{-9} M, do lipossoma vazio em relação ao controle. Procedeu-se o estudo utilizando diferentes modos de análise avaliando os diferentes parâmetros que poderiam influenciar o resultado do estudo:

- menor porcentagem de meio que poderia ser retirado sem causar danos às células;
- menor porcentagem de lipossoma vazio (Lp) que não apresente toxicidade;
- menor porcentagem de lipossoma encapsulado (LpPQ) a ser utilizado sem atividade tóxica.

Figura 6.12: Porcentagem de viabilidade celular de células B16-F10 após 24h de incubação na presença dos compostos em diferentes porcentagens (v/v).

Analisando o gráfico 6.12 faz-se as seguintes observações:

- O resultado obtido revelou que apenas um volume menor que 10% de meio pode ser retirado para que não cause morte celular.
- O lipossoma vazio, quando usado numa porcentagem maior que 10% apresenta toxicidade

- A solução aquosa de PQ na mesma concentração do PQ encapsulado apresentou resultado diferente do que foi observado em outros experimentos, reforçando que o lipossoma facilita a permeação do PQ para o interior da célula, com aumentando do efeito tóxico.

Nesse experimento a concentração de PQ540 utilizada resultou numa atividade citotóxica, assim sendo, estudos futuros uma concentração menor do PQ540 poderá ser utilizada, bem como a avaliação de seu conjugado com o complexo RuNO.

A atividade citotóxica do PQ, do complexo e o conjugado foi avaliada por análise da viabilidade celular utilizando a técnica colorimétrica de MTT. Os compostos foram testados em diferentes concentrações e avaliados tanto na ausência de irradiação (no escuro) como na presença desta.

Os resultados demonstraram que tanto os PQs como o complexo $\text{cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)}_2\text{]}^{3+}$ não apresentaram toxicidade nas concentrações nano molar quando no escuro, porém quando submetidas à irradiação foi observado atividade citotóxica dependente da potência da fonte de irradiação, resultado que corrobora os estudos fotoquímicos realizados e discutidos no Capítulo 5.

Em fototerapias, para melhor eficiência do tratamento, a excitação dos compostos deve se enquadrar na região chamada de Janela Terapêutica devido a transparência óptica dos tecidos, onde a pele e componentes celulares causam menor interferência por apresentarem baixa absorção. Entretanto ainda não há um consenso na delimitação desse região, sendo sugerido absorção próxima da região do vermelho [47].

Visto que os PQs 600 em testes preliminares, também não apresentaram toxicidade nas concentrações entre 10^{-8} a 10^{-10} M na ausência de luz, (dado não apresentado), os estudos de citotoxicidade e encapsulação deste composto serão continuados posteriormente.

7 *Considerações Finais e Perspectivas Futuras*

O trabalho foi realizado no sentido de obter PQs de cádmio (CdS, CdSe e CdTe), que apresentem energias de absorção e emissão na região do visível ou mais próximas do espectro de infravermelho, regiões de maior interesse para aplicação em fotoquimioterapia. Procuramos obter os compostos por diversas rotas sintéticas obtendo-se êxito somente através da síntese em solução aquosa do CdTe, utilizando borohidreto de sódio como redutor do Te. O PQ obtido foi passivado com ácido mercaptopropiônico e suas propriedades físico-químicas, morfológicas e sua interação com um complexo rutênio-nitrosilo (*cis*-[RuNO(4-ampy)(bpy)₂](PF₆)₃) foram estudadas. O PQ CdTe-MPA apresentou máximos de absorção e emissão na região do visível, respectivamente em 503 e 544 nm, o que é de interesse para aplicação em fototerapias e o tamanho médio das partículas foi de 2,5 nm, o que é importante para as suas propriedades ópticas.

Os complexos rutênio-nitrosilos também foram sintetizados por metodologia já estabelecida e caracterizados, demonstrando sua capacidade de liberar NO tanto por processos redutimétricos como fotoquímicos. Estudos por espectrofluorimetria possibilitaram a verificação da existência de interação entre o PQ e o complexo por simples mistura de ambos em solução aquosa resultando no gráfico não linear de Stern-Volmer. Pelos estudos fotofísicos verificou-se que a interação entre as espécies pode ocorrer por diferentes perfis de supressão, processos estático e/ou dinâmico associado à formação de agregado quando em alta concentração de supressor. Essa interação é dependente da concentração e do tempo de interação. Os dados obtidos corroboram que o PQ540 interage com moléculas de RuNO sendo observado que sob irradiação na região do visível, 532 nm, ocorre o processo de liberação da molécula de NO. Visto que não há sobreposição entre o espectro de absorção do complexo de rutênio e o espectro de emissão do PQ, o processo de transferência de energia mostra-se desfavorável. Portanto, atribui-se tal resultado ao processo de

transferência eletrônica intermolecular fotoinduzida direta do PQ para o complexo, com consequente redução do NO^+ para o NO^0 e liberação do mesmo. Outro fato que confirma essa proposta é a utilização do PQ600 com o mesmo complexo nitrosilo, excitando o sistema no comprimento de onda de 560 nm, resultando no aumento em número de mols de NO liberado após a adição do PQ. A irradiação do PQ, em 532 nm, também promoveu a produção de ânion superóxido, porém em quantidades não significativas. Dessa forma, o mecanismo predominante na redução do NO^+ é o de transferência eletrônica direta. PQs se mostraram estáveis em meio fisiológico, sendo usados como marcadores celulares de rápida permeação devido ao pequeno tamanho; também mostraram-se bons indicadores de corrida em eletroforese. Testes em células revelaram que os PQs, quando não irradiados, não são tóxicos na concentração nanomolar e sob irradiação apresentaram citotoxicidade parcial. Não foi realizado estudo de citotoxicidade do PQ600 pois os comprimentos de onda de excitação utilizados limitaram-se nas opções de LEDs disponíveis. Estudos de citotoxicidade com outras linhagens celulares estão sendo desenvolvidos, visto que a resposta celular frente a ação citotóxica do NO é dependente do tipo celular.

Referências Bibliográficas

- [1] FELDMAN, P.; GRIFFITH, O.; STUEHR, D. The surprising life of nitric oxide. *C & EN*, v. 20, p. 26–33, 1993.
- [2] FUKUTO, J. et al. Nitrosyl (HNO): Chemistry, biochemistry and pharmacology. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, p. 335–355, 2005.
- [3] IGNARRO, L. *Nitric Oxide: Biology and Photobiology*. 1. ed. San Diego, California, USA: Academic Press, 2000.
- [4] GREEN, L. et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 78, p. 7764–8, 1981.
- [5] CALS-GRIERSON, M.; ORMEDOD, A. Nitric oxide function in the skin nitric oxide. *Biol. Chem.*, v. 10, p. 179–193, 2004.
- [6] GUEDES, P. et al. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ as a possible therapeutic approach for chagas disease. *Br. J. Pharmacol.*, v. 160, p. 270–282, 2010.
- [7] MARANHO, D. et al. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from znpcl liposome vehicle associated with nitrosyl ruthenium complex. synergistic effects in photodynamic therapy application. *J. Photochem. Photobiol.*, v. 85, n. 3, p. 705 – 713, 2009.
- [8] STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, v. 258, p. 1898 – 1902, 1992.
- [9] WINK, D. A. et al. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol.*, v. 268, p. 12–31, 1996.
- [10] FRICKER, S. P. et al. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers : a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases. *Br. J. Pharmacol.*, v. 122, n. 7, p. 1441–9, 1997.

- [11] MARMION, C.; CAMERON, B.; SP, M. C. F. Ruthenium as an effective nitric oxide scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 4, p. 1585–603, 2004.
- [12] WINK, D.; RIDNOUR, L.; HUSSAIN, H. The reemergence of nitric oxide and cancer. nitric oxide. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 65–67, 2008.
- [13] OTSUKI, J.; T., A.; K., A. Molecular switches for electron and energy transfer processes based on metal complexes. *Coord. Chem. Rev.*, v. 252, p. 32–56, 2008.
- [14] RICHTER-ADDIO, G.; LEGZDINS, P. *Metal nitrosyls*. 1. ed. EUA: Oxford University Press, 1992.
- [15] FORD, P. C. et al. Photochemistry os metal nitrosyl complexes. delivery of nitric oxide to biological targets. *Coord.Chem. Rev.*, v. 171, p. 185–202, 1998.
- [16] TOGNIOLO, V.; SILVA, R.; TEDESCO, A. Photo-induced nitric oxide release from chlorobis(2,2-bipyridine) nitrosylruthenium(II) in aqueous solution. *Inorg. Chim. Acta*, v. 316, p. 7–12, 2001.
- [17] SAUAIA, M. et al. Control of NO release by light irradiation from nitrosyl-ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. *Journal Inorganica Chimica Acta*, v. 355, p. 191, 2003b.
- [18] SAUAIA, M.; SILVA, R. da. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. *Trans. Met. Chem. A*, p. 254–141, 2003a.
- [19] LIMA, R. G. e. a. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by uv light irradiation. *Inorg. Chim. Acta*, v. 358, p. 2643–2650, 2005.
- [20] THOMPSON, K.; ORVIG, C. Boon and bane of metal íons in medicine. *Science*, v. 300, p. 936–939, 2003.
- [21] AIROLDI, C. Química inorgânica ou química da vida. *Química Nova*, v. 17, 1994.
- [22] BERALDO, H. d. O. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. *Inorg. Chem. Commun.*, v. 6, p. 4–6, 2005.

- [23] STOCHEL, G. et al. *Bioinorganic Photochemistry*. Singapore: Willey-Blackwell, 2009. 398 p.
- [24] SHRIVER, D.; ATKINS, P. *Química Inorgânica*. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- [25] ALLARDYCE, C.; DYSON, P. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platinum Met. Rev.*, v. 45, p. 62–9, 2001.
- [26] BOUMA, M. et al. A kinetic study of the chemical stability of the antitumestic ruthenium complex nami-a. *Int. J. Pharm.*, v. 248, p. 239–246, 2002.
- [27] FORD, P.; LAVERMAN, L. Reaction mechanism relevant to the formation of iron and ruthenium nitric oxide complexes. *Coord. Chem. Rev.*, v. 249, p. 391–403, 2005.
- [28] LIMA, R. G. e. a. Influence of ancillary ligand l in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{TPY})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorg. Chim. Acta*, v. 359, p. 2543–2549, 2006.
- [29] RODRIGUES, G.; CICILLINI S.A.AND DA SILVA, R.; BENDHACK, L. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. *Nitric Oxide*, v. 25, p. 331–337, 2011.
- [30] OLIVEIRA, F. et al. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: Synthesis, characterization and photochemical properties. *Inorg. Chem. Commun.*, v. 7, p. 160–164, 2004.
- [31] G.A., C. Structure, bonding and excited states of coordination complexes. *J. Chem. Edu.*, v. 60, n. 10, p. 791–96, 1983.
- [32] BALZANI, V.; CAMPAGNA, S. *Topics in current chemistry: Photochemistry and Photophysics of Coordination compounds I*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [33] MARCHESI, M. et al. Chemical mechanism of controlled nitric oxide release from $\text{trans-}[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}](\text{PF}_6)_2$ as a vasorelaxant agent. *Transition Met. Chem.*, v. 37, p. 475–479, 2012.

- [34] LEO, M. D.; FORD, P. Photoreactions of coordinated nitrite ion. reversible nitric oxide labilization from the chromium (III) complex (trans-Cr(cyclam)(ONO)₂)⁺. *Coord. Chem. Rev.*, v. 208, p. 47 – 59, 2000.
- [35] J.B., G.; MEYER, T. Nitrosyl nitrite interconversion in ruthenium complexes. *Inorg. Chem.*, v. 24, p. 2150–3, 1971.
- [36] TREININ, A.; HAYON, E. Charge-transfer spectra of halogen atoms ii water-correlation of electronic transitions energies of iodine, bromine, chorine, hydroxyl and hydrogen radicals wih their electron affinities. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 97, p. 1716–21, 1975.
- [37] PEREIRA, A. C. et al. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases no in a tissue and enzyme-dependent way. *Nitric Oxide*, v. 24, p. 191–198, 2011.
- [38] PEREIRA, A. C. et al. Nitric oxid generated by the compound rubpy promotes the vascular smooth cell membrane hyperpolarization. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 28, p. 604–610, 2013.
- [39] SARAIVA, J. et al. Nanocarriers for nitric oxide release. *J. Drug Delivery*, p. 1–16, 2011.
- [40] SAUAIA, M. et al. Nitric oxide production by visible light irradiation of aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. *J. Inorg. Chim. Acta*, v. 9946-9951, p. 44, 2005.
- [41] MARCHESI, M. S. P. et al. Evaluation of nitrosyl ruthenium complexes entrapped in an oil-in-water emulsion as vasodilator agents. *The Open Inorganic Chemistry Journal*, v. 2, p. 121–125, 2008.
- [42] CICILLINI, S. et al. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. *Polyhedron*, v. 28, p. 2766–2770, 2009.
- [43] CARNEIRO, Z. A. et al. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex - a system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. *J. Inorg. Biochem.*, v. 105, n. 8, p. 1035–1043, 2011.

- [44] LACKOWITZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. ed. [S.l.]: Plenum Press, 2006.
- [45] SIMAS, E. *Síntese, caracterização e estudo das propriedades fotofísicas de um copolímero derivado de quinolina*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Paraná, Engenharia e Ciências dos Materiais, Curso de Pos-Graduação em Engenharia, Curitiba, 2005.
- [46] WINNISCHOFER H. AND ARAUJO, M. D.; JUNIOR, L. D.; NOVO, J. B. . M. Simulações monte carlo no ensino de luminescência e cinética de decaimento de estado excitados. *Química Nova*, v. 3, p. 225–228, 2010.
- [47] MEDINTZ, I.; MATTOUSSI, H.; CLAPP, A. Potential clinical applications of quantum dot. *Int. J. Nanomedicine*, v. 3, p. 151–67, 2008.
- [48] MEDINTZ, I. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.*, v. 4, n. 6, p. 435–446, 2005.
- [49] MICHALET, X. et al. Diagnostics quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostic. *Science*, v. 307, p. 538, 2005.
- [50] MURPHY, C. J.; COFFER, J. L. Quantum dots: A primer. *Applied spectroscopy*, v. 56, p. 15–27, 2002.
- [51] KISCH, H.; MACYK, W. Visible - light photocatalysis by modified titania. *ChemPhysChem.*, v. 3, n. 5, p. 399–400, 2002.
- [52] SILVA, F. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. *Quim. Nova*, v. 33, p. 1933–1939, 2010.
- [53] MA, Y.; QI, L.; MA J.M. AND CHENG, H. Hierarchical, star-shaped pbs crystals formed by a simple solution route. *Cryst. Growth. Des.*, v. 4, p. 351–354, 2004.
- [54] MURRAY, C.; NORRIS, D.; BAWENDI, M. Synthesis and characterization of nearly monodisperse cde (e = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 115, p. 8706–8715, 1993.

- [55] LARSON, D. R. et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, v. 300, p. 1434–1436, 2003.
- [56] QUILAN, F. et al. Reverse micelle synthesis and characterization of znse nanoparticles. *Langmuir*, v. 16, p. 4049, 2000.
- [57] BORCHERT, H. et al. Dynamic distribution of growth rates within the ensembles of colloidal ii-vi and iii-v semiconductor nanocrystals as a factor. *J. Phys. Chem. B*, v. 36, p. 9662–9668, 2003.
- [58] ROY, R. et al. Interactive threats of nanoparticles to the biological system,. *Immunol. Lett.*, v. 158, p. 79–87, 2014.
- [59] AKERMAN, M. et al. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 20, p. 12617–21, 2002.
- [60] GAO, D.; SHENG, Z.; HEYOU, H. A novel methods for the analysis of calf thymus dna based on cdte quantum dots- $\text{ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ photoinduced electron transfer system. *Microchim. Acta*, v. 168, p. 341–345, 2010.
- [61] ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as cellular probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 7, p. 55–76, 2005.
- [62] CHOI, H. S. et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, v. 25, p. 1165–1170, 2007.
- [63] GRATIERI, T. et al. Penetration of quantum dot particles through human skin. *J. Biomed. Nanotechnol.*, v. 6, p. 586–595, 2010.
- [64] HEATH, J.; DAVIS, M. Nanotechnology and cancer. *Ann Rev. Med.*, v. 59, p. 251–265, 2008.
- [65] BYRNE, J.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, p. 1615–1626, 2008.
- [66] BAO, G.; MITRAGOTRI, S.; TONG, S. Multi-functional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 15, p. 253–82, 2013.

- [67] BURKS, P. et al. Nitric oxide releasing materials triggered by near-infrared excitation through tissue filters. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 135, p. 18145–18152, 2013.
- [68] HEROLD, S.; KOPPENOL, W. Peroxynitritometal complexes. *Coord. Chem. Rev.*, v. 249, p. 499–506, 2005.
- [69] DWYER, F.; GOODWIN, H.; GYARFAS, E. Mono and bis (2,2-bipyridine) and (1, 10-phenantroline) chelates of ruthenium and osmium. *Aust. J. Chem.*, v. 16, p. 42, 1963.
- [70] GODWIN, J.; MEYER, T. The preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2,2- bipyridine and 1, 10 - phenanthroline. *Inorg. Chem.*, v. 10, p. 471–4, 1971.
- [71] ERSHOV, A.; KUCHERYAVYI, P.; NIKOLSKI, A. Chemistry of ruthenium polypyridine complex: IX. nitro-nitrosyl equilibrium in $\text{cis-[Ru(2,2-bpy)}_2\text{(L)NO}_2\text{]}^+$ complexes. *Russ. J. Gen. Chem.*, v. 74, p. 651–654, 2004.
- [72] WALKER, D.; TAUBE, H. N - macrocyclic complexes of ruthenium (II) and ruthenium (III). *Inorg. Chem.*, v. 20, p. 2828–34, 1981.
- [73] YU, W. W. Semiconductor quantum dots: synthesis and water-solubilization for biomedical applications. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, v. 8, p. 1571–1581, 2008.
- [74] LI, L. et al. Significant enhancement of the quantum yield of cdte nanocrystal synthesized in aqueous solution phase by controlling the ph and concentration of precursor solutions. *J. Lumin.*, v. 116, p. 59–66, 2006.
- [75] MULLAUGH, K.; LUTHER, G. Spectroscopic determination of the size cadmium sulfide nanoparticles formed under environmentally relevant conditions. *J. Environ. Monit.*, v. 12, p. 890–897, 2010.
- [76] KUNDU, M.; KHOSRAVI, A.; KULKARNI, S. Synthesis and study of organically capped ultra small cluster of cadmium sulphide. *J. Mater. Sci.*, v. 32, p. 245–258, 1997.

- [77] HERRON, S.; WANG, Y.; HELLMUT, E. Synthesis and characterization of surface-capped size - quantized cds cluster. chemical control of cluster size. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 112, p. 1322–1326, 1990.
- [78] TOMASULO, M. et al. pH sensitive ligand for luminescent quantum dots. *Langmuir*, v. 22, p. 10284–10290, 2006.
- [79] LI, Y. et al. Aqueous synthesis of cdte nanocrystals: Progress and perspectives. *Chem. Commun.*, v. 47, p. 9293–9311, 2011.
- [80] ZHAI J. AND HAN, S. W. J. Non-injection one pot preparation strategy for multiple families of magic-sized cdte quantum dots with bright bandgap photoemission,. *Chem. Eng. J.*, v. 23-28, p. 215–216, 2013.
- [81] MELO, J. S. D.; BECKER, R.; MACANITA, A. Photophysical behavior of coumarins as a function of substitution and solvent: experimental evidence for the existence of a lowest lying 1 state. *J. Phys. Chem.*, v. 98, p. 6054, 1994.
- [82] YU, W.; QU, L.; GUO W. AND PENG, X. Coefficient of cdte, cdse, and cds nanocrystals. *Chem. Mater.*, v. 15, p. 2854–2860, 2003.
- [83] CULLITY, B. *Elements of X-ray Diffraction*. Redding, MA: Addison-Wesley, 1978.
- [84] BOUWER, A. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution .iupac technical report. *Pure Appl. Chem.*, v. 83, n. 12, p. 2213–2228, 2011.
- [85] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983.
- [86] COLLECTION, A. T. C. *MTT cell proliferation assay-Introductions*. ATCC. 2014. Disponível em: <<http://www.atcc.org/common/documents/pdf/30-1010k.pdf>>.

- [87] GUENGERICH, C. P.; SCHUG, K. Reaction of nitrosylpentaaminruthenium (II) with ethylamine, methylamine and hexaammineruthenium (III). *Inorg. Chem.*, v. 17, p. 1378–9, 1978.
- [88] WALSH, J. L.; BULLOCK, R. M.; MEYER, T. J. Alkyl nitrite complexes of ruthenium prepared by acid-base chemistry at the bound nitrosyl ground. *Inorg. Chem.*, v. 19, p. 865–9, 1980.
- [89] BORGES, S. S. S. et al. Ruthenium nitrosyl complexes with n-heterocyclic ligands. *Inorg. Chem.*, v. 37, p. 2670–2677, 1998.
- [90] LEVER, A. *Inorganic Electronic Spectroscopy*. 2. ed. NY: Elsevier, 1984.
- [91] VLCEK J.A.AND ZALIS, S. Modeling of charge - transfer transitions and excited states in d 6 t ransition metal complexes by dft techniques. *Coord. Chem. Rev.*, v. 251, p. 258, 2007.
- [92] FREEDMAN, D. A.; JANZEN D. E.AND MANN, K. The synthesis and characterization of potassium 2,2-bipyridinetetranitroruthenate. *Inorg. Chem.*, v. 40, n. 23, p. 6009–6016, 2001.
- [93] PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G. *Introduction to Spectroscopy. A Guide for students of Organic Chemistry*. 2. ed. Orlando, FL: Saunders College Publishing, 1996.
- [94] WANG, Y. J. C. One-pot synthesis of highly lumicescent cdte quantum dots using sodium tellurite as tellurium source in aqueous solution. *J. Chil. Chem. Soc.*, v. 57, n. 2, p. 1109–2012, 2012.
- [95] PRADHAN, N. et al. An alterantive of cdse nanocrystal emitter: pure and tunable impurities in znse nanocrystal. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 27, p. 17586–17587, 2005.
- [96] EATON, D. F. Reference material for fluorescence measurement. *Pure & Appl. Chem.*, v. 60, p. 1107–19988, 1988.

- [97] NEUMAN, D. et al. Quantum dot fluorescence quenching pathways with cr(III) complexes. photosensitized NO production from trans-Cr(cyclam)(ONO)²⁺. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 130, p. 168–175, 2008.
- [98] FANG, Z. et al. Synthesis of highly stable dihydrolipoic acid capped water-soluble cdte nanocrystals. *Nanotechnology*, v. 19, n. 23, p. 235603, 2008.
- [99] DEMAS, J. *Excited State Lifetime Measurements*. NY: Academic Press, 1893.
- [100] BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. *Nanocosmetics and nanomedicine. New approaches for Skin care*. 1. ed. s.l.: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [101] ROGACH, A. et al. Aqueous synthesis of thiol-capped cdte nanocrystals: state-of-art. *J. Phys. Chem. C*, v. 111, p. 14628–14637, 2007.
- [102] LAFERRIERE, M. et al. Non-linear effects in the quenching of fluorescent quantum dots by nitroxyl free radicals. *Chem. Commun*, v. 3, p. 257–259, 2006.
- [103] ADAMSON, A.; FLEISCHAUER, P. D. *Concepts of Inorganic Potochemistry*. s.l.: Wiley Interscience, 81. 1995 p.
- [104] OH, M. H. J. et al. Charge transfer in cdse nanocrystal complexes with an electroactive polymer. *J. Phys. Chem.*, v. 117, n. 37, p. 18870–18884, 2013.
- [105] BURKS, P.; FORD, P. Quantum dot photosensitizers. interactions with trasion metal centers. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, v. 41, p. 13030–13042, 2012.
- [106] RONCAROLI, F.; OLABE, J. A. The reactions of nitrosyl complexes with cysteine. *Inorg. Chem.*, v. 44, p. 4719 – 4727, 2005.
- [107] SHI, G. et al. Fluorescence quenching of cdse quantum dots by nitroaromatic explosives and their relative compounds. *Spectrochim. Acta A*, v. 70, p. 247–252, 2008.
- [108] MOENO, S.; IDOWU, M.; NYOKONG, T. Spontaneous charge transfer between zinc tetramethyl-tetra-2,3-pyridinoporphyrazine and cdte and zns quantum dots. *Inorg. Chim. Acta*, v. 361, p. 2950–6, 2008.

- [109] JAGADEESWARI, S.; PARAMAGURU, G.; RENGANATHAN, R. Synthesis and characterization of free base and metal porphyrins and their interaction with cdte qds. *J. Photochem. Photobiol. A*, v. 276, p. 104–112, 2013.
- [110] SILVA, R. S. et al. Generation of reactive oxygen species by photolysis of the ruthenium(II). *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 6, p. 515–8, 2007.
- [111] DANEK, M.; JENSEN K. F. AND MURRAY, C. B.; BAWENDI, M. G. Luminescent thin-film CdSe/ZnSe quantum dot composites using cdse quantum dots passivated with an overlayer of znse. *Chem. Mater.*, v. 8, p. 173, 1996.
- [112] STANBURY, D. Reductions potentials involving inorganic free radicals in aqueous solution. *Adv. Inorg. Chem.*, v. 69, p. 138, 1989.
- [113] TANSAKUL, C. et al. Distance - dependent fluorescence quenching and binding of cdse quantum dots by functionalized nitroxide radicals. *J. Phys. Chem. C*, v. 114, n. 17, p. 7793–7805, 2010.
- [114] JHONSI, M. et al. Photoinduced interaction of mpa-capped cdte quantum dots with denatured bovine serum albumin. *Nanosci. Nanotechnol. lett.*, v. 3, p. 125–130, 2011.
- [115] NOGUEIRA, R.; JARDIM, W. A fotocatalise hetecatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. *Química Nova*, v. 21, p. 69–72, 1998.

Anexos

Estrutura Química

Estrutura Química dos Complexos Nitrosilos de Rutênio

Figura 7.1: Representação da estrutura do $cis-[Ru(NO)(4-ampy)(bpy)_2]^3+$

Figura 7.2: Representação da estrutura do $trans-[Ru(NO)Cl([15]aneN_4)]Cl_2$

Estrutura Química dos Ligantes Usados na Síntese dos PQs e Outros Compostos

Figura 7.3: Representação da estrutura do Ácido Tioglicólico

Figura 7.4: *Representação da estrutura do Ácido Mercaptopropiônico*

Figura 7.5: *Representação da estrutura do TOPO*

Figura 7.6: *Representação da estrutura do TEMPO*