Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Nitrosilo complexos de rutênio(II) como captoreadores de radicais de interesse biológico

Gustavo Metzker

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

São Carlos
2009

Aos meus pais, Antonio e Carmen
e ao meu irmão Fabrício, pelo
apoio constante e por acreditarem
em mim. Sem vocês, eu não teria
chegado até aqui.

A minha namorada Paula, por me
“aguentar” durante esses dois anos
e pelo carinho.

**De cada coisa em particular, pergunte:
O que é em si mesma?
Qual a sua natureza?**

**Marcus Aurelius Antoninus Augustus
(121 d.C – 180 d.C)**

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Douglas Wagner Franco pela orientação, amizade e pelos ensinamentos, não só no tocante da química.

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pelas discussões, importante ajuda nos experimentos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Benedito dos Santos Lima Neto pelas discussões e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Avaca e ao Msc. Gustavo Stoppa Garbellini pela disponibilidade na realização dos experimentos voltamétricos utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.

Aos colegas do Laboratório de Química Inorgânica e Analítica e do Laboratório da Química da Aguardente do IQSC-USP pela harmoniosa convivência.

A “velha guarda” da turma de bacharelado do IQSC-USP (2003).

Aos amigos Raphael e Pietro pelas discussões e por compartilharem os momentos bons e difíceis durante esses dois anos de mestrado.

A minha tia Aparecida pelo incentivo.

Aos amigos Gisélia e Luiz Fernando pelos bons momentos vividos e pela amizade

A Veroneide por se mostrar sempre pronta a ajudar.

Aos funcionários da biblioteca do IQSC, principalmente a Bernadete e Eliana por se mostrarem sempre prontas a ajudar.

Ao Instituto de Química de São Carlos e a Universidade de São Paulo pela oportunidade.

A FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo 06/05877-4).

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Abreviaturas	iv
Estruturas Químicas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
I - Introdução	1
1.1 - Radicais e sua participação em processos fisiológicos	1
1.2 – Mecanismos de neutralização de radicais	3
1.3 – Óxido Nítrico	4
1.3.1 - Óxido nítrico e fisiologia humana	4
1.3.2 - Óxido nítrico e o seu duplo papel no estresse oxidativo	5
1.3.3 - Óxido nítrico como antioxidante: reações e implicações	6
1.4 - Metais de transição: aplicações como fármacos e transportadores de óxido nítrico	8
II - Objetivos e Justificativa	11
III - Metodologia	12
3.1 – Instrumentação	12
3.1.1 - Espectrofotometria de UV-vis	12
3.1.2 - Medidas de eletrodo seletivo de NO	12
3.1.3 – Infravermelho (IV)	12
3.1.4 – Voltametria cíclica	13
3.1.5 - Medidas de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (RPE)	13
3.1.5.1 - Medidas de RPE a temperatura ambiente	13
3.1.5.2 - Medidas de RPE a baixa temperatura	14
3.1.6 – Experimentos utilizando fotólise por pulso de LASER	15
3.2 - Síntese e caracterização dos nitrosilo complexos de rutênio(II)	16
3.2.1 – Reagentes	16
3.2.2 – Caracterização dos compostos	17
3.2.3 - Via de síntese dos complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)](BF ₄) ₃ , onde L = isn, 4-pic, nic, py, imN	17

3.2.4 - Via de síntese complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (P(OEt) ₃)](PF ₆) ₃	18
3.2.5 - Síntese complexo [Ru(NO)(Hedta)]	18
3.2.6 - Síntese complexo <i>trans</i> -[Ru(H ₂ O)(NH ₃) ₄ (SO ₂)](CF ₃ SO ₃) ₂	19
3.3 - Reações envolvendo o radical DPPH [•]	19
3.3.1 - Reagentes: procedência e pureza	19
3.3.2 - Preparo das soluções	20
3.4 - Reações envolvendo o radical hidroxila	20
3.4.1 - Reagentes: procedência e pureza	20
3.4.2 - Preparação das soluções e protocolo de medida	21
3.5 - Medidas envolvendo radical superóxido (O ₂ ^{•-})	23
3.5.1 - Geração do radical O ₂ ^{•-} pela via fotoquímica	23
3.5.2 - Geração do radical O ₂ ^{•-} pela via enzimática	24
3.5.3 - Protocolo de medida	25
3.5.4 - Detecção e quantificação do radical O ₂ ^{•-}	26
3.6 - Medidas de cinética por competição	27
IV – Resultados e Discussão	29
4.1 – Comportamento voltamétrico dos nitrosilo complexos de rutênio(II)	29
4.1.1 – Aspectos Gerais	29
4.1.2 – Medidas voltamétricas utilizando eletrodos de diamante dopado com boro para os complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺ (L = nic, isn e P(OEt) ₃) e [Ru(NO)(Hedta)]	31
4.2 – Experimentos envolvendo radical DPPH [•]	36
4.2.1 – Aspectos Gerais	36
4.2.2 – Reação entre os aquo complexos e o radical DPPH [•]	40
4.3 – Experimentos envolvendo radical hidroxila (OH [•])	42
4.3.1 – Captação do radical hidroxila pelos nitrosilo complexos de rutênio	42
4.3.2 – Aspectos da reação entre o radical OH [•] e os nitrosilo complexos utilizando RPE	47
4.3.3 – Monitoramento da reação entre o radical OH [•] e os nitrosilo complexos de Ru(II) utilizando eletrodo seletivo a NO	51
4.3.4 – Considerações sobre a reação entre os nitrosilo complexos e o radical OH [•]	51

4.4 – Reações entre os nitrosilo complexos e o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	52
4.4.1 – Captação do radical $O_2^{\bullet-}$ pelos nitrosilo complexos	52
4.4.2 – Estimativa da constante de velocidade entre o radical superóxido e os nitrosilo complexos de rutênio(II)	56
4.4.3 – Liberação de NO^0 após a reação entre o radical $O_2^{\bullet-}$ e os nitrosilo complexos	59
4.4.4 – Sobre a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$)	62
4.4.5 – Considerações entre as reações entre o radical $O_2^{\bullet-}$ e os nitrosilo complexos de rutênio(II).	64
V- Considerações Finais	65
VI – Referências Bibliográficas	67
VII - Apêndices	74

Lista de Figuras

Figura 1	- Formação de radical livre superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de peróxido de hidrogênio na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.	3
Figura 2	- Participação do NO como antioxidante nas reações envolvendo espécies reativas de oxigênio e o íon Fe(II/III).	6
Figura 3	- Rota de síntese do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)](BF ₄) ₃ .	17
Figura 4	- Rota de síntese do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (P(OEt) ₃)](PF ₆) ₃ .	18
Figura 5	- Rota de síntese do complexo [Ru(NO)(Hedta)] .	18
Figura 6	- Rota de síntese do complexo <i>trans</i> -[Ru(H ₂ O)(NH ₃) ₄ (SO ₂)](CF ₃ SO ₃) ₂ .	19
Figura 7	- Espectro de RPE do aduto DMPO-OH resultante da reação entre o radical hidroxila (OH [•]) e o captador de spin DMPO.	23
Figura 8	- Espectro de UV-vis típico para detecção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), utilizando como sonda citocromo c.	27
Figura 9	- Reação de competição entre o citocromo c e os nitrosilo complexos.	27
Figura 10	- Voltamograma cíclico do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺ . pH = 3,0; μ = 0,1 mol L ⁻¹ ; T = 25°C; V = 100 mV s ⁻¹ ; eletrodo de trabalho carbono vítreo.	30
Figura 11	- Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de trabalho EDDB. complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (nic)] ³⁺ . T = 25 °C; pH = 3,0; μ = 0,1 mol L ⁻¹ CF ₃ COOH/CF ₃ COONa; V = 100 mV s ⁻¹ .	32
Figura 12	- Formação do radical OH [•] pela adsorção da água na superfície de eletrodos submetidos a elevados potenciais anódicos.	33
Figura 13	- Voltamograma cíclico utilizando platina como eletrodo de trabalho Pt para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (nic)] ³⁺ ; T = 25°C; pH = 3,0; μ = 0,1 mol L ⁻¹ CF ₃ COOH/CF ₃ COONa; V = 100 mV s ⁻¹ .	34
Figura 14	- Principais mecanismos de desativação do radical DPPH [•] .	37
Figura 15	- Espectro de UV-vis da reação entre o radical DPPH [•] e o complexo [Ru(NO)(Hedta)]. T = 25°C; pH = 3,0; 30 minutos de reação.	38
Figura 16	- Variação do espectro de UV-vis da reação entre o radical DPPH [•] e o complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (P(OEt) ₃)] ³⁺ . T = 25°C; pH = 3,0; 30 minutos de reação. 445 nm: ponto isosbético.	39
Figura 17	- Espectro de UV-vis da reação entre o complexo <i>trans</i> -[Ru(H ₂ O)(NH ₃) ₄ (P(OEt) ₃)] ²⁺ e o radical DPPH [•] . T = 25°C; pH = 3,0.	41

- Figura 18** - Espectro de RPE da reação entre o complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(H_2O)(P(OEt)_3)]^{2+}$ e o radical DPPH $\cdot$ gerando como produto $trans-[Ru^{III}(NH_3)_4(H_2O)(P(OEt)_3)]^{3+}$. 42
- Figura 19** - Espectro de RPE da reação do complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(nic)]^{3+}$ e do captador de spin DMPO pelo radical hidroxila. T = 25°C. CF₃COOH; pH = 5,0. 44
- Figura 20** - Espectros de RPE em banda-X digitalizados para a reação entre o radical OH $\cdot$ e os complexos $trans-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]Cl_2$ (A) e $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(isn)]^{3+}$ (B). T = 115K, pH = 3,0; 35% etilenoglicol (v/v), 32 scans. 48
- Figura 21** - Espectros de RPE banda-X digitalizados para a reação entre o radical OH $\cdot$ e os complexos $trans-[Ru(NO)CiclamCl]Cl_2$ (A) e $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(Isn)]^{3+}$ (B). T = 10K, pH = 3,0; 35% etilenoglicol (v/v), 8 scans. 49
- Figura 22** - Geração do radical O₂ $\cdot^-$ e a sequência de reações de competição entre os nitrosilo complexos e a proteína citocromo c pelo radical O₂ $\cdot^-$. 53
- Figura 23** - Espectro de UV-vis da reação de competição entre o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(imN)]^{3+}$ e a proteína citocromo c pelo radical O₂ $\cdot^-$. T = 25°C; pH = 5,0. 53
- Figura 24** - Gráfico da porcentagem de captação do radical superóxido versus o potencial de redução NO⁺/NO⁰. 55
- Figura 25** - Gráfico da captação do radical O₂ $\cdot^-$ versus a concentração do complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OEt)_3)]^{3+}$. k₂ é o valor da constante de velocidade obtida utilizando a Equação 1. 58
- Figura 26** - Cronoamperometria utilizando eletrodo seletivo à NO⁰ para monitoramento da reação entre o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(isn)]^{3+}$ e o radical O₂ $\cdot^-$. Gráfico menor: mesma reação com o complexo [Ru(NO)Hedta] (a): adição da enzima xantina oxidase. C_{Ru} = 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; pH = 7,2; T = 25°C. 61
- Figura 27** - Reação entre o citocromo c e o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(imN)]^{3+}$ após a reação com O₂ $\cdot^-$. T = 25 °C; HTFA; pH = 5,0. 62

Lista de Tabelas

Tabela 1	- Parâmetros utilizados para medidas de RPE a temperatura ambiente	14
Tabela 2	- Parâmetros utilizados nos experimentos de RPE a baixa temperatura	15
Tabela 3	- Protocolo utilizado para a reação com radical hidroxila	22
Tabela 4	- Protocolo utilizado para geração fotoquímica do radical superóxido	25
Tabela 5	- Protocolo utilizado para geração enzimática do radical superóxido	26
Tabela 6	- Potenciais de oxidação Ru(II)/Ru(III) para os complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺ e [Ru(NO)(Hedta)]	35
Tabela 7	- Captação do radical OH [•] pelos complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺ e [Ru(NO)(Hedta)]	45
Tabela 8	- Eficiência de captação do radical O ₂ ^{•-} (%) * frente os complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺ e [Ru(NO)Hedta]	54

Abreviaturas

4-pic	-	4-picolina
A_N	-	Constante de acoplamento hiperfina para o nitrogênio (RPE)
cGMP	-	Cyclic Guanosine Monophosphate
ciclan	-	1,4,8,11 - tetraazociclotetradecano
cit c	-	citocromo c
DMPO	-	5,5-dimetil-1-pirrolidina-N-óxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DPPH [•]	-	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTPA	-	ácido dietileno-triamino-pentaacético
$E_{1/2}$	-	Potencial de meia-onda
ECS	-	Eletrodo de calomelano saturado
EDDB	-	Eletrodo de diamante dopado com boro
E_{pa}	-	Potencial de pico anódico
Hedta	-	Ácido etilenodiaminotetraacético
imN	-	Imidazol
isn	-	Isonicotinamida
L-hist	-	L-histidina
Nic	-	Nicotinamida
NO	-	Óxido Nítrico
NO^-	-	Ânion nitroxila
NO^+	-	Cátion nitrosil
NOS	-	Nitric oxide synthase
$P(OEt)_3$	-	Trietilfosfíto
Pic	-	Picolina
Py	-	Piridina
Pz	-	Pirazina
RNOS	-	Reactive Nitrogen and Oxygen Species
ROS	-	Reactive oxygen species
RPE	-	Ressonância Paramagnética de eletrons
S	-	Spin eletrônico
SOD	-	Superóxido dismutase
Tween-20	-	polioxietileno – monolaureto de sorbitol
δ^1H	-	Deslocamento químico para o próton

Estruturas Químicas

trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺

Trietilfosfito P(OEt)₃

Imidazol (ImN)

Piridina (py)

4-Picolina (pic)

Hedta

Nicotinamida (nic)

Isonicotinamida (isn)

Resumo

Os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)](X)₃ (1), [Ru(NO)(Hedta)] (2) e seus precursores sintéticos *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(L)](X)₂ (3), *trans*-[Ru(SO₄)(NH₃)₄(L)](X) (4), onde L = isn, nic, imN, 4-pic, py, P(OEt) e X = PF₆⁻ e BF₄⁻, foram testados como captadores dos radicais livres DPPH[•], OH[•] e O₂^{•-} em meio aquoso. O potencial de oxidação do centro metálico nos complexos (1) foram estimados utilizando eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho, estando situados em meio aquoso acima de 2,0 V *vs.* ECS (C_{H+} = 1,0 x 10⁻³, μ = 0,1 mol L⁻¹). Os complexos (1) e (2) mostraram-se incapazes de reagir com o radical DPPH[•], exceto o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(P(OEt)₃)]³⁺, que reagiu apenas em grande excesso (50 vezes) em relação ao radical DPPH[•]. Os complexos (3) reagiram quando em excesso ou em proporção estequiométrica. O mecanismo pelo qual esta reação ocorre é predominantemente o de transferência de elétrons. O radical OH[•] foi captado pelos complexos (1), sendo provavelmente o mecanismo predominante o de transferência de elétrons pela oxidação do centro metálico [Ru(NO)]³⁺ a [Ru(NO)]⁴⁺, compatível com o potencial de oxidação do radical OH[•] (acima de 2,8 V *vs.* ECS) reportado na literatura para este radical. As constantes de velocidade específica para estas reações foram estimadas como estando no intervalo de 10⁸ a 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹. Não foi observada reação entre o radical OH[•] e os complexos (4). Os complexos (1) e (2) captam o radical O₂^{•-} pela redução do ligante NO⁺ com constantes de velocidade específicas no intervalo de 2,0 ± 1,0 x 10⁴ a 4,2 ± 1,0 x 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, em medidas efetuadas via cinética de competição com citocromo c. Após a redução, a liberação de NO foi acompanhada via eletrodo seletivo a NO e espectrofotometricamente pela reação do NO com o citocromo c. Nas condições experimentais utilizadas, não se observou a formação do íon peroxinitrito (ONOO⁻). Os complexos (3) e (4) não reagiram com o radical O₂^{•-}.

Abstract

The *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)](X)₃ (1), [Ru(NO)(Hedta)] (2) complexes and their synthetic precursors *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(L)](X)₂ (3), *trans*-[Ru(SO₄)(NH₃)₄(L)](X) (4), with L = isn, nic, imN, 4-pic, py, P(OEt) e X = PF₆⁻ and BF₄⁻, were tested as scavengers of the radicals DPPH[•], OH[•] e O₂^{•-} in aqueous media. The redox potential of the metal center in the complexes (1) were obtained a using boron doped diamond electrode as working electrode. The redox potentials values for ruthenium nitrosyl complexes were higher than +2,0 V *vs.* SCE. The complexes (1) and (2) were unable to reduce the radical DPPH[•], except the *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(P(OEt)₃)]³⁺ complex ion. The complexes (3) react with DPPH[•] in stoichiometric proportion. Electron transfer from the oxidation of the ruthenium(II) center seems to be the reaction pathway. The OH[•] radical reacts with ruthenium nitrosyls complexes, predominantly oxidizing the metal center, and yielding the fragment [Ru(NO)]⁴⁺. This reaction is exothermic since the redox potential of the OH[•] is around +2.8 V *vs.* SCE. From competition kinetics the rate constant of this reaction were estimated in the range of 10⁸ to 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹. Since the reaction between OH[•] radical and the complexes (4) was not observed, the hydrogen atom transfer mechanism for the scavenger of OH[•] by the nitrosyl complexes can be ruled out. The complexes (1) and (2) scavenge the radical O₂^{•-} by the reduction of the coordinated nitrosyl with specific rate constants ranging from 2.0 ± 1,0 x 10⁴ to 4.2 ± 1,0 x 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ as probed by competitive kinetics using cytochrome c. After reduction, nitric oxide dissociation was confirmed amperometrically using a selective NO electrode or spectrophotometrically using cytochrome c as probe. Reduction of the complexes (3) by superoxide ion was not observed and may suggest the coordinated nitrosonium as the reaction site for reduction.

I – Introdução

1.1 – Radicais e sua participação em processos fisiológicos

Radicaís, por definição, são espécies que possuem um ou mais elétrons desemparelhados ($S \neq 0$)^[1]. A maior reatividade destas espécies faz com que estas sejam de extrema importância em meio biológico, estando envolvidas em processos fisiológicos e patofisiológicos^[2,3].

Já no início da década de 60, Gershman e Gilbert³ propuseram que a maioria dos danos causados em células do organismo humano seria fruto da reação destas com radicaís, principalmente moléculas envolvendo oxigênio molecular^[3,4]. Tais espécies seriam oriundas das reações nas quais o oxigênio molecular participa no processo respiratório celular principalmente na cadeia transportadora de elétrons. Dentre estas entidades químicas designadas espécies reativas do oxigênio^[4,6], ROS (Reactive Oxygen Species), podemos citar o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Estes radicaís por sua vez estão envolvidas também na formação de radicaís lipídicos^[7] ($L^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$ e $LOO^{\bullet}$, onde L = cadeias de hidrocarbonetos saturadas e/ou insaturadas).

Radicaís que apresentam átomos de nitrogênio e oxigênio em sua composição são classificadas como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, RNOS (Reactive Nitrogen and Oxygen Species)^[8]. Dentre elas, podem-se destacar o peroxinitrito ($ONOO^-$)^[8] e o radical óxido nítrico (NO)^[8].

O radical hidroxila é extremamente reativo, com elevado potencial de oxidação ($E^0 \approx +2,8V$)^[9,10]. Formado em meio fisiológico pela reação de desproporcionamento do peróxido de hidrogênio na presença de traços de íons de metais de transição, principalmente

íons de ferro e cobre no metabolismo aeróbico celular via reação de Fenton^[11] com constante de velocidade específica $k_f = 53.0 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[12]

Reação 1 – Reação de formação do radical hidroxila (reação de Fenton)

Koppenol e colaboradores^[9] utilizando soluções modelo que mimetizavam o plasma sanguíneo demonstraram que o radical hidroxila pode ser gerado mesmo em sistemas onde o íon de ferro encontra-se quelado, como na presença de citrato e albumina, induzindo a formação de radical hidroxila.

O radical superóxido é um ânion radical formado pela adição de um elétron ao orbital π^* do oxigênio molecular^[13]. Pode agir como redutor ou oxidante, dependendo do pH e da composição do meio em que foi formado (reações 2 e 3)^[13]. Seu potencial na oxidação (reação 2) é de -0,60 V vs. ECS.

Reações 2 e 3 – Íon superóxido agindo como agente redutor ou oxidante^[13]

O radical superóxido pode ser gerado no metabolismo aeróbico celular na cadeia transportadora de elétrons^[6,14] e também em situações de inflamação e isquemia^[15] sendo neutralizado por enzimas específicas como a superóxido dismutase (SOD). A Figura 1 ilustra a formação do radical superóxido durante a cadeia transportadora de elétrons da respiração aeróbica celular.

Figura 1 – Formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e de peróxido de hidrogênio na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial^[14].

Os radicais $O_2^{\bullet -}$ e $OH^{\bullet}$ podem interagir com uma vasta gama de biomoléculas, formando outros radicais ou danificando estruturas importantes no nível celular^[2,3,4].

Foram intensamente investigadas as funções que estas espécies teriam na patofisiologia humana^[3]. Descobriu-se que estas estão envolvidas numa série de doenças, dentre elas neurodegenerativas^[16,17] (Mal de Alzheimer e de Parkinson), arteriosclerose^[18] e câncer^[19]. Também ficou evidente que estes radicais estão envolvidos em processos de lise celular^[20], danos ao DNA^[20] e na oxidação de lipídeos^[7] sendo, portanto um dos fatores causadores de uma gama tão grande de doenças. Em adição, os radicais são responsabilizados como uma das principais causas que levam ao envelhecimento^[22].

1.2 – Mecanismos de neutralização de radicais

Antioxidante pode ser definido como sendo uma substância que previne a formação de espécies oxidantes ou captam oxidantes produzidos sob condição de estresse oxidativo^[4,22].

Existem vários mecanismos fisiológicos para a desativação de radicais. Estes podem ser endógenos, utilizando enzimas específicas (superóxido-dismutase) e/ou proteínas e aminoácidos (cisteína, glutatona)^[4,23] e exógenos, consequência da ingestão de moléculas

com capacidade antioxidante (ácido ascórbico, polifenóis derivados de alimentos)^[15,23]. Porém, muitas vezes estes mecanismos não são capazes de conduzir a neutralização de todos os radicais formados, e como consequência se observa um excesso de radicais em determinadas situações. A este processo se dá o nome de estresse oxidativo^[22] sendo considerado responsável pela maioria das doenças descritas anteriormente. Em situações de inflamação, o processo de estresse oxidativo é muito pronunciado, tornando o ambiente acometido bastante reativo e, portanto favorecendo a formação de radicais.

1.3 – Óxido nítrico

1.3.1 – Óxido nítrico e fisiologia humana

Moléculas que possuam habilidade de agirem como antioxidante em meio fisiológico têm merecido muita atenção nas últimas décadas^[24]. Dentre elas, podemos destacar o óxido nítrico (NO). As funções fisiológicas do NO foram descritas pela primeira vez na década de 80, por Furchgott, Ignarro e Murad (ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia de 1998), que relacionaram o óxido nítrico com o processo de vasodilatação^[25]. Atualmente, sabe-se que o óxido nítrico é uma molécula chave no processo fisiológico humano, sendo responsável por várias funções dentre as quais: neurotransmissão^[25], vasodilatação e reperfusão^[26], atividade antimicrobiana^[27,28], agente do sistema de defesa e de sinalização celular^[24]. Recentemente o NO foi também relacionado como um antioxidante endógeno, devido sua elevada reatividade com outros radicais^[24,29,30]. Torna-se então evidente a relevância de compostos que sejam doadores de NO e que permitam a liberação controlada desta molécula^[31,32].

1.3.2 – Óxido nítrico e o seu duplo papel no estresse oxidativo

Dentre as possíveis moléculas que podem agir como antioxidante está o óxido nítrico (NO)^[29]. A produção endógena de NO pelo sistema fisiológico humano esta relacionada com três tipos de enzimas que o sintetizam. As NO sintases são classificadas como: nNOS (neural Nitric Oxide Synthase), iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) and eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase)^[2,33].

Este radical diatômico tem papel central na regulação do mecanismo de vasodilatação endotelial e em todas as funções onde a enzima cGMP (cyclic Guanosine Monophosphate) está envolvida^[33]. Exogenamente, os níveis de NO podem ser supridos ou controlados via moléculas captadoras ou transportadoras de NO. Por estar presente em quantidades que variam de 1 nM a 100 µM no organismo humano, o NO pode desenvolver diversas funções. Além disso, por se tratar de um radical, o NO pode reagir rapidamente com outras espécies radicalares^[34].

Desta forma, a investigação de suas reações com radicais e suas potencialidades terapêuticas têm merecido muita atenção^[35]. Recentemente, foi demonstrado que o controle da concentração de óxido nítrico no meio fisiológico está diretamente ligado ao tipo de efeito que esta molécula pode gerar^[34,36]. Concentrações de NO inferiores 1 µM em tecidos induzem efeitos diretos, por não exigirem um fluxo contínuo de produção de NO, como reações com grupos heme de proteínas e ativação de enzimas^[34]. Por outro lado, concentrações de NO acima de 1 µM estão relacionadas com efeitos indiretos do NO e envolvem a formação de espécies reativas de oxigênio (radical superóxido e hidroxila) e também a formação de oxigênio molecular em excesso^[36,37].

Logo, dependendo da concentração NO em tecidos com elevado nível de estresse oxidativo (por exemplo, em tecidos inflamatórios e tecidos cancerosos) pode ocorrer uma

diminuição destas inflamações e em alguns casos a extinção completa do quadro de estresse oxidativo ou o agravamento deste quadro pela produção de espécies altamente reativas em excesso^[29,34,37]. Novamente, torna-se evidente que o controle da concentração de NO no meio fisiológico é de extrema importância.

1.3.3 – Óxido nítrico como antioxidante: reações e implicações

O óxido nítrico pode apresentar função antioxidante, principalmente se consideradas suas reações envolvendo RNOS. A Figura 2 mostra como o NO pode participar na desativação de diversos processos fisiológicos potencialmente geradores de radicais.

Figura 2 – Participação do NO como antioxidante nas reações envolvendo espécies reativas de oxigênio e dos íons Fe(II/III)^[29,34].

A principal via pela qual o NO pode atuar como antioxidante é através da desativação das espécies oriundas da reação de Fenton (rota 1) e de Haber-Weiss (rota 2). Uma vez que espécies de Fe(III) são mais estáveis no meio fisiológico^[29,34], o impedimento de sua redução a Fe(II) pode levar a uma diminuição expressiva da formação do radical hidroxila. Além

disso, a reação direta do radical $\text{OH}^\bullet$ com o NO (reação 4) leva a formação do íon nitrito (NO_2^-), que é consideravelmente menos tóxico^[9] que o radical $\text{OH}^\bullet$. Por essa reação apresentar uma elevada constante de velocidade específica ($k_1 \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[9] esta pode constituir em uma via de desativação do radical $\text{OH}^\bullet$.

Reação 4 – Formação do íon nitrito pela reação do NO com o radical $\text{OH}^\bullet$

Outra via importante de interrupção da formação de radicais sugerida na Figura 2, é através da formação de metalo-nitrosilos. A literatura reporta que íons de metais de transição tais como Ni^{2+} , Cu^{2+} e principalmente íons de $\text{Fe}^{2+/3+}$ seriam responsáveis pela formação do radical hidroxila^[11]. O valor elevado da constante de velocidade específica ($k_2 \approx 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para a formação de nitrosilo complexos de ferro (reação 5)^[38] poderia levar a uma diminuição de íons Fe^{2+} (rota 2) no meio fisiológico e portanto a diminuição da formação de radicais $\text{OH}^\bullet$.

Reação 5 – Formação de nitrosilo complexos de ferro

A reação do radical $\text{O}_2^\bullet$ com o NO é ponto que exemplifica sobre a característica dual desta molécula em meio fisiológico. Em meios onde há elevada concentração de superóxido, elevadas concentrações de NO levam a formação do íon ONOO^- (reação 6) com constante de velocidade específica bastante elevada ($k_3 \approx 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[8,29].

Reação 6 – Formação do íon peroxinitrito

Embora até o momento, a literatura^[29] não possua dados conclusivos sobre qual espécie, o radical $O_2^{\cdot-}$ ou o íon $ONOO^-$, seria mais danoso ao organismo foi sugerido que a atividade tripanomocida apresentada pelo óxido nítrico seria na verdade devido a formação *in situ* do íon $ONOO^-$ ^[8].

1.4 – Metais de transição: aplicações como fármacos e transportadores de óxido nítrico

O estudo de complexos de metais de transição como fármacos, seja envolvendo diretamente o centro metálico ou o utilizando como transportadores de moléculas de interesse, tem sido alvo de várias investigações recentes, como descrito na literatura^[39,40]. A cisplatina, $cis-[Pt(Cl)_2(NH_3)_2]$, o mais conhecido exemplo de metalofármaco em uso atualmente é um dos poucos fármacos com atividade contra tumores altamente agressivos como sarcomas e carcinomas^[39]. Exemplo mais recente é o complexo NAMI-A, $trans-[RuCl_4(DMSO)HIm]H_2Im$, o qual está em fase final de testes clínicos. Este complexo se demonstrou muito eficaz no tratamento de vários tipos de câncer principalmente quando envolvendo tumores sólidos^[41]. Além disso, complexos metálicos contendo o íon nitrosilo (NO^+) na esfera de coordenação estão sendo testados, no tratamento de diversas doenças dentre as quais câncer, doença de Chagas e leishmaniose^[27,42,43,44].

Complexos metálicos de rutênio(II) têm sido estudados como possíveis liberadores de NO em meio fisiológico^[31,45]. Podemos destacar a classe das tetraminas de rutênio(II) ($trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(L)]^{3+}$), formalmente descritas na literatura como $[Ru^{II}NO^+]^{[16]}$, onde L = isonicotinamida (isn), picolina (pic), nicotinamida (nic), piridina (py), pirazina (pz), L-Histidina (L-Hist), imidazol (imN), 4-picolina (4-pic), trietilfosfito ($P(OEt)_3$) e $[Ru(NO)Hedta]$. Estes complexos liberam óxido nítrico após redução monoelétrica do íon

nitrosênio coordenado^[32] (reação 7), seguido pela formação do aquocomplexo (reação 8) ou através da irradiação na banda de transferência de carga $\text{Ru}_{4d\pi} \rightarrow \text{NO}_{p\pi^*}$ (reação 9)

Reações 7 a 9 – Reação de redução monoelétrica e liberação de óxido nítrico via aquação dos nitrosilo complexos de rutênio(II) e liberação NO pela via fotoquímica^[32].

Os nitrosilo complexos da classe $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ são moléculas especialmente interessantes como metalofármacos em meio fisiológico, visto que apresentam: baixa toxicidade^[26], são solúveis em água^[32], suas soluções são estáveis no que diz respeito à exposição ao oxigênio,^[32] capacidade de modulação da liberação do óxido nítrico em função do efeito *trans* exercido pelos ligantes (L) utilizados^[45,46] e pelo potencial de redução do ligante NO^+ nestes compostos ser acessível a diversos redutores encontrados em meio biológico^[32]. Dados de potencial de redução do ligante NO^+ e de constante específica de liberação de NO para os nitrosilo complexos encontram-se no Apêndice II.

Desta forma, os nitrosilo complexos de rutênio(II) poderiam agir como antioxidantes em meio fisiológico, por meio da reação de redução do ligante NO^+ a NO^0 e posteriormente em reações onde o NO liberado pode estar envolvido. De acordo com estudos correlatos desenvolvidos em nossos Laboratórios, existem evidências de que estes nitrosilos podem, quando na presença de redutores que possuam potencial redox adequado, gerar nitroxila (NO^-), outro importante agente em meio fisiológico^[47,48]. Ainda é plausível se supor que os aquo-complexos, $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{2+}$, gerados após a liberação do óxido nítrico possam agir como antioxidantes através da oxidação do centro metálico, gerando o correspondente complexo de Ru(III).

Poucos trabalhos estão disponíveis na literatura tratando das reações entre metais de transição, contendo NO^+/NO^0 coordenado ou não, atuando como captadores de radicais. O fato do NO^0 produzido pela redução do nitrosilo coordenado poderia atuar como um agente pró ou antioxidante^[8,29], visto que dependendo da concentração do NO^0 e das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio presentes, os produtos destas reações podem ser ainda mais danosos, contrapondo-se portanto aos efeitos benéficos do NO. Desta forma, o estudo das reações dos radicais superóxido e hidroxila com os nitrosilo complexos de rutênio(II) é por si só importante.

II – Objetivo e Justificativas

Objetivo: Analisar a reatividade de nitrosilo complexos metálicos frente a radicais. Para tanto utilizou-se tetraaminas de rutênio (II) e os radicais DPPH[•], OH[•] e O₂^{•-} como modelos.

As etapas deste trabalho envolveram:

- Investigar as reações dos nitrosilo complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)](X)₃, onde L = imN, isn, nic, py, 4-pic e P(OEt)₃ e X = BF₄⁻ ou PF₆⁻ e dos respectivos aquo complexos *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(L)](X)₃ com o radical DPPH[•] em meio aquoso.
- Investigar as reações dos nitrosilo complexos supracitados com o radical hidroxila (OH[•]), gerado através da reação de Fenton.
- Investigar as reações dos nitrosilo complexos supracitados com o radical superóxido (O₂^{•-}) e suas implicações na liberação de NO.

O radical DPPH[•] é um modelo extensamente utilizado para verificação da capacidade antioxidante, e, portanto será utilizado como modelo de radical para os experimentos executados. Em relação aos radicais hidroxila e superóxido estes foram escolhidos por se tratarem de radicais de relevância biológica, formados principalmente em situações de estresse oxidativo.

III – Metodologia

3.1 – Instrumentação

3.1.1 - Espectrofotometria de UV-vis

As medidas de espectrofotometria de UV-vis foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3105. Foram utilizadas celas de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm. Como referência foram utilizadas soluções aquosas em pH e condições específicas de cada protocolo de medida.

3.1.2 - Medidas de eletrodo seletivo de NO

As medidas utilizando eletrodo seletivo de NO foram realizadas com o equipamento da Innovative Instruments Inc., modelo inNO-T, cujo limite de detecção de NO em solução é de $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. A corrente de fundo do eletrodo foi estabilizada durante uma hora imergindo o eletrodo nas respectivas soluções utilizadas em cada experimento. O tempo de monitoramento da liberação de NO foi de uma hora.

3.1.3 – Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos através de um espectrofotômetro BOMEM, modelo FT-IR MB – 102, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Para obtenção das pastilhas foi utilizado brometo de potássio (KBr). As pastilhas foram preparadas no momento das medidas utilizando-se concentração de complexo a 1% em massa em relação ao KBr.

3.1.4 – Voltametria cíclica

As medidas eletroquímicas foram efetuadas em um potenciostato AUTOLAB modelo PGSTAT100 ou em um potenciostato PAR modelo 264A. Foi utilizada uma cela de vidro encamisada de volume de 5,0 mL. O eletrodo de trabalho utilizado foi de diamante dopado com boro, fabricado pela Adamant Technologies S.A., La Chaux-de-Fonds, Suíça, com dopagem de 8.000 ppm de boro e área superficial de 6,25 mm² ou eletrodo de carbono vítreo, de área superficial de 3,0 mm². O contra-eletrodo utilizado foi uma placa de platina de área superficial de 8,0 mm² e como eletrodo de referência o eletrodo de calomelano saturado (Hg₂Cl₂/Hg/KCl_{sat}). As medidas foram realizadas em meio aquoso ácido (pH = 3,0, μ = 0,1 mol L⁻¹ CF₃CO₂Na/CF₃CO₂H). A temperatura foi controlada por um banho termoeletrônico (25,0 ± 0,5 °C). As concentrações dos complexos utilizadas nestes experimentos foram de 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Todos os potenciais reportados nesta dissertação encontram-se convertidos para os valores relativos à ECS.

3.1.5 - Medidas de espectroscopia de ressonância de elétrons (RPE)

3.1.5.1 - Medidas a temperatura ambiente utilizando o trapeador de spin DMPO

As medidas de RPE foram efetuadas em um espectrômetro Bruker, modelo ESP300E, operando na faixa de micro-ondas entre 9,0 e 10,0 GHz (banda – X), utilizando parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para medidas de RPE a temperatura ambiente.

Parâmetro	Valor
Modulação de amplitude	0,1 G
Modulação de frequência	100,0 KHz
Campo central	3430,0 G
Campo varrido	80,0 G
Potência de micro-ondas	20,0 mW
Ganho do receptor	$8,0 \times 10^4$

Durante o experimento foi utilizado um sistema de fluxo contínuo, composto por uma bomba peristáltica, cânula de teflon para condução das soluções e capilar de quartzo (diâmetro interno = 1,0 mm; $V \approx 80 \mu\text{L}$) como cela para aquisição dos espectros. O sistema capilar foi utilizado em substituição a “flat-cell” devido a maior reprodutibilidade das medidas e maior praticidade no momento da troca das amostras. Após a mistura dos reagentes descritos na Tabela 3, o sistema foi agitado por 2 minutos em tubo eppendorf e depois bombeado até o centro da cavidade, onde o capilar de quartzo está localizado. O tempo total entre a mistura dos reagentes e a aquisição do primeiro espectro foi de 3 minutos.

3.1.5.2 - Medidas de ressonância paramagnética de elétrons a baixa temperatura

As medidas de RPE a baixa temperatura foram efetuadas em um espectrômetro Bruker, modelo ESP300E, alocado em nosso laboratório ou eventualmente em um espectrômetro Bruker Elexsys E580, no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP). Estas

últimas foram conduzidas sob supervisão do Prof. Dr. Cláudio José Magon, a quem agradecemos os préstimos.

Ambos os equipamentos contam com um sistema de criostato para medidas a temperatura variável. O equipamento alocado em nosso laboratório conta com um sistema Euroterm, modelo B-VT 2000, sendo capaz de atingir temperaturas na ordem de 100 K enquanto que o equipamento alocado no IFSC conta com um criostato ER 4112HV, capaz de atingir a temperatura de 4 K. A Tabela 2 apresenta os parâmetros utilizados.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados nos experimentos de RPE a baixa temperatura.

Parâmetro	Valor	
	IQSC	IFSC
Temperatura	115K	10K
Modulação de amplitude	1,0 G	1,0G
Modulação de frequência	100,0 KHz	100,0 KHz
Campo central	3430,0 G	3400,0 G
Varredura de campo	800G	400G
Potência de microondas	4,0 mW	10,0 mW
Ganho do receptor	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$
Número de médias	32	8

3.1.6 – Experimentos utilizando fotólise por pulso de LASER

Um Laser Continuum, modelo Surelite-II, operando no 3º harmônico (355 nm) foi utilizado para “bombear” um sistema de oscilação ótica paramétrica (cristal bi-refringente), também da Continuum, para o ajuste do comprimento de onda em 440 nm. A energia média de

saída de cada pulso foi medida com auxílio de um medidor de energia, marca Coherent, modelo LASERMATE/P. Para determinar a energia média de cada pulso, foi efetuada a leitura e posteriormente a média de energia de um conjunto de 20 pulsos. Em geral, as amostras foram irradiadas com energia de $3,0 \pm 0,9$ mJ por pulso.

3.2 - Síntese e caracterização dos nitrosilo complexos de rutênio(II)

3.2.1 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados no processo de síntese dos complexos são de pureza analítica (P.A). Os solventes (acetona e etanol) foram destilados e tratados de acordo com a literatura^[49]. Éter etílico foi tratado com sódio metálico e sulfato ferroso amoniacal por uma noite, destilado e estocado em frasco escuro para evitar a formação de peróxido^[49]. Os demais reagentes, $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, NH_4PF_6 , NaNO_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, HCl , HBF_4 , CF_3COOH , NaHCO_3 e H_2O_2 foram utilizados sem prévia purificação, devido ao alto grau de pureza informado pelos fabricantes (Merck ou Sigma-Aldrich).

Os procedimentos de síntese que demandavam atmosfera inerte foram realizados utilizando-se como gás inerte argônio, procedência White Martins. Este foi purificado para retirada de oxigênio através de um sistema de via úmida composto de dois vasos lavadores contendo solução ácida de CrCl_3 , juntamente com amálgama de Zn(Hg) ^[49]. Em seguida, o gás passou por um vaso contendo H_2SO_4 concentrado para promover sua secagem^[50]. Todos os procedimentos que demandavam ausência de oxigênio foram realizados em sistemas fechados, utilizando balões borbulhadores, balões de fundo redondo e cânulas de teflon para condução do gás e transferência das soluções.

3.2.2 – Caracterização dos compostos

Os nitrosilo complexos obtidos foram submetidos a análises de IV (presença da banda em $\nu(\text{NO})$ próximo a 1900 cm^{-1})^[32]; UV-vis (bandas d-d e transferências de carga)^[32]; voltametria cíclica (verificação do potencial NO^+/NO^0)^[32]; análise elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio e rutênio sendo os dados obtidos comparados com os descritos na literatura^[32].

3.2.3 - Via de síntese dos complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)](BF₄)₃, onde L = isn, 4-pic, nic, py, imN.

A rota de síntese para este conjunto de complexos segue procedimento descrito na literatura^[46,51]. A Figura 3 apresenta um fluxograma ilustrando as principais etapas do processo de síntese.

Figura 3 – Rota de síntese do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)](BF₄)₃^[46].

Todos os complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄(SO₄)(L)](BF₄)₃ foram submetidos a recristalização seguindo o procedimento: dissolveu-se o produto da síntese no menor volume possível de solução de HCl 6,0 mol L⁻¹, filtrou-se a solução obtida e esta foi reprecipitada com auxílio de acetona desaerada^[46].

3.2.4 - Via de síntese do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(P(OEt)₃)](PF₆)₃

A rota de síntese para este complexo segue procedimento desenvolvido pelo nosso Grupo e reportado na literatura^[52,53]. Abaixo é mostrado um fluxograma no qual os principais processos de síntese são apresentados (Figura 4).

Figura 4 – Rota de síntese do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(P(OEt)₃)](PF₆)₃^[53].

O complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(P(OEt)₃)₂](PF₆)₂ foi lavado várias vezes com água gelada para retirada do excesso de ligante P(OEt)₃ retido no sólido. Por ser sensível a oxidação pelo oxigênio, os procedimentos empregando o complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₅](PF₆)₂ foram efetuados em sistema de “glove-bag” em atmosfera de argônio, sendo que este complexo foi imediatamente utilizado na próxima etapa de síntese.

3.2.5 - Síntese do complexo [Ru(NO)(Hedta)]

O complexo [Ru(NO)(Hedta)] foi sintetizado conforme procedimento descrito na literatura^[54,55] e descrito abaixo (Figura 5).

Figura 5 – Rota de síntese do complexo [Ru(NO)(Hedta)]^[55].

3.2.6 - Síntese do complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(SO₂)](CF₃SO₃)₂

O complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(SO₂)](CF₃SO₃)₂ foi sintetizado conforme procedimento descrito na literatura^[56] e descrito na Figura 6.

Figura 6 – Rota de síntese do complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(SO₂)](CF₃SO₃)₂^[56].

Os aquo complexos *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(L)]²⁺, L = NH₃, isN e imN, foram preparados pela redução dos seus precursores utilizando amálgama de Zn(Hg) e utilizados imediatamente.

3.3 - Reações envolvendo o radical DPPH•

3.3.1 - Reagentes: procedência e pureza

O radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila; Sigma-Aldrich) teve sua pureza verificada através de espectroscopia de UV-vis. Para tanto utilizou-se uma solução de concentração 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, calculou-se o coeficiente de absorvidade molar e comparou-se com o valor fornecido pela literatura (λ_{max} = 520 nm, ε = 12.000 mol⁻¹ L cm⁻¹)^[57]. As soluções utilizadas nas medidas foram preparadas imediatamente antes do seu uso. O surfactante Tween-20 (polioxietileno – monolaureto de sorbitol; Acros Organics) foi utilizado sem prévia purificação.

3.3.2 - Preparo das soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água Milli-Q (18,2 MΩ cm; T = 25°C). Apesar de sua reportada estabilidade^[32], as soluções estoque dos nitrosilo complexos foram preparadas sempre imediatamente antes de sua utilização em ácido trifluoracético (pH = 3,0) previamente deaerada. As soluções de DPPH• também foram preparadas nas mesmas condições descritas acima para os nitrosilo complexos, porém na presença de Tween-20, conforme o seguinte procedimento^[57]: dissolveu-se a massa requerida de DPPH• no mínimo volume de clorofórmio (grau de pureza HPLC), adicionou-se lentamente sobre agitação o volume requerido de uma solução CF₃COOH/Tween-20 (C_{tween-20} = 0,04 g mL⁻¹). Evaporou-se o clorofórmio da solução através de fluxo de argônio sendo o volume corrigido posteriormente em balão volumétrico^[57]. A concentração final de DPPH• na solução foi verificada através de espectroscopia UV-vis.

3.4 - Reações envolvendo o radical hidroxila

3.4.1 - Reagentes: procedência e pureza

O sal de cloreto férrico tetra hidratado (FeCl₂.4H₂O; Merck) foi tratado conforme procedimento descrito na literatura^[58] e mantido em dessecador. Peróxido de hidrogênio 30%, (Perhydrol - Merck) foi utilizado sem prévia purificação devido ao alto grau de pureza informado pelo fabricante, sendo estocado em geladeira e retirado somente no momento do preparo das soluções. O trapeador de spin DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolidina-N-óxido; Aldrich), foi purificado conforme o seguinte procedimento^[59,60]: 500μL de DMPO foram adicionados a 1mL de água Milli Q. A esta solução foi adicionado 250 mg de carvão vegetal

ativado seguido de agitação por 5 minutos. A solução resultante foi filtrada com auxílio de um sistema de membrana porosa (membrana de celulose regenerada, poro 0,25 μm ; Sartorius). A concentração final da solução de DMPO foi verificada através de espectrofotometria de UV-vis ($\lambda_{\text{max}} = 236 \text{ nm}$, $\epsilon = 7.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[59,60]. O composto purificado foi guardado em freezer (-15°C) até o momento do uso.

3.4.2 - Preparação das soluções e protocolo de medida

A solução estoque de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($C_{\text{Fe}^{2+}} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada utilizando solução de ácido trifluoroacético (pH = 3,0) previamente deaerada. Após a dissolução do sal, a solução continuou em fluxo de argônio para evitar a oxidação de Fe(II) à Fe(III); as soluções de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram sempre preparadas no momento da medida.

A solução estoque de H_2O_2 ($C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada através da diluição do H_2O_2 30 %. A solução foi renovada constantemente para garantir a concentração inicial de peróxido. A solução de DMPO utilizada foi proveniente do processo de purificação que este reagente foi submetido (item 3.4.1), sendo pipetada somente a quantidade necessária para a obtenção da concentração requerida.

Todas as medidas que envolveram a reação de Fenton seguiram o seguinte protocolo (Tabela 3)

Tabela 3 – Protocolo utilizado para a reação com radical hidroxila.

Reagente	Volume (μL)	Volume (μL)	Concentração
	Reações	Controle	Final (mol L ⁻¹)
H₂O	-	160	-
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺	160	-	Variável
H₂O₂	10	10	7,5 x 10 ⁻⁴
FeCl₂	15	15	1,1 x 10 ⁻³
DMPO	15	15	2,0 x 10 ⁻³
Total	200	200	-

Foram pesadas massas dos complexos para que a concentração da solução estoque fosse igual à $1,5 \pm 0,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Com esta solução, efetuou-se a medida em excesso de 100 vezes de complexo em relação ao radical. Para as medidas de 1 e 50 vezes de excesso, foram feitas diluições apropriadas da solução estoque original, para se obter a concentração desejada. Todas as soluções dos complexos foram mantidas sob fluxo de argônio para evitar qualquer interferência de oxigênio.

O radical hidroxila, quando reage com o captor de spin DMPO gera um espectro de RPE com quatro linhas (intensidades relativas 1:2:2:1, $A_N = 14.8 \text{ G}$), ilustrado na Figura 7, o qual é característico da formação do aduto DMPO-OH^[60].

Figura 7 – Espectro de RPE do aduto DMPO-OH resultante da reação entre o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e o captador de spin DMPO.

Para a quantificação do radical hidroxila captado pelos nitrosilo complexos comparou-se as áreas dos sinais das reações de controle e das reações com os nitrosilo complexos de rutênio. A integração dos sinais foi efetuada no próprio software do equipamento.

3.5 - Medidas envolvendo o radical superóxido ($\text{O}_2^\bullet$)

3.5.1 - Geração do radical $\text{O}_2^\bullet$ pela via fotoquímica

O radical superóxido foi gerado fotoquimicamente utilizando riboflavina como sensibilizador e DTPA (ácido dietileno-triamino-pentaacético) como doador de elétrons^[61]. Em um experimento típico, uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de DTPA foi irradiada com luz de comprimento de onda de 440 nm (Reação 10). A solução foi irradiada por 4 minutos a uma taxa de 2 pulsos por segundo.

Reação 10 – Geração Fotoquímica do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

Os nitrosilo complexos de rutênio utilizados neste trabalho podem apresentar fotolabilização do NO coordenado, quando os complexos são irradiados em comprimento de onda por volta de 350 nm. Como o comprimento de onda utilizado foi de 440 nm e o rendimento quântico para a fotolabilização é muito pequeno ($\phi_{\text{médio}} \approx 0,1$)^[62], reações fotoquímicas envolvendo os nitrosilo complexos podem ser descartadas.

3.5.2 - Geração do radical $\text{O}_2^{\bullet -}$ pela via enzimática

O radical superóxido também foi obtido através da conversão do substrato xantina a hipoxantina^[63] pela enzima xantina oxidase segundo a Reação 11.

Reação 11 – Formação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) através da oxidação da xantina pela enzima xantina oxidase.

A reação foi efetuada em tampão fosfato (pH = 7,2; $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a temperatura de 25°C. O tempo de incubação foi de 20 minutos. Como controle positivo da geração do radical

$O_2^{\bullet -}$ foi monitorada a produção de ácido úrico pela enzima ($\lambda_{\max} = 290 \text{ nm}$, $\epsilon = 9183 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[63].

3.5.3 - Protocolo de medida

As medidas envolvendo o radical superóxido gerado fotoquimicamente foram executadas segundo o seguinte protocolo (Tabela 4).

Tabela 4 – Protocolo utilizado para geração fotoquímica do radical superóxido.

Reagente	Volume (μL)	Volume (μL)	Concentração
	Reações	Controle	Final (mol L ⁻¹)
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺	variável	-	variável
Cit C (Fe(III))	200	200	2,0 x 10 ⁻⁵
DTPA	200	200	1,0 x 10 ⁻²
Riboflavina	200	200	1,0 x 10 ⁻³
HTFA (pH = 5,0)	-	variável	-
Total	800	800	-

As concentrações dos nitrosilo complexos variaram entre $4,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ a $2,5 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, partindo-se de uma solução estoque de concentração $4,0 \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para evitar problemas com a degradação dos complexos, as soluções estoques foram renovadas periodicamente.

As medidas envolvendo o radical superóxido gerado pela via enzimática foram executadas segundo o seguinte protocolo (Tabela 5).

Tabela 5 – Protocolo utilizado para geração enzimática do radical superóxido.

Reagente	Volume (μL)	Volume (μL)	Concentração
	Reações	Controle	Final
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (L)] ³⁺	400	-	variável
Cit C (Fe(III))	200	200	2,0 x 10 ^{-5(a)}
Xantina	100	100	1,0 x 10 ^{-4(a)}
Xantina Oxidase	300	300	0,016 ^(b)
T.P ^(*) (pH = 7,2)	-	variável	-
Total	1000	1000	-

(*) tampão fosfato; (a) mol L⁻¹; (b) unidades mL⁻¹

A concentração dos nitrosilo complexos foram as mesmas relatadas para os experimentos utilizando a geração fotoquímica do radical.

3.5.4 - Detecção e quantificação do radical O₂^{•-}

O radical superóxido foi detectado e quantificado a partir de uma solução 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de citocromo c (proveniente de fibra muscular de coração de cavalo, Sigma-Aldrich). A redução do citocromo c pelo superóxido foi monitorada através da formação de banda em 550 nm (Figura 8) sendo posteriormente quantificado ($\epsilon = 21.000 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$)^[59]. Os experimentos foram conduzidos em solução de ácido trifluoroacético (pH = 5,0) ou em tampão fosfato (pH = 7,2).

Figura 8 – Espectro de UV-vis típico para detecção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), utilizando como sonda citocromo c. Legenda: (—): controle (cit c Fe(III)); (—): após reação com superóxido (cit c Fe(II)). T = 25 °C.

3.6 - Medidas de cinética por competição

Para a estimativa da constante de velocidade específica de segunda ordem para a captação do radical hidroxila e superóxido, foi utilizada a técnica de cinética por competição^[64,65]. Neste tipo de experimento, uma sonda (nos experimentos efetuados, citocromo c ou DMPO) e o composto que se deseja analisar (neste caso, os nitrosilo complexos) competem pelo radical superóxido formado, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Reação de competição entre o citocromo c e os nitrosilo complexos.

O valor da constante de velocidade específica da reação entre o citocromo c e o radical superóxido está relatada na literatura^[59] com o valor de $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH = 5,0; T = 25 °C). Portanto, através da expressão:

$$\left(\frac{\% \text{Cap}}{1 - \% \text{Cap}} \right) \times (k_1) \times C_{\text{cit-c}} = (k_2) \times C_{\text{RuNO}}$$

Onde: $\% \text{Cap} = \text{Abs}_{\text{reação}} / \text{Abs}_{\text{controle}}$

é possível calcular a constante de velocidade específica k_2 entre o radical superóxido e os nitrosilo complexos.

A dedução da expressão acima está demonstrada no Apêndice I. Como será discutido adiante, esse método não foi efetivo para o cálculo da constante específica de velocidade de captação do radical $\text{OH}^\bullet$ pelos nitrosilo complexos. Portanto, nas equação e as deduções constam somente os parâmetros ($C_{\text{cit-c}}$ e k_1) para o radical superóxido.

IV – Resultados e Discussão

4.1 – Comportamento voltamétrico dos nitrosilo complexos de rutênio(II)

4.1.1 – Aspectos gerais

Os nitrosilo complexos de rutênio(II) de fórmula $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(L)]^{3+}$ apresentam dois processos eletroquímicos na faixa de potencial de $-1,0V$ a $1,0V$. Observa-se a redução do ligante NO^+ a NO^0 e posteriormente a formação do par $trans-[Ru(H_2O)(NH_3)_4(L)]^{2+}/trans-[Ru(H_2O)(NH_3)_4(L)]^{3+}$ para os compostos da série utilizada neste trabalho. Para os compostos em que a constante de velocidade específica de liberação de NO (k_{NO}) apresenta valores inferiores a $0,2\ s^{-1}$ ^[32] é possível observar também o processo de oxidação do ligante NO^0 . Os valores de potencial de redução para o processo $[Ru(NO)]^{3+/2+}$ e de k_{NO} para os nitrosilo complexos utilizados neste trabalho encontram-se tabelados no Apêndice II. A Figura 10 mostra o voltamograma cíclico típico do complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OEt)_3)]^{3+}$ em solução aquosa ácida. Os processos indicados na Figura 10 demonstram a redução no nitrosil (b) e o par redox relativo ao aquo complexo (a).

Figura 10 – Voltamograma cíclico do complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$. (—): complexo 1º ciclo; (—): complexo 2º ciclo; (---): eletrólito suporte; $\text{CF}_3\text{COONa}/\text{CF}_3\text{COOH}$; pH = 3,0; $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; T = 25°C; V = 100 mV s⁻¹; eletrodo de trabalho carbono vítreo.

Como pode ser observado na Figura 10, não é possível identificar o par redox do centro metálico Ru(II)/Ru(III) no intervalo de potencial útil do eletrodo de carbono vítreo. Kain e colaboradores^[66] mostraram que para o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Cl})_5]^{2-}$ o par redox deste centro metálico encontra-se em +1,52 V vs. ECS, utilizando como eletrólito n-butilnitrila e platina como eletrodo de trabalho. Como os cloretos são melhores doadores π em relação às aminas espera-se, portanto que o par redox Ru(II)/Ru(III) para os complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ sejam ainda mais positivos se comparado ao complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Cl})_5]^{2-}$.

No entanto, não é possível efetuar medidas em meio aquoso em potenciais anódicos superiores a +1,2 e +1,1 V, utilizando como eletrodo de trabalho carbono vítreo ou platina^[67], respectivamente. Nestas condições ocorre evolução de oxigênio molecular na superfície do eletrodo, fazendo com que a corrente medida aumente de forma exponencial, impedindo a realização de medidas eletroquímicas e até causando a degradação do material do eletrodo.

4.1.2 – Medidas voltamétricas utilizando eletrodos de diamante dopado com boro para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ (L = nic, isn e P(OEt)₃) e [Ru(NO)(Hedta)]

Eletrodos de diamante sintético, dopados com materiais semicondutores, estão sendo estudados a mais de uma década por suportarem elevados potenciais anódicos e catódicos em meio aquoso^[68]. Dentre os vários tipos de eletrodos de diamante dopados, destaca-se o dopado com boro EDDB (eletrodo de diamante dopado com boro). Uma das principais utilizações destes eletrodos é no processo de degradação eletroquímica de poluentes orgânicos em água contaminada, principalmente inseticidas^[69].

Os eletrodos EDDB varrem uma faixa de potencial bastante extensa, -1,5 à +2,6 V vs. ECS com pequena evolução de hidrogênio e oxigênio, o que permite medidas voltamétricas em potenciais anódicos elevados. Além disso, existe a vantagem de utilizar eletrólito aquoso, dispensando uso de eletrólitos orgânicos.

Para observar o par redox Ru(II)/Ru(III) nos nitrosilo complexos, foi utilizado o EDDB em meio aquoso ácido, na faixa de potencial de +1,7 à +2,6 V. O eletrólito suporte utilizado foi CF₃COOH/ CF₃COONa 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ (μ = 0,1 mol L⁻¹).

A Figura 11 ilustra o voltamograma cíclico obtido para o íon complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(nic)]³⁺. Observa-se um processo eletroquímico (E1) centrado em +2,5 V, atribuído a componente anódica do par redox Ru(II)/Ru(III). Além disso, observam-se mais dois picos no voltamograma (E2 e E3). O pico E2 foi tentativamente atribuído como sendo a componente catódica do par redox Ru(II)/Ru(III), considerando-se que o sentido da corrente está invertido em relação ao componente anódico. Já o pico E3 pode ser atribuído a um processo anódico acoplado ao processo E2. Esta hipótese é plausível, uma vez que como pode ser observado no voltamograma da Figura 11 há a presença de uma histerese

(cruzamento das linhas do gráfico), o que pode indicar processos eletroquímicos acoplados ou consecutivos ao processo E2.

Figura 11 – Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de trabalho EDDB. (—): complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(nic)]³⁺. (—): eletrólito suporte. T = 25 °C; pH = 3,0; μ = 0,1 mol L⁻¹ CF₃COOH/CF₃COONa; V = 100 mV s⁻¹.

Uma explicação tentativa para estes demais processos estaria relacionada, por analogia com outros casos discutidos na literatura, com a formação de espécies ativas de oxigênio na superfície do eletrodo^[70]. Em um voltamograma cíclico apenas do eletrólito suporte utilizando EDDB pode-se observar um aumento discreto, porém gradual na corrente anódica a partir de +2,1 V (Figura 11), tornando-se mais evidente em potenciais próximos a +2,6 V. Este fenômeno é conhecido como “evolução de oxigênio”, e ocorre a diferentes potenciais em função do material constituinte do eletrodo de trabalho^[67]. Reações na superfície do eletrodo geram oxigênio molecular a partir da quebra homolítica das ligações químicas da água, depois da adsorção desta na superfície do eletrodo^[67]. Este comportamento ocorre com todos os eletrodos de trabalho de diferentes materiais (platina, ouro, carbono vítreo, dentre outros) quando usados em meio aquoso, porém em diferentes potenciais, devido à diferente força de

interação entre as moléculas de água e a superfície do material do eletrodo. Como exemplo, a platina apresenta evolução de oxigênio em potenciais próximos de +1,2 V^[67].

O mecanismo de formação de oxigênio molecular passa por vários estágios, dentre eles a formação de radicais OH[•] na superfície do eletrodo^[33], segundo as reações (Figura 12).

Figura 12 – Formação do radical OH[•] pela adsorção da água na superfície de eletrodos submetidos a elevados potenciais anódicos^[68].

O processo E2 deve ser composto pela componente catódica do processo relativo ao processo E1. O processo E3 deve ser uma oxidação da espécie gerada no processo E2 pelos radicais OH[•] gerados na superfície do eletrodo. Há também a possibilidade de reações acopladas nos processos E2 e E3 com o radical OH[•].

Assim, é bastante razoável considerar o processo eletroquímico E1 como sendo majoritariamente correspondente a componente anódica [Ru(II)NO]³⁺/[Ru(III)NO]⁴⁺. Foi efetuado um experimento com intuito de verificar se o potencial E1 seria apenas uma reação das espécies oxigenadas geradas na superfície do eletrodo ou então seria devido à transferência de elétrons entre eletrodo/complexo. Usando o mesmo eletrólito empregado nos experimentos envolvendo EDDb, foram obtidos voltamogramas utilizando platina com eletrodo de trabalho (Figura 13) até a região de evolução de oxigênio.

Como pode ser observado na Figura 13, na presença do nitrosilo complexo (gráfico em preto) não há o aparecimento de nenhuma espécie eletroativa na região de evolução de

oxigênio do eletrodo. Logo é concebível que o processo E1 observado no EDDB seja majoritariamente oriundo da reação de transferência de elétrons entre o eletrodo e o complexo.

Figura 13 – Voltamograma cíclico utilizando platina como eletrodo de trabalho Pt para o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(nic)]³⁺. (—): complexo; (—): eletrólito suporte. T = 25°C; pH = 3,0; $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ CF₃COOH/CF₃COONa; V = 100 mV s⁻¹.

Além disso, a região de potencial de oxidação observada para o centro metálico nos nitrosilo complexos está coerente com dados correlatos reportados na literatura^[66]. Comportamento análogo ao discutido para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺, L = nic e isn, foi observado para o complexo [Ru(NO)(Hedta)]. O pico para a oxidação do centro metálico neste último complexo está localizado em +2,2 V. Diferentemente do observado para os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(nic)]³⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(isn)]³⁺, o voltamograma cíclico utilizando EDDB como eletrodo de trabalho para o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(P(OEt)₃)]³⁺ mostrou a presença de apenas uma espécie eletroativa, E_{pa} = +2,1 V. No entanto, foi possível observar no voltamograma algumas características semelhantes as observadas nos demais voltamogramas como a presença de histerese e o aumento da corrente anódica.

A presença do $E_{pa} = +2,1$ V para o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$ indica mais uma vez que o potencial de oxidação do par $[\text{Ru}(\text{II})\text{NO}^+]^{3+}/[\text{Ru}(\text{III})\text{NO}^+]^{4+}$ para os nitrosilo complexos estudados neste trabalho encontra-se acima de +2,0V.

Uma possível explicação para a observação de apenas um processo eletroquímico no complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$ pode estar relacionado com as diferentes estabilidades dos fragmentos $[\text{Ru}(\text{III})\text{NO}]^{4+}$ gerados no processo de oxidação dos compostos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$. O elevado efeito *trans* do ligante de fósforo poderia induzir a dissociação do fragmento NO^+ da esfera de coordenação da espécie contendo Ru(III).

Portanto, o conjunto dos dados acima expostos nos permite afirmar que os pares redox Ru(II)/Ru(III) para os complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ e para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$ encontram-se acima de 2,0 V *vs.* ECS em meio aquoso. Os valores de E_{pa} para os complexos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Potenciais de oxidação Ru(II)/Ru(III) para os complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$.

Ligante	E^0 Ru(II)/Ru(III) (<i>vs.</i> ECS)
Hedta	+2,20
Isn	+2,60
Nic	+2,50
P(OEt) ₃	+2,10

O elevado valor de potencial encontrado para a oxidação do centro metálico reflete a elevada acidez π do ligante NO^+ coordenado ao centro metálico de rutênio(II), fazendo com que o este possua caráter de rutênio(III)^[31], o que explica o elevado potencial necessário para sua oxidação. Este fato fica evidente quando é feita a comparação com os aquo complexos de

rutênio(II) de fórmula *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)(L)]²⁺, precursores sintéticos dos nitrosilo complexos. Para estes complexos, o par redox Ru(II)/Ru(III) exibe valores na faixa de 0,1 a 0,6 V^[71], coerentemente com o fato do ligante H₂O não exibir acidez π .

4.2 – Experimentos envolvendo radical DPPH•

4.2.1 – Aspectos gerais

O radical estável DPPH• é um radical orgânico centrado no nitrogênio extensamente usado como modelo para se medir a capacidade antioxidante, principalmente moléculas orgânicas derivadas de produtos naturais^[72,73]. Este radical apresenta um par redox com $E_{1/2} = 0,55$ V em meio aquoso micelar^[58], sendo portanto uma molécula com caráter oxidante brando. Desta forma, uma das vias possíveis de desativação deste radical é através da transferência de elétron por redutores, como ácido ascórbico e cisteína.

O DPPH• também pode reagir segundo mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio (H•)^[74,75], através principalmente da quebra da ligação C-H e O-H de moléculas insaturadas, como é o caso dos polifenóis. Neste caso, a fraca energia de ligação entre o átomo de hidrogênio e o átomo do carbono do anel aromático permite que a reação ocorra por esta via.

No entanto, outros mecanismos de desativação podem acontecer. Ingold^[74] demonstrou que o radical DPPH• também pode reagir com antioxidantes através de mecanismos mais complexos, onde ocorrem reações acopladas de transferência de próton e de elétron, porém este mecanismo é fortemente dependente da polaridade do solvente e ocorre preferencialmente em meio orgânico. A Figura 14 ilustra as principais vias de desativação do radical DPPH•.

Figura 14 – Principais mecanismos de desativação do radical DPPH•

Como mostrado no item anterior, os nitrosilo complexos de rutênio(II) apresentam potenciais de oxidação do centro metálico bastante elevados, impossibilitando que ocorra a transferência de elétron do metal para o radical DPPH•. A transferência de átomo de hidrogênio também se apresenta pouco provável. A amônia não é um bom doador de átomos de hidrogênio, visto que a ligação N-H é bastante forte e a coordenação do ligante no plano equatorial não leva a mudanças profundas na energia desta ligação. Já os ligantes N-heterocíclicos estudados neste trabalho apresentam energias de ligação dos átomos de hidrogênio menores, por se tratarem de sistemas insaturados. Além disso, a coordenação no centro metálico de Ru(II) leva a uma diminuição da energia de ligação dos átomos de hidrogênio do anel aromático, uma vez que a retrodoação $\text{Ru}_{4d\pi} \rightarrow \text{L}_{p\pi^*}$ ^[46] faz com que o anel aromático fique com maior densidade eletrônica. Porém a diferença de energia destas ligações também não é significativamente afetada. Deslocamentos químicos ($\delta_{1\text{H}}$) para os átomos de hidrogênio dos ligantes N-heterocíclicos coordenados e livres são usualmente pequenos (da ordem de 1,0 ppm)^[46] indicando que as ligações de hidrogênio não são profundamente afetadas. Como a reação entre o radical DPPH• e os ligantes livres não foi observada, a reação dos nitrosilo complexos de rutênio(II) com o radical DPPH• via transferência de átomo de hidrogênio também não é esperada.

Como esperado, as reações dos complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ onde L = isn, 4-pic, nic, py, imN e $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$ com o radical $\text{DPPH}^\bullet$ ocorreram em pequena extensão (em torno de 5% de consumo do radical $\text{DPPH}^\bullet$), mesmo utilizando o complexo em excesso de 50 vezes em relação ao radical. A Figura 15 mostra o espectro de UV-vis da reação para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$. Esperava-se a extinção completa da banda em 525 nm, o que não ocorreu. Também não foi observada a reação entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$, os ligantes livres e os sais relativos aos contra-íons nas mesmas condições experimentais utilizadas para os nitrosilo complexos.

Figura 15 – Espectro de UV-vis da reação entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$. (—): controle; (—): $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$ 1:50 (radical:complexo); T = 25°C; pH = 3,0; 30 minutos de reação.

No entanto, foi observada a reação entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$. Monitorando a reação de desativação do $\text{DPPH}^\bullet$ por um período de 30 minutos com um excesso de 50 vezes de complexo em relação ao radical foi possível observar o decaimento de 55% da concentração do radical, conforme ilustra o espectro Figura 16. Pode-se constatar a formação da espécie DPPH_2 (ponto isobéstico em 445 nm)^[73].

Figura 16 – Variação do espectro de UV-vis da reação entre o radical DPPH• e o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OEt)_3)]^{3+}$. 1:50 (radical:complexo); T = 25°C; pH = 3,0; 30 minutos de reação. 445 nm: ponto isobéstico.

Não era esperado que houvesse reação entre este complexo e o radical DPPH•. O potencial de oxidação do centro metálico para o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OEt)_3)]^{3+}$ é +2,1 V, inacessível ao DPPH•. Medidas realizadas com eletrodo seletivo de NO⁰ mostram que durante esta reação não ocorre a liberação de óxido nítrico na solução indicando que a reação não ocorre com o ligante nitrosil. Ainda, espectro de RPE (T = 77K) obtido após 30 minutos de reação indica que não há formação de espécies paramagnéticas, e portanto não ocorre a oxidação do centro metálico.

Possivelmente, a reação observada ocorre com algum produto de degradação do complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OEt)_3)]^{3+}$ em meio aquoso ou através da abstração de átomos de hidrogênio pelo radical DPPH• do ligante P(OEt)₃. Estudos realizados pelo nosso Grupo²⁷ com o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OEt)_3)](PF_6)_3$ no estado sólido^[76,77] e em solução mostram que este pode sofrer hidrólise do ligante P(OEt)₃, gerando o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OH)(OEt)_2)]^{3+}$, etanol livre e outras espécies de fósforo livre, dentre elas o dietilfosfito e o dietilfosfonato. Existem relatos na literatura^[78], que ésteres de

fósforo(III) e fosfonatos livres podem agir como captadores de radicais, com a formação de radicais alquila ($\text{CH}_3^\bullet$, $\text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$) e etoxila ($^\bullet\text{OCH}_3$, $^\bullet\text{OCH}_2\text{CH}_3$). Portanto, é viável que a reação observada possa ocorrer através do radical $\text{DPPH}^\bullet$ abstraindo um átomo de hidrogênio do ligante trietilfosfito ou de seus produtos de degradação ou através da reação deste radical com o complexo gerado por esse processo de degradação. A constante de velocidade para a reação que ocorre entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$ foi estimada como sendo da ordem de $4,0 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

4.2.2 – Reação entre os aquo complexos e o radical $\text{DPPH}^\bullet$

A reação entre os aquo complexos e o radical $\text{DPPH}^\bullet$ foi executada em atmosfera inerte, para evitar a oxidação do centro metálico pelo oxigênio molecular. Os complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{2+}$, onde $\text{L} = \text{isn}$, imN e $\text{P}(\text{OEt})_3$, foram incubados na presença do radical $\text{DPPH}^\bullet$, em excesso e em proporção estequiométrica. Em ambos os casos a reação de neutralização do radical ocorreu. A oxidação do centro metálico pode ser observada através da espectroscopia de RPE pela detecção de $\text{Ru}(\text{III})$, conforme ilustrado na Figura 18 para a reação entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e o aquo complexo onde $\text{L} = \text{P}(\text{OEt})_3$. A estequiometria da reação entre o $\text{DPPH}^\bullet$ e os aquo complexos não foi 1:1, o que sugere que mais reações acopladas podem estar acontecendo.

A Figura 17 ilustra a reação entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$. Como podemos observar no espectro da Figura 17, a reatividade do aquo complexo é em muito superior a observada para o experimento equivalente contendo o complexo com óxido nítrico (Figura 16). Quando a reação é conduzida na proporção 1:50 (radical:complexo), há uma diminuição de 73% na absorbância do radical em 525 nm indicando a formação da espécie DPPH_2 ^[73].

Figura 17 – Espectro de UV-vis da reação entre o complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(P(OEt)₃)]²⁺ e o radical DPPH[•]. (—): controle; (—): 1:1; (—): 1:50; (Radical:Complexo). T = 25°C; pH = 3,0.

Este experimento indica que a reação de neutralização do radical DPPH[•] observado anteriormente (Figura 16) é devido à presença de ligantes do tipo P(III) e pelos produtos de sua degradação conforme sugerido pela literatura^[78] e não pelo nitrosil coordenado.

Após os 15 minutos de reação, foram efetuadas medidas de EPR a baixa temperatura (110K) para detecção de espécies metálicas paramagnéticas. Foi possível observar a presença de um sinal característico da espécie *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(P(OEt)₃)]³⁺ conforme relato da literatura^[79] (Figura 18).

Figura 18 – Espectro de RPE da reação entre o complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(H_2O)(P(OEt)_3)]^{2+}$ e o radical $DPPH^\bullet$ gerando como produto $trans-[Ru^{III}(NH_3)_4(H_2O)(P(OEt)_3)]^{3+}$. $C_{Ru} = C_{DPPH^\bullet} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $pH = 3,0$, $T = 110K$.

Assim, é concebível que ocorra a oxidação do centro metálico pelo radical $DPPH^\bullet$, pois o potencial de oxidação do centro metálico neste complexo $E^0_{Ru(II)/Ru(III)} = 0,5 \text{ V}$ é acessível a esta reação. A variação da energia livre de Gibbs e o valor da constante de equilíbrio obtidos para a reação entre o $DPPH^\bullet$ e o complexo $trans-[Ru(H_2O)(NH_3)_4(P(OEt)_3)]^{2+}$ foram respectivamente de $-4,7 \text{ KJ mol}^{-1}$ e 6,8 respectivamente.

Portanto, é plausível supor que o aquo-complexo possa reagir com o radical $DPPH^\bullet$ quer através da abstração de um hidreto do ligante $P(OEt)_3$ ou de seus produtos de degradação quer através da oxidação do centro metálico (Ru(II) a Ru(III)).

4.3 – Experimentos envolvendo radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$)

4.3.1 – Captação do radical hidroxila pelos nitrosilo complexos de rutênio

Conforme demonstrado na seção 4.2, os nitrosilo complexos de rutênio(II) não são capazes de reduzir o radical $\text{DPPH}^\bullet$ dado o elevado potencial de oxidação do centro metálico com exceção do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$ o qual pode reagir segundo outros mecanismos de reação.

No entanto, existem outros radicais, tais como o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que possuem potenciais de oxidação mais elevados e que são subprodutos de reações bioquímicas no meio fisiológico.

O valor exato do potencial de oxidação do radical hidroxila é ponto controverso de discussão na literatura^[10]. Estima-se que esteja em torno de 2,8 V, em $\text{pH} \approx 5,0$. O valor do potencial de oxidação deste radical é muito sensível ao pH , podendo ser alterado em mais de 1,0V em função da deprotonação do ácido conjugado $\text{OH}_2^\bullet$ ^[10].

Assim, o radical hidroxila possui potencial suficiente para oxidar o centro metálico nos complexos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ estudados neste trabalho sendo o processo termodinamicamente favorável ($\Delta G < 0$). O radical $\text{OH}^\bullet$ pode também ser desativado pela transferência de átomo de hidrogênio ($\text{H}^\bullet$). Porém, como discutido anteriormente para o radical $\text{DPPH}^\bullet$, esta via de neutralização seria pouco favorecida levando-se em conta o meio em que as reações foram efetuadas. Bexendale e colaboradores^[80] demonstraram que o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ reage com o radical $\text{OH}^\bullet$, gerado através de radiólise de pulso, pela via de transferência de elétrons e não pela abstração de átomo de hidrogênio em meio aquoso ácido.

De fato, os nitrosilo complexos mostraram-se capazes de reagir com o radical hidroxila, gerado através da reação de Fenton. Como forma de detecção indireta desta radical, foi utilizada a técnica de cinética por competição, utilizando o trapeador de spin DMPO, segundo a Reação 12:

Reação 12 – Trapeamento do radical $\text{OH}^\bullet$ pelo trapeador de spin DMPO.

A Figura 19 mostra um espectro típico de RPE obtido da solução após a reação entre os nitrosilo complexos e o captador de spin DMPO competindo pelo radical hidroxila.

Figura 19 – Espectro de RPE da reação do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{nic})]^{3+}$ e do captador de spin DMPO competindo pelo radical hidroxila. (—) controle; (—) $C_{\text{Ru}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (—) $C_{\text{Ru}} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25^\circ\text{C}$; CF_3COOH $\text{pH} = 5,0$. $C_{\text{DMPO}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

A Tabela 7 resume os valores de eficiência de captação do radical em função da concentração dos nitrosilo complexos. Os ligantes livres bem como os contra-íons foram testados e não se mostraram capazes de captar o radical $\text{OH}^\bullet$.

Tabela 7 – Captação do radical $\text{OH}^\bullet$ pelos complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$.

L	% Captação do Radical $\text{OH}^\bullet$ ^(*)		
	Relação Radical: Complexo		
	1:1	1:50	1:100
Nic	39,0	81,0	85,5
Isn	58,0	66,0	70,0
ImN	70,0	96,0	98,0
Py	63,0	81,0	99,0
4-pic	68,0	79,0	84,0
P(OEt)₃	70,0	100	100
Hedta	8,0	13,5	20,0

(*) $\pm 8\%$; $C_{\text{DMPO}} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Como pode ser observado, a eficiência de captação do radical hidroxila apresenta variações significativas dependendo do nitrosilo complexo utilizado. Possivelmente, este fato está relacionado com a diferença no potencial de oxidação do centro metálico dos complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ quando se varia o ligante L, visto que a influência trans exercida pelos ligantes trans posicionados ao NO pode acarretar mudanças significativas sobre o centro metálico.

Outro ponto importante a ser discutido, é a possibilidade de reações paralelas e consecutivas dos produtos da reação dos nitrosilo complexos com o radical $\text{OH}^\bullet$. Como o

potencial de oxidação do radical hidroxila é muito elevado, após a primeira reação de oxidação do centro metálico de Ru(II), podem ocorrer reações com os produtos da reação. Experimentos utilizando os aquo complexos *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄(L)]²⁺, onde L = NH₃, SO₂ e P(OEt)₃ mostraram que estes complexos são capazes de reagir com o radical hidroxila.

Experimentos realizados com os precursores dos nitrosilo complexos, *trans*-[Ru(SO₄)(NH₃)₄(L)]⁺, onde L = isn e nic, que possuem o metal com estado de oxidação (III) foram efetuados. Nas condições experimentais que foram realizadas as medidas (excesso de complexo em relação ao radical de 50 vezes) não foi observada nenhuma reação entre os sulfato complexos e o radical OH[•].

Esta observação experimental sugere duas interpretações. Primeiramente, nas condições experimentais utilizadas, a concentração de DMPO foi mantida igual a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e a concentração de complexo *trans*-[Ru(SO₄)(NH₃)₄(L)]⁺ foi mantida igual a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Como a constante de velocidade específica de captação do radical OH[•] pelo trapeador DMPO é igual a $2,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[59] é possível que a reação entre os sulfato complexos e o radical OH[•] não tenha sido observada pois a magnitude desta constante de velocidade seja muito menor que a constante de velocidade reportada para a formação do aduto DMPO[•]-OH.

Tentativas de variar a concentração do spin-trap DMPO para valores inferiores a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ não conduziram a resultados de interesse, pois o sinal de RPE aproximou-se do nível de ruído. Portanto, as condições experimentais e o método de cálculo, baseado em valores de constantes de velocidade obtidas por reação de competição limita a investigação neste caso específico. A compreensão das reações que podem ocorrer entre os sulfato complexos e o radical OH[•] demandam mais experimentos, nos quais um dos reagentes possam ser monitorados de forma direta.

Por outro lado, os resultados reforçam a hipótese que não ocorre a transferência de átomo de hidrogênio como via de desativação do radical $\text{OH}^\bullet$ nestes sistemas. Caso isto ocorresse seria possível detectar esta reação para os sulfato complexos.

Até o momento, os resultados sugerem que os sulfato complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{SO}_4)(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^+$ não reagem com o radical $\text{OH}^\bullet$ nas mesmas condições utilizadas para os nitrosilo complexos e que por consequência, a constante de velocidade desta reação caso exista, deve apresentar valor muito inferior que $1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

A constante global de velocidade para a reação de captação do radical hidroxila pelos nitrosilo complexos de rutênio(II) pode estimada com base nos dados obtidos como estando situada entre $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estes valores, que simplesmente definem um intervalo, estão próximos aos reportados na literatura por Bexandale^[80] para a reação entre os complexos metálicos de rutênio e o radical $\text{OH}^\bullet$ ($4,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[80].

4.3.2 – Aspectos da reação entre o radical $\text{OH}^\bullet$ e os nitrosilo complexos utilizando RPE

Os resultados reportados no item anterior indicam que a reação dos nitrosilo complexos com o radical $\text{OH}^\bullet$ ocorre possivelmente através da oxidação do centro metálico. Para confirmar esta hipótese, foram conduzidos experimentos de RPE a baixa temperatura (N_2 e He líquido) para a detecção de centros metálicos de Ru(III).

Conforme descrito pela literatura^[81,82], centros metálicos de rutênio(III) com grupo pontual de simetria C_{4v} (como é dos complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$) apresentam dois sinais distintos, com valores de g variando entre $2,2 < g_\perp < 2,6$ e $1,2 < g_\parallel < 1,6$ ^[82].

Como pode ser observado na Figura 20, não foi possível de se detectar espécies de rutênio(III) através das medidas de RPE para a reação entre o radical $\text{OH}^\bullet$ e os complexos

trans-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]²⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺, em concentração da ordem de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. O complexo *trans*-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]²⁺ foi escolhido por apresentar baixa constante de velocidade de liberação específica de NO e por já apresentar espectro de NO⁰ coordenado bem definido para a espécie *trans*-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]⁺[81]. Os valores de g encontrados (g_a e g_b) estão próximos ao do elétron livre (g ≈ 2,0)^[83]. Além disso, o sinal de intensidade baixa nos espectros não permite conclusões mais aprofundadas.

Figura 20 – Espectros de RPE em banda-X digitalizados para a reação entre o radical OH[•] e os complexos *trans*-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]Cl₂ (A) e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(isn)]³⁺ (B). T = 115K, pH = 3,0; 35% etilenoglicol (v/v), 32 scans. C_{Ru} = 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Nas mesmas condições experimentais, foram obtidos espectros utilizando hélio líquido como refrigerante da cavidade de RPE. Como pode ser observado na Figura 21, os espectros apresentam melhor relação sinal-ruído, e também melhor definição dos sinais. O complexo *trans*-[Ru(NO)(ciclam)Cl]²⁺ apresenta três sinais distintos são com valores de g₁ = 2,02, g₂ = 2,00 e g₃ = 1,96 respectivamente. Para o sistema envolvendo o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(isn)]³⁺, o espectro de RPE obtido à 10K também apresenta melhor resolução. Neste caso, é possível observar dois valores de g₄ = 2,02 e g₅ = 1,98.

Figura 21 – Espectros de RPE banda-X digitalizados para a reação entre o radical $\text{OH}^\bullet$ e os complexos *trans*-[Ru(NO)CiclamCl]Cl₂ (A) e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(Isn)]³⁺ (B). T = 10K, pH = 3,0; 35% etilenoglicol (v/v), 8 scans. $C_{\text{Ru}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os valores de g para os dois casos, bem como o perfil de espectro e valores de constante de acoplamento hiperfina não são compatíveis com o espectro dos respectivos aquo complexos^[81].

O valor de g para o radical NO livre trapeado em cristal de NH₃OHCl foi reportado na literatura por Ohigashi^[84] com valores de $g_x = 1,998$; $g_y = 1,999$; $g_z = 1,886$. Também foi reportado os valores de g para o complexo [Fe(CO)₂(NO)₂]⁻ com valores $g_x = 1,999$; $g_y = 1,998$; $g_z = 1,9608$. Os espectros de RPE para o complexo *trans*-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]⁺ previamente reduzidos com íons de Eu²⁺ foram obtidos a temperatura do nitrogênio líquido, apresentam os seguintes valores de g: $g_x = 1,995$; $g_y = 2,035$; $g_z = 1,88$ ^[81]. Segundo os dados expostos acima, nota-se uma similaridade entre os valores de g encontrados para os complexos *trans*-[Ru(NO)(Cl)(ciclam)]²⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(Isn)]³⁺ após a reação com o

radical $\text{OH}^\bullet$. Assim, é possível supor que o sinal detectado seja referente a NO^0 coordenado ao centro metálico.

Em primeira análise, esta hipótese seria descartada, pois a reação com o radical $\text{OH}^\bullet$, uma entidade química estritamente oxidante, levaria a oxidação do centro metálico e não a redução do nitrosil coordenado. No entanto, como já foi discutido no item 4.3.1, múltiplas reações podem ocorrer neste sistema, sendo até possível espécies de rutênio(IV) agirem como redutoras^[80]. Outra possibilidade seria uma transferência de elétron do centro de Ru(III) para o NO, formando a espécie $[\text{Ru(IV)(NO)}]^{3+}$. Caso este intermediário seja formado, seu tempo de meia vida seria muito curto, pois este seria instável devido ao elevado estado de oxidação do centro metálico. Shepherd e colaboradores^[85] propuseram a formação do fragmento $[\text{Ru(III)(NO}^+)]^{4+}$ no sistema $[\text{Ru(NO)(Hedta)}]$, através de estudos de voltametria cíclica. Se este fragmento é passível de ser formado, o fragmento $[\text{Ru(IV)(NO)}]^{3+}$ também poderia ser formado. Como pode ser observado pelo espectro de RPE (Figuras 20 e 21) a intensidade e a definição dos sinais dos espectros é bastante baixa, indicando que a quantidade de espécies paramagnéticas presentes no meio reacional é muito pequena. Isto pode ser explicado considerando-se que o tempo médio para o congelamento da reação foi de 2 segundos e que o $t_{1/2}$ da reação de oxidação do centro metálico e da formação e decaimento da espécie $[\text{Ru(IV)(NO)}]^{4+}$ é extremamente pequeno, possivelmente na ordem de mili ou micro segundos, com base na constante de velocidade estimada anteriormente para a reação entre o radical $\text{OH}^\bullet$ e os nitrosilo complexos.

4.3.3 – Monitoramento da reação entre o radical $\text{OH}^\bullet$ e os nitrosilo complexos de Ru(II) utilizando eletrodo seletivo a NO

Para auxiliar na interpretação dos experimentos de RPE envolvendo os nitrosilo complexos e o radical $\text{OH}^\bullet$ foram efetuadas medidas envolvendo eletrodo seletivo à NO^0 . Uma vez que há a possibilidade de formação de NO^0 pela reação entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{OH}^\bullet$, seria esperada a liberação de NO^0 após a reação. No entanto, não foi detectado NO^0 durante a reação entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{OH}^\bullet$.

Conforme reportado por Miranda e Wink^[29], a reação entre NO^0 e o radical $\text{OH}^\bullet$ tem constante de velocidade específica próximo ao limite da difusão ($> 1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Portanto a não detecção de NO^0 pode ser consequência desta reação. Essa reação faria com que o NO^0 gerado pela oxidação do centro metálico de Ru(II) fosse consumido pelo radical $\text{OH}^\bullet$ gerado no meio reacional, impedindo assim a detecção do óxido nítrico pelo eletrodo.

Também há a possibilidade da não liberação de NO^0 após a reação dos nitrosilo complexos com o radical $\text{OH}^\bullet$, visto que a formação da espécie $[\text{Ru(III)NO}^+]^{4+}$ pode levar a liberação de NO^+ no meio reacional.

4.3.4 – Considerações sobre a reação entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{OH}^\bullet$

Conforme discutido nas seções anteriores, o mecanismo de reação pelo qual o radical $\text{OH}^\bullet$ interage com os nitrosilo complexos é complexo. Tomando como base os experimentos voltamétricos é possível supor que a reação ocorra através da oxidação do centro metálico, visto que o potencial encontrado em meio aquoso para o par Ru(II)/Ru(III) utilizando EDDB está em torno de +2,1 V acessível portanto a oxidação pelo radical $\text{OH}^\bullet$.

No entanto, a não detecção de Ru(III) após a reação sugere que outras reações possam estar ocorrendo em sequência ou de forma paralela. A detecção, mesmo que de forma precária, do sinal de radical nos espectros de RPE após a reação sugere que o ligante NO^+ é convertido a NO^0 após a reação entre radical $\text{OH}^\bullet$ e o centro metálico. Isso sugere uma pouco provável transferência de elétrons entre o metal e o ligante nitrosil. Portanto, seria plausível supor reação do ligante NO^0 com o radical $\text{OH}^\bullet$. Esta pode ser uma explicação para a não detecção de NO^0 via eletrodo seletivo à NO^0 .

Estudos realizados por Shepherd e colaboradores^[85] utilizando o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ indicam que este complexo quando submetido a potenciais anódicos superiores a 1,4 V em eletrólito orgânico pode formar a espécie $[\text{Ru}(\text{III})\text{NO}^+]^+$. Esta espécie poderia estar em equilíbrio com a espécie $[\text{Ru}(\text{IV})\text{NO}^0]$, instável, a qual rapidamente reagiria com outras espécies do meio.

Esta etapa da reação ainda demanda mais estudo. O uso de infra-vermelho resolvido no tempo seria uma alternativa, através do monitoramento da formação da banda de NO^0 durante o curso da reação. Até o momento nossos resultados indicam a provável existência de mais reações após a captação do radical $\text{OH}^\bullet$ pelos nitrosilo complexos de rutênio(II).

4.4 – Reações entre os nitrosilo complexos e o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

4.4.1 – Captação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelos nitrosilo complexos

A reação entre o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ e os nitrosilo complexos foi monitorada via espectroscopia de UV-vis, utilizando como sonda para este radical o citocromo c^[30]. Para quantificar o consumo do radical superóxido foram efetuados experimentos de cinética de competição^[39] entre os nitrosilo complexos e o citocromo c pelo radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ conforme

ilustrado na Figura 22. O radical $O_2^{\bullet-}$ foi gerado fotoquimicamente utilizando riboflavina como sensibilizador e o ácido DTPA como doador de elétrons^[61].

Figura 22 – Geração do radical $O_2^{\bullet-}$ pela via fotoquímica e a sequência de reações de competição entre os nitrosilo complexos e o citocromo c pelo radical $O_2^{\bullet-}$.

A Tabela 8 apresenta os resultados de captação do radical $O_2^{\bullet-}$ em função da concentração dos nitrosilo complexos, conforme protocolo de reação descrito na seção 3.5. A Figura 23 ilustra os espectros de UV-vis típicos obtidos para as reações descritas acima.

Figura 23 – Espectro de UV-vis da reação de competição entre o complexo $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4(imN)]^{3+}$ e o citocromo c pelo radical $O_2^{\bullet-}$. $T = 25^\circ C$; $pH = 5,0$; (---) sem irradiar; (—) controle; (—) $C_{Ru} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (—) $C_{Ru} = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (—) $C_{Ru} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $C_{\text{citocromo c}} = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Conforme se observa na Figura 23, a captação do radical superóxido pode ser monitorada pela diminuição da absorbância da banda em 550 nm quando na presença dos nitrosilo complexos (linhas vermelha, azul e verde) em relação ao controle sem a adição dos nitrosilo complexos (linha preta). A linha pontilhada representa a solução contendo riboflavia, DTPA, citocromo c e o complexo antes da irradiação com luz no comprimento de onda de 440 nm.

Todos os nitrosilo complexos testados apresentaram-se capazes de captar o radical $O_2^{\cdot-}$, em diferentes concentrações. Em concentrações menores que $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (excesso em relação ao radical formado menor que 10 vezes) nenhum dos nitrosilo complexos testados foi capaz de captar o radical $O_2^{\cdot-}$ no modelo experimental utilizado.

Tabela 8 – Eficiência de captação do radical $O_2^{\cdot-}$ (%) * frente os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ e [Ru(NO)Hedta].

L	% Captação do Radical $O_2^{\cdot-}$		
	Relação Radical: Complexo		
	1:10	1:50	1:100
imN	1,0	28,5	88,7
isN	0,0	14,9	58,2
Nic	0,0	11,0	30,3
Py	8,7	19,0	34,4
4-pic	4,2	17,0	32,0
P(OEt)₃	13,8	100,0	100,0
Hedta	12,2	16,0	38,2

(*): pH = 5,0; T = 25 °C; 4 min de irradiação. C_{citocromo c} = $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Também foram testados os correspondentes sulfatos complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_4)(\text{isn})]^+$ e $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_4)(\text{nic})]^+$. Ambos não foram capazes de captar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Os aquo complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{2+}$, onde L = isn, imN e $\text{P}(\text{OEt})_3$, foram testados e de acordo com o esperado e mostraram-se incapazes de captar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Estes experimentos foram realizados utilizando o protocolo de medida utilizando xantina oxidase para a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ conforme descrito no item 3.5.

Conforme pôde ser observado na Tabela 8, o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$ foi o mais eficiente captador do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Pode-se correlacionar esta observação experimental com o potencial de redução do ligante nitrosil coordenado ao centro metálico de Ru(II). Este complexo apresenta o valor mais positivo de potencial de redução para o par NO^+/NO^0 na série de complexos estudados neste trabalho. No entanto, não foi possível se observar uma correlação direta, mas simplesmente uma tendência entre o potencial de redução do ligante NO e a porcentagem de captação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ para os demais nitrosilo complexos estudados conforme se observa na Figura 24.

Figura 24 – Gráfico da porcentagem de captação do radical superóxido versus o potencial de redução NO^+/NO^0 .

Os resultados até agora obtidos indicam fortemente que a reação entre o radical superóxido e os nitrosilo complexos deve ocorrer preferencialmente pela redução do ligante NO^+ .

4.4.2 – Estimativa da constante de velocidade entre o radical superóxido e os nitrosilo complexos de rutênio(II)

A constante de velocidade entre os nitrosilo complexos de rutênio e o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ser estimada utilizando uma expressão de constante de velocidade derivada para reações competitivas^[64,65]. Considerando que o conjunto de reações que ocorre no meio reacional seja o seguinte:

Reações 13 – 15 – Reações envolvidas na cinética de competição entre os nitrosilo complexos de rutênio(II) e o citocromo c pelo radical superóxido

Pode-se derivar^[64,65] a Equação 1 que correlaciona as constantes de velocidade de reação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ com os nitrosilo complexos e o citocromo c. Estas constantes podem ser relacionadas com as concentrações dos reagentes e a % de captação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ através da relação entre as absorbâncias do experimento de controle e do experimento contendo os nitrosilo complexos. Os valores de absorbância podem ser utilizados neste caso, pois a relação de absorbância entre o experimento de controle e o experimento contendo os nitrosilo complexos reflete diretamente as concentrações das espécies.

$$\left(\frac{\% \text{Cap}}{1 - \% \text{Cap}} \right) \times (k_1) \times C_{\text{cit-c}} = (k_2) \times C_{\text{RuNO}} \quad (1)$$

Onde: $\% \text{Cap} = \text{Abs}_{\text{reação}} / \text{Abs}_{\text{controle}}$

Equação 1 – Expressão derivada para a estimativa da constante de velocidade de reação dos nitrosilos complexos com o radical $\text{O}_2^{\cdot -}$. $\% \text{Cap}$ = porcentagem de captação do radical $\text{O}_2^{\cdot -}$; $C_{\text{cit-c}}$: concentração de citocromo c; C_{RuNO} : concentração do complexo. $T = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,0$. Abs: absorbância.

A constante de velocidade para a reação entre o citocromo c e o radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ tem seu valor relatado na literatura de $k_1 = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ($\text{pH} = 5,0$; $T = 25^\circ\text{C}$)^[59,86]. Para calcular a constante de velocidade de captação do radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ pelos nitrosilo complexos, foi plotado um gráfico de % de captação de $\text{O}_2^{\cdot -}$ *versus* a concentração dos nitrosilos complexos utilizada. Pela correlação linear encontrada, foi interpolado o valor onde a captação do radical é igual a 50%. Nesta condição, a relação ($\% \text{Cap} / 1 - \% \text{Cap}$) na Equação 1 se iguala a 1, podendo assim ser obtido o valor de k_2 . O valor da constante de velocidade específica k_2 entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ calculada como estando entre $5,0 \pm 1,0 \times 10^4$ e $4,2 \pm 0,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Foram obtidas boas correlações lineares para o gráfico % captação *vs.* concentração de nitrosilo para os complexos estudados. Porém a reta obtida não cruzou a origem, indicando que reações paralelas ocorrem durante as medidas. Uma das possibilidades é a dismutação do radical superóxido. Seu consumo via dismutação explicaria o coeficiente linear positivo obtido (Figura 25). Para o cálculo das constantes foram utilizadas 4 concentrações diferentes dos complexos listados na Tabela 8. A Figura 25 ilustra o gráfico obtido para o cálculo da constante de velocidade entre o radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$.

Figura 25 – Gráfico da captação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ versus a concentração do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$. (—): reta experimental; (—): reta teórica. k_2 é o valor da constante específica de velocidade obtida utilizando a Equação 1.

Este valor estimado de constante de velocidade específica encontrado é compatível com valores reportados na literatura^[5] (na ordem de 10^4 a $10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para complexos metálicos de Fe(II) $\{(e_g)^0 (t_{2g})^6\}$ e Mn(II) $\{(e_g)^0 (t_{2g})^3\}$ ^[13].

Uma possível explicação para a maior velocidade de reação entre o radical superóxido e o citocromo c se comparado aos nitrosilo complexos de rutênio pode estar relacionada ao potencial de redução em cada caso.

O potencial de oxidação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é de -0,60V, em pH = 5,0^[86]. Os potenciais de redução do ligante NO^+/NO^0 nos nitrosilo complexos variam entre -0,54 V e -0,11 V. Para o citocromo c, o potencial de redução do par Fe(III)/Fe(II) é de -0,01 V. Analisando a viabilidade termodinâmica das reações, podemos concluir que a reação entre o citocromo c e o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é termodinamicamente mais viável pelo maior valor de ΔE se comparado à reação entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Com respeito ao aspecto cinético, podemos relacionar o maior valor em módulo de ΔG com uma menor energia de ativação para a reação de transferência de elétrons, via relação linear de energia livre.

Foram calculadas as variações da energia livre de Gibbs e as constantes de equilíbrio para os complexos $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$ e $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)]^{3+}$ na reação com o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Os valores obtidos foram $-5,8 \text{ KJ mol}^{-1} / 10,4$ e $-41,5 \text{ KJ mol}^{-1} / 1,8 \times 10^7$ respectivamente. Para a reação entre o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o citocromo c, os valores de ΔG e K_{eq} são -57 KJ mol^{-1} e $9,8 \times 10^9$ respectivamente.

Desta forma, é coerente o resultado encontrado onde o valor da constante de velocidade específica de reação entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é inferior ao da constante de velocidade da reação entre o citocromo c e o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$.

4.4.3 – Liberação de NO^0 após a reação entre o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ e os nitrosilo complexos

Para verificar se a reação entre o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ e os nitrosilo complexos ocorre preferencialmente sobre o ligante NO^+ coordenado, gerando NO^0 que posteriormente pode ser liberado, a reação foi executada na presença de eletrodo seletivo à NO^0 .

A utilização da via fotoquímica para a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ é comprometida neste caso devido às dificuldades de um controle preciso da concentração de oxigênio dissolvida no meio reacional. Este fato dificulta a medida direta de NO^0 liberado, visto que as reações:

Reações 14 – 17 – Reações do NO^0 com oxigênio molecular

ocorrem no meio na presença de NO^0 e O_2 . Como a constante $k_{\text{global}} = 2,1 \pm 0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ é elevada^[87], a detecção de NO^0 via eletrodo seletivo ficaria impossibilitada pela resposta lenta que o eletrodo apresenta.

Portanto para a execução deste experimento foi utilizado para a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ o sistema xantina/xantina oxidase. Para a utilização da enzima xantina oxidase em meio contendo os nitrosilo complexos foram executados experimentos para verificar se a presença destes complexos poderia inibir a atividade desta enzima. Para tanto, foi monitorada espectrofotometricamente a formação de ácido úrico ($\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$), produto da reação entre a enzima e o substrato. A presença dos complexos supracitados não inibiu a produção de superóxido uma vez que foi detectada a formação de ácido úrico.

No entanto, a enzima xantina oxidase necessita de pH fisiológico (próximo a 7,2) para que possa converter o substrato com máxima eficiência. O complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4((\text{POEt})_3)]^{3+}$ que dentre as tetraminas estudadas apresenta a maior constante de liberação de NO^0 , e portanto seria ideal para este teste, não pode ser utilizado nesse modelo experimental. Isto porque esse complexo em pH fisiológico forma o nitrito complexo correspondente^[88] e também sofre ataque nucleofílico no ligante de fósforo pelos íons OH^- do meio.

Assim, para este experimento, foram utilizados os complexos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{isn})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$. Para o primeiro complexo, foi possível observar a liberação de NO^0 conforme ilustrado na Figura 26. Para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ a liberação de NO^0 pode ser observada mas como a constante de velocidade específica de liberação é muito baixa ($k_{\text{NO}} = 0,02 \text{ s}^{-1}$), a variação da corrente medida pelo eletrodo foi muito pequena, conforme ilustrado no gráfico menor na Figura 26. A diferença na escala de tempo entre os dois complexos é claramente visível. Para o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{isn})]^{3+}$ a variação na corrente começa a ocorrer em aproximadamente 40

segundos após a adição da enzima. Já para o complexo [Ru(NO)Hedta] essa variação ocorre somente 800 segundos após a adição da enzima e a variação da corrente observada é muito menor (aproximadamente 10 vezes) em relação ao observado para o complexo contendo isonicotinamida como ligante.

Figura 26 - Cronoamperometria utilizando eletrodo seletivo à NO^0 para monitoramento da reação entre o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{isn})]^{3+}$ e o radical $\text{O}_2^{\bullet}$. Gráfico menor: mesma reação com o complexo [Ru(NO)Hedta] (a): adição da enzima xantina oxidase. $C_{\text{Ru}} = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH = 7,2; T = 25°C.

A liberação de NO após a redução pelo superóxido também pode ser constatada através da formação da espécie [citc(FeII) – NO], conforme ilustra o gráfico da Figura 27. Para este experimento, foi utilizado excesso de nitrosilo de rutênio em relação ao citocromo c (150 vezes) e ao radical $\text{O}_2^{\bullet}$ (200 vezes) para favorecer somente a via de reação entre o citocromo c e o NO liberado.

Figura 27 – Reação entre o citocromo c e o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(imN)]³⁺ após a reação com O₂^{•-}. (---) controle; (—) C_{Ru} = 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; (—) C_{Ru} = 3,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. T = 25 °C; HTFA; pH = 5,0.

O espectro representado na Figura 27 em vermelho é característico do produto [citc(FeII) – NO], com λ_{max} em 525 e 560 nm^[89]. Também pode ser observado que o produto citc(FeII), proveniente da reação entre o radical O₂^{•-} (espectros em preto) não é observado, evidenciando o favorecimento da via de reação entre o citocromo c e o NO.

Esses experimentos, somados com os experimentos de captação de O₂^{•-} demonstrados no item 4.5.1 nos levam fortemente a acreditar que a reação entre o radical superóxido e o nitrosilo complexos ocorre sobre o ligante NO⁺, com posterior liberação no NO⁰.

4.4.4 – Sobre a formação de peroxinitrito (ONOO⁻)

Uma importante questão envolvendo o radical O₂^{•-} é a formação do íon peroxinitrito (ONOO⁻)^[8]. A liberação de NO⁰ em meios onde o radical O₂^{•-} está presente em excesso pode levar a formação do íon ONOO⁻, com constante de velocidade específica (k_p) próximas a 10⁸ M⁻¹ s⁻¹, espécie extremamente reativa conforme ilustrado na Reação 18^[29].

Reação 18 – Formação do íon peroxinitrito

Utilizando o modelo experimental enzimático, para a geração do radical $\text{O}_2^{\bullet}$ foram efetuados ensaios para se verificar a possibilidade de formação do íon ONOO^- , utilizando-se como sonda o radical tirosina. O íon ONOO^- pode reagir com a tirosina, gerando como produto a nitrotirosina^[90], que pode ser identificada via HPLC ou espectrometria de massas. Os testes realizados com os compostos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$, L = imN e isn, mostraram que não há a formação de peroxinitrito na escala de tempo utilizada no experimento.

Esta observação experimental pode estar relacionada com a constante de liberação de NO pelos nitrosilo complexos. Após a redução do ligante NO^+ coordenado a NO^0 , a liberação de NO é relativamente lenta frente ao tempo de meia vida do radical $\text{O}_2^{\bullet}$ em solução.

No entanto, é esperado que em situações onde a concentração de $\text{O}_2^{\bullet}$ é constante, exista a possibilidade de formação do íon ONOO^- após a liberação de NO pelos nitrosilo complexos. Esta reação poderia ocorrer após a redução do ligante NO pelo radical $\text{O}_2^{\bullet}$ ou mesmo por redutores biológicos.

Dados reportados na literatura^[91] indicam que esta seria uma das vias pelas quais o óxido nítrico poderia causar a morte de parasitas, como o *Trypanosoma cruzi*. A formação de peroxinitrito *in lócus* nas células do parasita poderia causar danos irreversíveis ao parasita, levando a sua morte.

4.4.5 – Considerações entre as reações entre o radical $O_2^{\cdot-}$ e os nitrosilo complexos de rutênio(II)

Analisando de forma conjunta os resultados obtidos podemos inferir que o radical superóxido age como redutor do nitrosil coordenado nos complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ implicando na liberação de NO⁰ por estes complexos. A julgar pela ordem de grandeza entre 10⁴ e 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ da constante de velocidade específica estimada para esta reação é muito provável que essa reação possa ser importante no meio fisiológico. Os nitrosilo complexos de rutênio têm sido utilizados como modelo de metalofarmaco em testes em culturas de células de câncer, leishmaniose e doença de Chagas com bons resultados. Nestes casos, há uma elevada concentração de radicais, principalmente $O_2^{\cdot-}$ caracterizando uma situação de estresse oxidativo. Neste aspecto, os complexos poderiam agir como captadores de $O_2^{\cdot-}$ e liberadores de NO, que como descrito anteriormente possui diversas funções fisiológicas. Portanto, a redução do NO⁺ coordenado poderia ocorrer não somente pela reação destes complexos por redutores químicos encontrados em altas concentrações em meio fisiológico (cisteína, ácido ascórbico, NADH), mas também pela ação do radical $O_2^{\cdot-}$.

O conjunto dos dados expostos nos itens anteriores nos permite algumas considerações:

Os potenciais de oxidação do centro metálico nos complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ encontram-se acima de 2,0V. Estes potenciais são muito positivos se comparados com outros compostos de rutênio(II) que não apresentam o nitrosil coordenado, mostrando de acordo com o fato deste ligante ser um forte ácido π . Os voltamogramas na região de 2,0V apresentaram características distintas dependendo do complexo utilizado nos experimentos, porém nenhum dos pares redox encontrados podem ser formalmente considerados como reversíveis.

Os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ não se mostraram ativos para a captação do radical DPPH[•], pois não são capazes de reagir pela via de transferência de elétrons (potencial de oxidação do centro metálico é muito positivo) e também não são capazes de reagir pela via de transferência de átomo de hidrogênio (H[•]). Portanto, os nitrosilo complexos não podem ser considerados como antioxidantes para modelos de radicais que são desativados por redução. No entanto, os aquo complexos mostraram-se capazes de captar o radical DPPH[•] pela oxidação do centro metálico.

A reação dos complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ e o radical hidroxila indica que estes complexos são capazes de captar este radical em meio aquoso. No entanto, o mecanismo pelo qual a reação se processa é bastante complexo. Foi possível identificar via RPE um intermediário de reação que indica a presença de NO⁰ coordenado ao centro metálico. Em relação ao estado de oxidação de centro metálico após as reações, não foi observada a presença de Ru(III) via RPE. Não foi possível utilizando o método de cinética de competição calcular a constante da reação, possivelmente pela presença de reações paralelas e consecutivas entre o radical OH[•] e os produtos da reação com os nitrosilo complexos. Porém,

a julgar pelos dados obtidos, estima-se de forma muito qualitativa que esta constante possa estar entre $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Os nitrosilo complexos também se mostraram capazes de captar o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, através da redução do ligante nitrosil coordenado. A liberação de NO após a reação foi monitorada via eletrodo seletivo à NO. A constante de velocidade para a reação foi calculada para a série de compostos utilizada, sendo que os valores estão na faixa de $1,0 \times 10^4$ a $4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Utilizando tirosina como sonda, não foi detectada a formação do íon peroxinitrito após a redução no ligante nitrosil coordenado pelo radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Os valores de constante de velocidade indicam que a reação entre os nitrosilo complexos e o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ poderia ter importância no meio fisiológico, visto que a reação é relativamente rápida e poderia captar o radical em meio acometido pelo estresse oxidativo.

1. LEFFLER, J.E. **An introduction to free radicals**. New York: John Wiley, 1993. p. 1-7.
2. IGNARO, L.J. **Nitric oxide: biology and pathobiology**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 38-65
3. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 291-380.
4. AHMAD, S. **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 2-27.
5. BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 245–313, 2007.
6. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C.; Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 214, p. 1-14, 1984.
7. CARLSEN, C.U.; MOLLER, J.K.S.; SKIBSTED, L.H. Heme-iron in lipid peroxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 485-498, 2005.
8. PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 37, p. 315-412, 2007.
9. MERKOFER, M.; KISSNER, R.; HIDER, R.C.; BRUNK, U.T.; KOPPENOL, W.H. Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: electrochemistry and kinetics. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 10, p. 1263-1269, 2006.
10. KOPPENOL, W. H.; LIEBMAN, J. F. The oxidizing nature of the hydroxyl radical. A comparison with the ferryl ion (FeO_2^+). **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 99-101, 1984.
11. BENEDET, J.A.; SHIBAMOTO, T. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v. 107, p. 165–168, 2008.
12. DUNFORD, H.A. Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 311-318, 2002.
13. AFANAS'EV, I.B. **Superoxide ion: chemistry and biological implications**. Boca Raton: CRC, 1989. v.1
14. SAWYER, D.T.; VALENTINE, J.S. How super is superoxide. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, p. 393-400, 1981.
15. ZANICHELLI, P.G.; ESTRELA, H.F.G.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; GRACI-KASSISSE, D.M.; FRANCO, D.W. The effects of ruthenium tetramine compounds on vascular smooth muscle. **Nitric Oxide Biology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 189-196, 2007.
16. SAYRE, L.M.; PERRY, G.; SMITH, M.A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 172–18, 2008.

17. ZANA, M.; JANKA, Z.; KALMAN, J. Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 648–676, 2007.
18. IGNARRO, L.J. Endothelium-derived nitric oxide – actions and properties. **FASEB Journal**, v. 3, p. 31-36, 1989.
19. WINK, D.A.; MITCHEL, J.B. Nitric oxide and cancer: an introduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 8, p. 951-954, 2003.
20. MOREIRA, P.I.; NUNOMURA, A.; NAKAMURA, M.; TAKEDA, A.; SHENK, J.C.; ALIEV, G.; SMITH, M.A.; PERRY, G. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 1493–1505, 2008.
21. LEE, I.K.; JANG, Y.W.; YU, S.H.; YUN, B.S. New triterpene glucosides, oligoporins A–C, from oligoporus tephroleucus protect DNA from Fenton reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 4906–4909, 2007.
22. FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 9, p. 239-247, 2000.
23. Chun, O.K.; Kim, D.; Lee, C.Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 8067-8072, 2003.
24. MCCLEVERTY, J.A. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 403-418, 2004.
25. PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.
26. BARROS, B. F.; TOLEDO JR, J.C.; FRANCO, D.W.; TFOUNI, E.; KRIEGER, M.H. A new inorganic vasodilator, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃: hypotensive effect of endothelium-dependent and -independent vasodilators in different hypertensive animals models. **Nitric Oxide Biology and Chemistry**, v. 7, p. 50, 2002.
27. SILVA, J.J.N.; OSAKABE, A.L.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.N.; FRANCO, D.W. In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 112-121, 2007.
28. NUNOSHIBA, T.; DeROJAS-WALKER, T.; TANENBAUM, S.R.; DEMPLER, B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against macrophages. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 90, p. 9993-9997, 1993.
29. WINK, D.A.; MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; PLUTA, R.M.; HEWETT, S.J.; COLTON, C. VITEK, M.; FEELISCH, M.; GRISHAM, M.B. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, n. 2, p. 203-213, 2001.
30. KIM, Y.M.; BERGONIA, H.; LANCASTER, J. Jr. Nitrogen-oxide induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. **FEBS Letters**, v. 374, p. 288-232, 1995.

31. TOLEDO, J.C.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Mutual effects in the chemical properties of the ruthenium metal center and ancillary ligands upon coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 419-431, 2005.
32. TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.R.; FRANCO, D.W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 57-69, 2003.
33. LANCASTER JUNIOR, J. **Nitric oxide: principles and actions**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 37-46.
34. MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, p. 237-240, 2000.
35. MIRANDA, K.M. The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 433-455, 2005.
36. RIDNOUR, L.A.; THOMAS, D.D.; SWITZER, C.; FLORES-SANTANA, W.; ISENBERG, J.S.; AMBS, S.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in câncer. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 73-76, 2008.
37. FUKUTO, J.M.; BARTBERGER, M.D.; DUTTON, A.S.; PAOLOCCI, N.; WINK, D.A.; HOUK, K.N. The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, p. 790-801, 2005.
38. OLABE, J.A. The coordination chemistry of nitrosyl in cyanoferrates: an exhibit of bioinorganic relevant reactions. **Dalton Transactions**, v. 28, p. 3633-3648, 2008.
39. CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 209-233, 2003.
40. SAKURAI, H.; KOJIMA, Y.; YOSHIKAWA, Y.; KAWABE, K.; YASUI, H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 226 p. 187-198, 2002.
41. RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; VAN DEN BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-*trans*-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 3717-3727, 2004.
42. SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W.; SALAZAR GUTIERREZ, F.R ; LIMA, F. C. A.; SILVA, F.B.A; SILVA, J. S.; FRANCO, D W . Complexation of the anti-trypanosoma cruzi drug benznidazole improves solubility and efficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 4104-4114, 2008.

43. PEREIRA, J. C. M.; Carregaro, V.; COSTA, D. L.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q.; FRANCO, D. W. Antileishmanial effect of ruthenium NO-donors. In: BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY, 14., 2008, Foz do Iguaçu. **Livro de Resumos...** Foz do Iguaçu: Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2008. ref. OL-12.
44. VALDEZ, C.A.; SAAVEDRA, J.E.; SHOWALTER, B.M.; DAVIES, K.M.; WILDE, T.C.; CITRO, M.L.; BARCHI JUNIOR., J.J.; DESCHAMPS, J.R.; PARRISH, D.; EL-GAYAR, S.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C.; KEEFER, L.K. Hydrolytic reactivity trends among potential prodrugs of the O₂-glycosylated diazeniumdiolate family. targeting nitric oxide to macrophages for antileishmanial activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 3961-3970, 2008.
45. TOLEDO JUNIOR, J. C.; SILVA, H.A.S.; SCARPELLINI, M.; MORI, V.; CAMARGO, A.J.; BERTOTTI, M.; FRANCO, D.W. Ruthenium tetraammines as a model of nitric oxide donor compounds. **European Journal Of Inorganic Chemistry**, p. 1879-1885, 2004.
46. BORGES, S.S.S.; DAVANZO, C.U.; CASTELLANO, E.E.; SCHPECTOR, J.Z.; SILVA, S.C.; FRANCO, D.W. Ruthenium nitrosyl complexes with N-Heterocyclic ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, p. 2670-2677, 1998.
47. STEFANELI, E.V. **Sobre a redução do óxido nítrico em complexos de tetraaminas de rutênio (II)**. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
48. MIRANDA, K.M. The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 433-455, 2005.
49. PERRIN, D.D.; ALMARGE, W.L.; PERRIN, D.P. **Purification of laboratory chemicals**. New York: Pergamon Press. New York, 1983. p. 56
50. SHRIVER, D. F.; Drezdzon, M.A. **The manipulation of air-sensitive compounds**. New York : Wiley, 1986. p. 22-57.
51. ISIED, S.; TAUBE, H. Effects of SO₂, HSO₃⁻ and SO₃⁻ as auxiliary ligands on the reactivity of ammineruthenium(II)-ligands bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 1545-1551, 1974.
52. LOPES, L.G.F.; CASTELLANO, E.E.; FERREIRA, A.G.; DAVANZO, C.U.; CLARKE, M.J.; FRANCO, D.W. Reactivity of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]X₃ (X = PF₆⁻, CF₃COO⁻): modulation of release of NO by trans-effect. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 2883-2890, 2005.
53. FRANCO, D.W.; TAUBE, H. Triethyl phosphite as a ligand on ruthenium (II). **Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 571-577, 1978.
54. BAJAJ, H. C; VAN ELDIK, R. Kinetics and mechanism of the ligand substitution reactions of ethylenediaminetetraacetate complexes of ruthenium(III) in aqueous solution. **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 4052-4055, 1988.

55. DIAMANTIS, A. A.; DUBRAWSKY, J. V. Preparation and structure of ethylenediaminetetraacetate complexes of ruthenium(II) with dinitrogen, carbon monoxide, and other p-acceptor ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 20, p. 1142-1150, 1981.
56. VOGT JR, L.H.; KATZ, J.L.; WIBERLEY, S.E. The crystal and molecular structure of ruthenium-sulfur dioxide coordination compounds. i. chlorotetraammine (sulfur dioxide) ruthenium(ii) chloride. **Inorganic Chemistry**, v. 4, p. 1157-1163, 1965.
57. CARDOSO, D.R.; FREDERIKSEN, A.M.; SILVA, A.A.; FRANCO, D.W.; SKIBSTED, L.H. Sugarcane spirit extracts of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity. **European Food Research Technology**, v. 1, p. 1-2, 2008.
58. LIXING, L.; ABE, Y.; KANAGAWA, K.; SHOJI, T.; MASHINO, T.; MOCHIZUKI, M.; TANAKA, M.; MIYATA, N. Iron-chelating agents never suppress Fenton reaction but participate in quenching spin-trapped radicals. **Analytica Chimica Acta**, v. 599, p. 315-319, 2007.
59. ROSEN, G.M.; BRITIGAN, B.E.; HALPEN, H.J.; POU, S. **Free radicals: biology and detection by spin trapping**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 122-167.
60. BERR, D. **A step-by-step procedure for spin trapping the hydroxyl radical**. Billerica: Bruker Instruments Inc. EPR division, 2005. 4 p. (Relatório Técnico).
61. ROUBAUD, V.; SANKARAPANDI, S.; KUPPUSAMY, P.; TORDO, P.; ZWEIER, J.L. Quantitative measurement of superoxide generation using the spin trap 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-*n*-oxide. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 404-411, 1997.
62. CARLOS, R.M.; FERRO, A.A.; SILVA, H.A.S.; GOMES, M.G.; BORGES, S.S.S.; FORD, P.C.; TFOUNI, E.; FRANCO, D.W. Photochemical reactions of *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄(L)]³⁺ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, p. 1381-1388, 2004.
63. ESPEY, M.G.; THOMAS, D.D.; MIRANDA, K.M.; WINK, D.A. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 17, p. 11127-11132 2002.
64. OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; MUNHOZ, D.C.; NETTO, L.E.S.; AUGUSTO, O; Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 326-334, 2007.
65. BALK, J.M.; BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M. Evaluation of the accuracy of antioxidant competition assays. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 135-144, 2009.
66. SIEGER, M.; SARKAR, B.; ZÁLIŠ, S.; FIEDLER, J.; ESCOLA, N.; DOCTOROVICH, F.; OLABE, J.A.; KAIM, W. Establishing the NO oxidation state in complexes [Cl₅(NO)M]ⁿ⁻, M = Ru or Ir, through experiments and DFT calculations. **Dalton Transactions**, p. 1797-1 800, 2000.

67. BOCKRIS, J. O. **Modern electrochemistry**: fundamentals of electrochemistry. New York: Academic Press, 2000. v.2A
68. KAPALKA, A.; FÓTI, G.; COMNINELLIS, C. Investigations of electrochemical oxygen transfer reaction on boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 1954–1961, 2007.
69. OLIVEIRA JUNIOR, R.T.S.; SALAZAR-BANDA, G.R.; SANTOS, M.C.; CALEGARO, M.L.; MIWA, D.W.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Electrochemical oxidation of benzene on boron-doped diamond electrodes. **Chemosphere**, v. 66, p. 2152-2158, 2007.
70. KAPALKA, A.; FÓTI, G.; COMNINELLIS, C. The importance of electrode material in environmental electrochemistry formation and reactivity of free hydroxyl radicals on boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 7, p. 2018-2023, 2009.
71. NASCIMENTO FILHO, J.C.; FRANCO, D.W. Isonicotinamide as entering ligand on *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OR)₃(H₂O)]²⁺, (R= Me, Pr, iPr and Bu). **Inorganica Chimica Acta**, v. 113, p. 55-60, 1986.
72. MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; RUMENJAK, V.; GRABARIC, B. Use of DPPH[•]/DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity. **Electroanalysis**, v. 17, n. 20, p. 1847-1853, 2005.
73. YORDANOV, N.D.; CHRISTOVA, A.G.; Quantitative spectrophotometric and EPR determination of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 358, p. 610-613, 1997.
74. LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, p. 222-230, 2007.
75. VLEESCHOUWER, F.; SPEYBROECK, V.V.; WAROQUIER, M.; GEERLINGS, P.; PROFT, F. Electrophilicity and nucleophilicity index for radicals. **Organic Letters**, v. 9, p. 2721 – 2724, 2007.
76. METZKER, G.; TOLEDO JUNIOR, J. C.; MAGALHÃES, A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Hydrolysis of *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃: NO as an activation agent for nucleophilic attack. In: BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY, 14., 2008, Foz do Iguaçu. **Livro de Resumos...** Foz de Iguaçu: Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2008. ref. PB-29.
77. TOLEDO JUNIOR, J.C. **Aspectos da reatividade de complexos de rutênio contendo óxido nítrico como ligante**. 2004. 119f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
78. SCHAFER, K.; ASMUS, K-D. Phosphite radicals and their reactions: examples of redox, substitution and addition reactions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 84, p. 2156-2160, 1980.

79. MAZZETO, S.E.; RODRIGUES, E.; FRANCO, D.W. Synthesis, characterization and reactivity of *trans*-[Ru(NH₃)₄(P(OEt)₃)₂]³⁺ ions. **Polyhedron**, v. 12, n. 8, p. 971-975, 1993.
80. BAXENDALE, J.H.; RODGERS, M.A.J.; WARD, M.D. Radiolysis of aqueous solution of ruthenium(III) hexa-ammine chloro-penta-ammine. **Journal of Chemical Society (A)**, p. 1246-1250, 1970.
81. FERRO, A.A.; TFOUNI, E.; BEZERRA, C.W.B.; BAGATIN, I.; FRANCO, D.W.; MCGARVEY, B.R. Detection of the EPR Spectra of NO in ruthenium(II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 39, p. 3577-3581, 2000.
82. SILVA, H. A. S.; MCGARVEY, B. R.; SANTOS, R. H. A.; BERTOTTI, M.; MORI, V.; FRANCO, D. W. Sulfate as a ligand in ruthenium (II) and (III) ammines. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 79, p. 679-687, 2001.
83. WEIL, J.A.; BOLTON, J.R. **Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications**. New York: John Wiley, 1999. p. 34-76.
84. OHIGASHI, H.; KURITA, Y. Electron spin resonance of V_k centers, radical pairs, and NO trapped in X-irradiated single crystals of NH₃OHCl. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 24, p. 654. 1968.
85. CHEN, Y.; LIN, F.T.; SHEPHERD, R.E. ¹⁵N NMR and electrochemical studies of [Ru^{II}(Hedta)]⁻ complexes of NO, NO⁺, NO₂⁻, and NO⁻. **Inorganic Chemistry**, v. 38, p. 973-983, 1999.
86. CRILLY, S.; MAGNER, E. Reversible increase in the redox potential of cytochrome c in methanol. **Chemical Communications**, n. 8, p. 535-537, 2009.
87. LEWIS, R.S.; DEEN, W.M. Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions. **Chemical Research Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 568-574, 1994.
88. OSTI, R.Z.; FRANCO, D.W. Aspects of nitrite association with *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄P(OEt)₃]²⁺. **Polyhedron**, v. 26, p. 4746-4750, 2007.
89. SHARPE, M.A.; COOPER, C.R. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. **Biochemical Journal**, v. 332, p. 9-19, 1998.
90. KRAINEV, A.G.; WILLIAMS, T.D.; BIGELOW, D.J. Enzymatic reduction of 3-nitrotyrosine generates superoxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 495-502, 1998.
91. DENICOLA, A.; RUBBO, H.; RODRIGUEZ, D.; RADI, R.; Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to trypanosoma cruzi. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 304, p. 279-286, 1993.

Apêndice I

Assumindo-se que as reações abaixo (1 e 2) como os processos cineticamente majoritários durante o processo de captação do radical superóxido:

Podemos resumir as seguintes equações de velocidade para o consumo do radical superóxido:

$$-\frac{d[\text{O}_2^{\bullet}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{Cit C (Fe(III))}] \cdot [\text{O}_2^{\bullet}] \quad (3)$$

$$-\frac{d[\text{O}_2^{\bullet}]}{dt} = k_2 \cdot [\text{Ru(NO)}] \cdot [\text{O}_2^{\bullet}] \quad (4)$$

Quando a captação do íon superóxido pelos nitrosilo complexos é igual a 50% (IC₅₀ – concentração inibitória de 50%) temos as velocidades de consumo do íon superóxido iguais para as equações de velocidade 3 e 4. Portanto, podemos escrever a seguinte equação que expressa a relação entre k₁ e k₂.

$$\left(\frac{\% \text{Cap}}{1 - \% \text{Cap}} \right) \times (k_1) \times C_{\text{cit-c}} = (k_2) \times C_{\text{RuNO}}$$

$$\text{Onde: } \% \text{Cap} = \text{Abs}_{\text{reação}} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Assim, a porcentagem de captação é obtida através das absorbâncias do experimento de controle (Abs_{controle}) e de experimentos variando-se a concentração analítica dos nitrosilo complexos. Para se obter o IC₅₀ lança-se um gráfico de porcentagem de captação do radical versus concentração do nitrosilo complexo utilizada, conforme mostra a Figura 25. O valor de IC₅₀ é obtido por interpolação da curva. Calcula-se assim o valor de k₂.

Apêndice II

Valores de potencial de redução ($E_{\text{NO}^+/\text{NO}}$) e constante específica de liberação de NO (k_{NO}) para os nitrosilo complexos de rutênio(II).

Complexo	k_{NO} (s^{-1})	$E_{\text{NO}^+/\text{NO}}$ (V vs. ECS)
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (imN)] ³⁺	0,160	-0,36
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (4-pic)] ³⁺	0,090	-0,25
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (py)] ³⁺	0,060	-0,23
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	0,987	-0,11
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (isn)] ³⁺	0,043	-0,38
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (nic)] ³⁺	0,025	-0,31
[Ru(NO)Hedta]	0,020	-0,54