Antonio Carlos Roveda Júnior

**Reatividade química de um novo nitrosilsulfito complexo
trans-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆), e desenvolvimento de
filmes de amido doadores de óxido nítrico**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica
Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

São Carlos

Dezembro de 2015

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Maria e Antonio, que sempre me incentivaram a persistir na vida, e me mostraram que o estudo é o melhor caminho.

À Daniely Gomes, pelo amor, carinho, incentivo e ao fato de permanecer ao meu lado em todos os momentos, mantendo-se serena e paciente durante a elaboração desta tese.

Aos meus familiares mais próximos, Márcia, Thamis, Agmar, Thiago, Higor, Olinda, Maria e Adilson, que sempre compreenderam a minha constante ausência no convívio familiar, muito em virtude dos estudos.

Aos amigos que estiveram ao meu lado durante boa parte da minha estadia em São Carlos, André (Barbie), Rodrigo (Nenê) e Augusto (Tanga).

Agradecimentos

A Deus por ter me dado esta oportunidade de evoluir intelectualmente, e saúde para alcançar os objetivos.

Ao Prof. Douglas W. Franco pela oportunidade de trabalho, pela orientação, amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa, Gustavo, Inara, Daniela e Clayston, pelo incentivo, apoio e pelas valiosas discussões durante todo o trabalho; e em especial ao Maykon e ao Augusto pela amizade, e por terem me auxiliado principalmente nos cálculos computacionais.

Ao Thiago Abrahão pela amizade, auxílio nos experimentos, pelas valiosas discussões e por sempre questionar o meu trabalho de forma muito construtiva.

Aos Profs. Drs. Daniel Rodrigues, Benedito dos Santos Lima Neto, e Rose Maria Carlos, pela amizade e pelas discussões científicas e não-científicas.

À Prof. Katrina M. Miranda, pelos conselhos e auxílio no meu desenvolvimento científico.

À Dra. Helena F. Aguiar e à Prof. Dra. Carmen Tadini, e à Dra. Cristina Setim e Prof. Dr. Fernando Q. Cunha, com quem mantive estreita parceria.

Aos amigos do Laboratório de Química Inorgânica e Analítica e do Laboratório da Química da Aguardente por fazerem parte da minha família aqui em São Carlos e por terem me aturado sempre com bom humor e companheirismo nessa longa jornada, tornando o laboratório a minha segunda casa.

Aos técnicos da CAQI, Sylvana, Carlinhos, Márcio, André, Aldimar e Paulo, pela amizade e pelos serviços prestados.

À Veroneide, Vanessa, Gislei e Cláudia pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar em tudo.

À Ivonete e à Silmara pela amizade e pela conversa sempre amiga.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, biblioteca, oficina mecânica, eletrônica, informática, vidraria, aos motoristas e aos seguranças pela amizade e pelos serviços prestados.

Á Bernadete, pela sua boa companhia e conversa amiga, e por sempre ter torcido por mim.

A todos os amigos e companheiros da época de república em São Carlos e em Rio Preto.

Às agências de fomento CNPq, Capes e FAPESP pelo auxílio financeiro.

*"Eu não me envergonho de corrigir meus erros e mudar as opiniões,
porque não me envergonho de raciocinar e aprender."*

Alexandre Herculano

Apresentação

Esta tese é composta por dois tópicos principais relacionados à química de nitrosilo complexos de rutênio. O primeiro deles trata do desenvolvimento de um novo material doador de óxido nítrico. Esse material foi produzido a partir da incorporação do nitrosilo complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)NO⁺](BF₄)₃ em filmes à base de amido de mandioca. Foram realizados estudos da liberação de NO desencadeada por meio de redução química (reação com cisteína) e também por fotólise. O segundo tópico trata da síntese de um novo nitrosilsulfito complexo de rutênio, *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) (isn = isonicotinamida), sintetizado a partir da reação entre o ânion sulfito (SO₃²⁻) com o nitrosilo complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)NO⁺](BF₄)₃. Foram realizados estudos de reatividade química e fotoquímica desse novo complexo.

Em virtude do exposto, e objetivando-se uma leitura mais clara, este trabalho será descrito com a seguinte sequência:

- *Resumo e Abstract da parte I;*

- *Lista de Figuras – Parte I*

- *Lista de Tabelas – Parte I*

- *Lista de abreviações – Parte I*

- *Sumário – Parte I*

- *Introdução geral*

Parte I

- *Introdução Específica;*

- *Objetivos e Justificativa;*

- *Material e Métodos;*

- *Resultados e Discussões;*

- *Conclusão e perspectivas.*

- *Referências Parte I*

Parte II

- *Resumo e Abstract da parte II;*

- *Lista de Figuras – Parte II*

- *Lista de Tabelas – Parte II*

- *Lista de abreviações – Parte II*

- *Sumário – Parte II*

- *Introdução Específica;*

- *Objetivos e Justificativa;*

- *Material e Métodos;*

- *Resultados e Discussões;*

- *Conclusão e perspectivas.*

- *Referências Parte II*

- *Anexos Parte II*

Resumo da parte I

Na busca por novos materiais doadores de óxido nítrico (NO), o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um filme à base de amido de mandioca, no qual foi incorporado um nitrosilo complexo de rutênio, e o estudo da liberação de NO nesse material. O nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)NO](BF₄)₃ (**RuNOisn**; isn = isonicotinamida) apresenta a propriedade de liberar NO de forma controlada, por meio de fotólise ($\lambda_{irr} = 310\text{--}370$ nm) e de redução química. A incorporação desse complexo em filmes de amido foi realizada em condições brandas, resultando em um novo material para o armazenamento e liberação de NO, designado como **CS_x-RuNOisn**. Os ensaios espectroscópicos indicaram que a esfera de coordenação do complexo **RuNOisn** permaneceu inalterada durante a produção dos filmes. A exposição de **CS_x-RuNOisn** à luz ($\lambda_{irr} = 355$ nm) levou à liberação de NO e provavelmente à formação do fotoproduto *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄isn(H₂O)]³⁺ no filme. A reação desse aquo-complexo de rutênio(III) com solução aquosa contendo nitrito de sódio regenerou o complexo de partida, **RuNOisn**. A identificação e quantificação do NO liberado durante a fotólise foi efetuada por meio da reação com oximioglobina. Durante o tempo de irradiação de 17 minutos, foram liberados $5,02 \pm 0,12$ μM de NO ($10,04 \pm 0,24$ nmol NO em 2 mL). Os ensaios de liberação de NO desencadeada por redução foram realizados utilizando-se *L*-cisteína como redutor. O fluxo de NO liberado a partir da reação com cisteína perdurou por mais de 7 horas, alcançando-se concentrações fisiologicamente relevantes, com fluxo médio de $1,9$ pmol NO s⁻¹ cm⁻² de filme. Esse valor é comparável àquele produzido por células endoteliais, em que o fluxo de NO é de $1,67$ pmol s⁻¹ cm⁻². Os resultados preliminares de degradação dos filmes *in vivo* sugerem que o material foi degradado pelo organismo em 30 dias. Todos os resultados alcançados sugerem que o filme **CS_x-RuNOisn** é um candidato promissor para aplicações em meio biológico.

Abstract, Section I

Aiming the production of new nitric oxide releasing materials (NORM), this work reports the development of a cassava starch based film, in which a ruthenium nitrosyl complex was impregnated, and evaluate the NO release from this film. Ruthenium nitrosyl complex *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)NO](BF₄)₃ (**RuNOisn**; isn = isonicotinamide) is able to release NO in a controlled manner through both photolysis ($\lambda_{irr} = 310\text{--}370$ nm) and chemical reduction. The incorporation of such complex into the starch-based films was performed under mild conditions, yielding a new material able to store and release NO, abbreviated as **CS_x-RuNOisn**. Spectroscopic analysis of **CS_x-RuNOisn** indicated that the coordination sphere of RuNOisn remained intact during film production. Exposure of **CS_x-RuNOisn** to long wave UV-light ($\lambda_{irr} = 355$ nm) leads to NO release and likely to the formation of the paramagnetic photoproduct *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄isn(H₂O)]³⁺ in the film. Reaction of this aquoruthenium(III) complex with aqueous nitrite regenerates **RuNOisn** in the film. Delivery of NO upon photolysis of **CS_x-RuNOisn** was verified and quantified by trapping with oxymyoglobin. The calculated concentration of NO released from the film was 5.02 ± 0.12 μM (10.04 ± 0.24 nmol NO in a 2 mL) after approximately 17 min of irradiation (500 laser pulses at 2 s intervals). Moreover, NO release upon chemical reduction was carried out using L-cysteine as a reductant. Cysteine-mediated NO delivery from **CS_x-RuNOisn** persisted for more than 7 h, during which physiologically relevant NO concentrations were liberated (average flux of 1.9 pmol NO s⁻¹cm⁻² of film). This value is comparable to that produced by endothelial cells (1.67 pmol s⁻¹ cm⁻²). Preliminary results about the biodegradation of the films *in vivo* suggest that the films were completely absorbed by the organism in a period of 30 days. These results suggest that **CS_x-RuNOisn** is a promising candidate for use in biological applications.

LISTA DE FIGURAS – PARTE I

Figura 1. Produção de NO via oxidação de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina (L-cit).....	3
Figura 2. Diagrama simplificado do orbital molecular do NO.....	4
Figura 3. Óxido nítrico e espécies redox relacionadas.....	5
Figura 4. Resumo das principais reações do NO com potencial biológico significativo.....	6
Figura 5. Doadores de NO. Espécies representativas de (a) nitrosilo metálicos, (b) nitratos orgânicos, (c) S-nitrosotióis e (d) diazeniodiolatos.	6
Figura 6. Representação simplificada dos orbitais moleculares envolvidos na ligação $d_{\pi}-\pi^*$ entre metais (M) e o NO.....	7
Figura 7. Comparação entre os ângulos de ligação das espécies (A) $\text{NO}_2^{(+1, 0, -1)}$ e (B) em nitrosilos metálicos M–N–O.	9
Figura 8. Estrutura molecular do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO})\text{Cl}(\text{PPh}_3)_2]^+$	10
Figura 9. Representação simplificada dos orbitais moleculares envolvidos na ligação M–NO linear (NO^+), intermediária (NO) e angular (NO^-).....	10
Figura 10. Faixa observada para a frequência de estiramento do NO (ν_{NO} , em cm^{-1}) e para o deslocamento químico (δ , em ppm, para ^{15}NO) em nitrosilo complexos.....	11
Figura 11. Exemplos representativos de compostos doadores de NO.	15
Figura 12. Dispositivo para a aplicação de NO gasoso na cicatrização de úlcera: (A) cilindro de NO, e (B) sistema para aplicação do NO gasoso.	16
Figura 13. Estrutura molecular do amido: amilose e amilopectina.	19
Figura 14. Filmes formulados com amido, glicerol e água.	19
Figura 15. Representação simplificada das estruturas da amilose, amilopectina e glicogênio.	20
Figura 16. Estrutura das tetraaminas de rutênio com o ligante nitrosônio (NO^+) e também do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{hedta})]$. L = ligantes N-heterocíclicos ou ésteres de fósforo	21
Figura 17. Rota sintética para a obtenção do nitrosilo complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}^+)](\text{BF}_4)_3$	25
Figura 18. Eletrodo impresso DS 110 (<i>screen printed electrodes</i>) utilizado nos ensaios eletroquímicos com os filmes de amido.....	28
Figura 19. Representação simplificada do equipamento NOA utilizado para a detecção e quantificação de NO^{109}	29
Figura 20. Espectros de infravermelho para o amido nativo e modificado com 15% de trimetafosfato de sódio (STMP).	31
Figura 21. Ilustração simplificada da curva de Tensão-deformação para os ensaios mecânicos realizados com os filmes de amido.	33
Figura 22. (A) Equipamento utilizado nos ensaios de permeabilidade ao vapor de água. Cápsula metálica contendo a amostras de filme e preenchidas com sílica (B) e vazias (C).	34
Figura 23. Representação esquemática do equipamento utilizado nos ensaios de permeabilidade ao oxigênio.....	35
Figura 24. Cella utilizada durante a fotólise dos filmes de amido e na obtenção dos espectros vibracionais.	37
Figura 25. Fotos do filme de amido (A) sem e (B) com a presença do complexo RuNOisn imobilizado.....	41
Figura 26. Degradação <i>in vitro</i> dos filmes produzidos com (a) amido modificado (STMP) e (b) amido nativo. Condições experimentais: amostras de 2,5 cm × 2,5 cm ($n = 4$ para cada dia) de filmes	

de amido imersos em 80 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4, 30mM, μ = 180 mM NaCl, a 37 °C).	42
Figura 27. Espectros eletrônicos do filme CS₅-RuNOisn e do complexo RuNOisn . Condições experimentais: filme seco, e complexo RuNOisn em solução aquosa pH 2,0, μ = 0,10 M CF ₃ COOH/CF ₃ COONa. A figura inserida mostra a estrutura do nitrosilo complexo de rutênio RuNOisn .	44
Figura 28. Espectros de infravermelho do filme CS_x-RuNOisn incorporado com diferentes concentrações de RuNOisn imobilizado/filme. As concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 50 μ mol RuNOisn /filme são representadas respectivamente pelas letras de “a” a “f”. A figura inserida representa a correlação entre a concentração de RuNOisn /filme vs. a absorbância do ν_{NO} , R^2 = 0,9905.	45
Figura 29. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise do (A) filme CS_x-RuNOisn e do (B) complexo RuNOisn em solução aquosa (pH 2,0, μ = 0,10 M CF ₃ COOH/CF ₃ COONa). As figuras inseridas mostram o espectro eletrônico na região de 300-700nm. Condições: λ_{irr} = 355 nm; 5mJ/pulso.	47
Figura 30. Espectros de EPR obtidos após a fotólise (a) do filme CS₅₀-RuNOisn e (b) do complexo RuNOisn em solução aquosa (pH 2,0, μ = 0,10 M CF ₃ COOH/CF ₃ COONa), ambos adquiridos a T = 77 K.	48
Figura 31. Espectros de EPR obtidos para diferentes formulações do filme CS₅₀-RuNOisn fotolisado: (a) filme triturado e (b) filme não-triturado, ambos adquiridos a T = 77 K.	48
Figura 32. Voltamogramas cíclicos do filme CS₅₀-RuNOisn obtidos antes e após a fotólise. Condições experimentais: solução aquosa, pH 2,0, μ = 0,10 M CF ₃ COOH/CF ₃ COONa.	49
Figura 33. Alterações no espectro de IV durante a fotólise do filme CS₅₀-RuNOisn . A figura inserida mostra as mudanças na absorbância em 1935 cm ⁻¹ durante a fotólise. Condições experimentais: λ_{irr} = 355 nm, 5mJ/pulso.	50
Figura 34. Alterações no espectro de IV durante a fotólise do filme de amido incorporado com o complexo marcado com ¹⁵ N, <i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ (isn)(¹⁵ NO ⁺)] ³⁺ . Condições experimentais: λ_{irr} = 355 nm, 5mJ/pulso.	51
Figura 35. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise de uma solução contendo oxiMb e CS₅-RuNOisn : (a) oxiMb (traço em vermelho) e (b) metMb (traço em azul). A figura inserida mostra as alterações da absorbância em 410 nm durante a fotólise. Condições: 1cm ² de filme CS₅-RuNOisn e 5,4 μ M de oxiMb em solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM); λ_{irr} = 355 nm, 5mJ/pulso, 500 pulsos de laser (um pulso a cada 2 s); T = 2 °C, n = 3.	52
Figura 36. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise de uma solução contendo oxiMb e uma amostra de filme de amido (1cm ²) sem complexo de rutênio imobilizado. Condições experimentais: 5,8 μ M de oxiMb em solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM); λ_{irr} = 355 nm, 5mJ/pulso, 1000 pulsos de laser (um pulso a cada 2 s); T = 2 °C.	53
Figura 37. (A) Regeneração do filme CS₅₀-RuNOisn após a fotólise e reação com solução de nitrito (1,0 mM): (I) área fotolisada do filme; (II) adição da solução aquosa de NO ₂ ⁻ ; (III) 15 min após a adição da solução de NO ₂ ⁻ . (B) Espectro vibracional do filme CS₅₀-RuNOisn : (a) antes da fotólise, (b) após a fotólise e (c) após a reação com nitrito.	54
Figura 38. (A) Alterações no espectro vibracional durante o segundo ciclo de fotólise do filme CS₅₀-RuNOisn (λ_{irr} = 355 nm, 5 mJ/pulso). A figura inserida mostra a alteração na absorbância em 1935 cm ⁻¹ durante a fotólise. (B) Segunda regeneração do filme CS₅₀-RuNOisn após a reação com solução de nitrito (1,0 mM).	55
Figura 39. Curva de liberação de NO desencadeada pela reação com cisteína: perfil de liberação de NO vs. tempo, para uma amostra (A) de 1cm ² do filme CS₅₀-RuNOisn e (B) 1,77 μ mol de RuNOisn .	

Total de NO liberado (acumulado) em função do tempo para (C) 1cm ² do filme CS₅₀-RuNOisn e (D) 1,77 μmol de RuNOisn . Condições experimentais: tampão TRIS 0,150 M, 5 mM EDTA, pH 7,4, a 37 °C.	58
Figura 40. Perfil de liberação do complexo RuNOisn a partir dos filmes de amido. Condições experimentais: amostras de 2cm ² de CS₅₀-RuNOisn imersas em 2 mL de solução aquosa, pH 5,0 (CF ₃ COOH/CF ₃ COONa) a 37 °C.....	61
Figura 41. Imagens obtidas por microscopia ótica dos filmes de amido implantados no dorso dos ratos: filme sem o complexo RuNOisn após (A _{1d}) 1 dia e (A _{7d}) 7 dias, e filme com o complexo RuNOisn após (B _{1d}) 1 dia e (B _{7d}) 7 dias implantado no animal. As setas indicam a aglomeração dos macrófagos.	63

LISTA DE TABELAS - PARTE I

Tabela 1. Comparação das distâncias de ligação N–O e das frequências de estiramento (ν_{NO}) para as espécies NO^+ , NO , NO^-	5
Tabela 2. Estatística a respeito da ligação M–N–O em nitrosilo complexos.	9
Tabela 3. Parâmetros da liberação de NO para a reação entre a cisteína e o nitrosilo complexo de rutênio em solução (RuNOisn) ou imobilizado no filme (CS₅₀-RuNOisn)*	59

LISTA DE ABREVIATURAS – PARTE I

ASTM	–	<i>American Society for Testing and Materials</i>
cyclam	–	1,4,8,11-tetraazociclotetradecano
CS _x -RuNOisn	–	filme de amido com o complexo <i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ isn(NO)](BF ₄) ₃ imobilizado (a letra “x” representa a quantidade de complexo imobilizado em µmol/filme)
EPR	–	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> (Ressonância paramagnética de elétrons)
Hedta	–	ácido hidroxietilendiaminotriacético
HNO	–	nitroxila
ina	–	ácido isonicotínico
isn	–	isonicotinamida
metMb	–	metmioglobina
NHE	–	eletrodo normal de hidrogênio
NO	–	óxido nítrico
NOA	–	<i>Nitric Oxide Analyzer</i> (analisador de óxido nítrico)
oxiMb	–	oximioglobina
Pa	–	Pascal (N/m ²)
PM	–	perda de massa
PO ₂	–	permeabilidade ao oxigênio
PoliHEMA	–	poli(2-hidroxietil metacrilato)
PVA	–	permeabilidade ao vapor de água
RuNOisn	–	<i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ isn(NO)](BF ₄) ₃
RuNOisn	–	<i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ isn(NO)](BF ₄) ₃
Salen	–	N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina
STMP	–	trimetafosfato de sódio
TPVA	–	taxa de permeabilidade ao vapor de água
TPO ₂	–	taxa de permeabilidade ao oxigênio

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1 Considerações gerais a respeito do óxido nítrico	3
1.2 Considerações gerais a respeito dos nitrosilo complexos.....	7
Parte I.....	14
1. INTRODUÇÃO ESPECÍFICA – Parte I	15
1.1 Materiais doadores de NO.....	15
1.2 Amido e materiais produzidos com amido.....	18
1.3 Nitrosilo complexo de rutênio imobilizado em filmes de amido	20
2 OBJETIVO e JUSTIFICATIVA	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Reagentes, materiais e solventes	25
3.2 Síntese dos complexos	25
3.2.1 $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_3$ ¹⁰⁵	26
3.2.2 <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2\text{Cl}]\text{Cl}$ ¹⁰⁶	26
3.2.3 <i>trans</i> - $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_4)\text{isn}]\text{Cl}$ ⁹³⁻⁹⁴	26
3.2.4 <i>trans</i> - $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}^+)](\text{BF}_4)_3$ (NO = ¹⁴ NO ou ¹⁵ NO) ^{93-94,99}	27
3.3. Instrumentação	27
3.3.1 Espectroscopia Eletrônica	27
3.3.2 Espectroscopia Vibracional - Infravermelho (IV).....	27
3.3.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR).....	28
3.3.4 Voltametria cíclica	28
3.3.5. Analisador de NO por quimioluminescência (Nitric oxide Analyzer - NOA).....	28
3.4. Modificação química do amido.....	30
3.5. Incorporação do complexo RuNOisn nos filmes de amido.....	31
3.6. Caracterização dos filmes.....	32
3.6.1. Propriedades Mecânicas dos filmes de amido.....	32
3.6.2. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	33
3.6.3. Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio	35
3.6.4. Degradação <i>in vitro</i>	36
3.6.5 Ensaio <i>in vivo</i> de implantação dos filmes de amido	37
3.7. Ensaio fotoquímico	37
3.8. Regeneração do nitrosilo complexo de rutênio imobilizado nos filmes.....	38

3.9. Quantificação do NO liberado durante a fotólise	38
3.10. Liberação de NO desencadeada pela reação com cisteína	39
3.11. Liberação do complexo RuNOisn a partir dos filmes de amido	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Caracterização dos filmes.....	41
4.1.1 Testes mecânicos e de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio	41
4.1.2 Degradação <i>in vitro</i> dos filmes de amido	42
4.1.3 Ensaios espectroscópicos	43
4.2. Liberação de NO ativada por luz.....	45
4.3 Regeneração do filme CS ₅₀ -RuNOisn após a liberação fotoquímica de NO	53
4.4. Liberação de NO ativada por redução química: reação com cisteína	57
4.5. Liberação do complexo RuNOisn a partir dos filmes de amido	60
4.6 Ensaios preliminares <i>in vivo</i> com os filmes de amido.....	62
5. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS FUTURAS	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

PARTE II – inicia na página 75

Resumo - Parte II	76
Abstract - Parte II.....	77
Lista de Figuras - Parte II.....	78
Lista de Tabelas - Parte	81
Lista de Abreviaturas – Parte II.....	82
Sumário - Parte II.....	84

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Considerações gerais a respeito do óxido nítrico

O óxido nítrico é uma das menores e mais simples moléculas biologicamente ativas da natureza. Juntamente ao monóxido de carbono (CO) e ao sulfeto de hidrogênio (H₂S), forma um grupo de importantes gasotransmissores no organismo¹. Os primeiros trabalhos que descreveram a atividade biológica do NO datam da década de 1980. Demonstrou-se que o processo de relaxamento vascular era mediado pela liberação de um fator humoral designado como fator de relaxamento dependente do endotélio² (EDRF, *Endothelium-Derived Relaxing Factor*). Posteriormente o EDRF foi identificado como sendo a molécula de NO³⁻⁴, fato que estimulou intensas pesquisas nessa área. Desde então, outras funções regulatórias associadas ao NO vem sendo amplamente estudadas, dentre elas a neurotransmissão⁵ e a resposta imune⁶⁻⁷. Estudos a respeito do papel do NO em algumas condições patofisiológicas, tais como câncer⁸, artrite e aterosclerose⁹ (doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de “placas” nos vasos sanguíneos) também tem sido realizados. O NO pode ser produzido endogenamente pela oxidação da L-arginina a L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) na presença de NADPH e oxigênio¹⁰ (Figura 1). Alguns estudos sugerem que os íons nitrito (NO₂⁻) podem ser uma fonte de NO em condições ácidas, e também que a xantina oxidase^{1,11}, citocromo c^{1,12} e hemoglobina^{1,13-14} têm a capacidade de reduzir NO₂⁻ a NO¹⁵⁻¹⁶.

Figura 1. Produção de NO via oxidação de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina (L-cit).

Fonte: Autoria própria, com base nas ref. ¹⁷⁻¹⁸.

O NO é a mais simples molécula paramagnética e termicamente estável conhecida¹⁹. Apesar de ser um radical (Figura 2), em condições biológicas o NO não apresenta tendência significativa em dimerizar-se, o que confere uma característica importante na biologia dessa molécula^{1,20-21} (a dimerização ocorre apenas em baixas temperaturas ou alta pressão, e a estrutura *cis*-N-N é a mais estável). Ao dimerizar-se, não há ganho efetivo na ordem de ligação global, e portanto, o monômero é favorecido por entropia²¹. Além disso, a ligação N-N do dímero (2.263 Å) do NO é fraca²¹, e essa característica pode ser atribuída a dois efeitos principais, *i*) formação parcial da ligação σ N-N devido à delocalização dos elétrons nos átomos de N e O (do orbital π^*)¹, *ii*) repulsão eletrônica dos pares de elétrons livres dos átomos de nitrogênio do dímero^{1,21-22}.

Figura 2. Diagrama simplificado do orbital molecular do NO.

Fonte: referência ²³.

A solubilidade do NO em água é similar a do O₂, de aproximadamente 2 mM²¹. O NO também tem caráter lipofílico, e a sua solubilidade pode ser aumentada em 6 a 8 vezes em solventes não-polares, em relação à água²⁰⁻²¹. A constante de difusão do NO sob condições fisiológicas é relatada como igual a 3300 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ^{20,24-25}.

A Figura 3 apresenta a série de espécies redox relacionadas ao NO. Sugere-se que todas essas etapas de oxidação e redução existam também em ambiente fisiológico²¹.

Figura 3. Óxido nítrico e espécies redox relacionadas.

Fonte: ref. ²¹.

As reações de oxidação e de redução do NO por um elétron são as que envolvem, respectivamente, a remoção ou adição de um elétron do orbital π^* (antiligante), Figura 2. Conforme esperado (Tabela 1), a remoção de um elétron desse orbital resulta no fortalecimento da ligação N–O. O contrário é observado para a espécie reduzida, NO^- .

Tabela 1. Comparação das distâncias de ligação N–O e das frequências de estiramento (νNO) para as espécies NO^+ , NO , NO^- .

	NO^+	NO	NO^-
Distância N–O (Å)	1,06	1,15	1,26
νNO (cm^{-1})	2377	1875	1470

Fonte: referência ¹⁹.

Sugere-se que os principais alvos biológicos do NO sejam as ferro-heme proteínas, tais como o citocromo P-450, oxiemoglobina e guanilato ciclase^{1,21,26-27}. O NO também reage com espécies radiculares biologicamente relevantes, tais como o superóxido (O_2^-), o peróxil ($\text{ROO}\cdot$), o tiil ($\text{RS}\cdot$) e o tirosil, com velocidades de reação próximas às controladas por difusão ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{1,21}. Os produtos formados na reação do NO com superóxido e radicais derivados de lipídeos (L), respectivamente peroxinitrito (ONOO^-) e LOONO , podem reagir com outros alvos biológicos e resultar em diversas funções fisiológicas e celulares²⁷. As principais reações do NO no organismo estão ilustradas na Figura 4. Apesar de reagir rapidamente com radicais, e também por reações redox com metais, o NO não é considerado um forte oxidante, nem um forte redutor de um elétron. O potencial de redução do NO, Eq. 1, é relatado com o valor de aproximadamente -0,55 V vs. NHE^1 .

```

graph TD
    NO[NO] --> EfeitosDiretos[Efeitos diretos]
    NO --> EfeitosIndiretos[Efeitos indiretos]
    
    EfeitosDiretos --> ReacaoComplexos[Reação com Complexos metálicos]
    EfeitosDiretos --> ReacaoRadicais[Reação com radicais]
    
    ReacaoComplexos --> Nitrosilacao[nitrosilação de Hemoglobina/Mioglobina]
    ReacaoComplexos --> InibicaoP450[inibição do citocromo P-450]
    ReacaoComplexos --> AtivacaoGC[ativação da guanilato ciclase]
    
    ReacaoRadicais --> RadicaisC[radicais centrados em átomos de carbono]
    ReacaoRadicais --> RadicaisL[radicais lipídicos]
    
    EfeitosIndiretos --> ReacaoO2[Reação com O2 e O2•-]
    ReacaoO2 --> GeracaoERO[geração de espécies reativas de óxidos de N]
    
    GeracaoERO --> Nitrosacao[Nitrosação]
    GeracaoERO --> Oxidacao[oxidação]
    GeracaoERO --> Nitricao[nitração]
    
    Nitrosacao --> ProdutosN[Produtos:  
-Nitrosamina (RR'NNO)  
-S-nitrosotiol]
    Oxidacao --> ProdutosO[Produtos:  
- quebra de cadeias de DNA  
- peroxidação lipídica]
    Nitricao --> ProdutosNI[Produtos:  
- nitrotirosina  
- nitroguanosina]
  
```

Devido à atividade biológica do óxido nítrico, moléculas e materiais doadores dessa espécie tem sido sintetizados, caracterizados, e sua reatividade estudada, além dos testes *in vivo*, que tem sido amplamente efetuados com esses doadores²⁸⁻³⁴. As principais classes de moléculas doadoras de NO estão representadas na Figura 5.

nitrosotiois e **(d)** diazeniodiolatos.

a

Nitroprussiato de sódio

b

Trinitrato de glicerina (nitroglicerina)

c

S-nitroso-N-acetil-penicilamina

d

Dietilamina NONOate

Fonte: Autoria própria.

Apesar das diversas funções do NO descritas na literatura, existem algumas questões a cerca da reatividade e do papel biológico dessa molécula que ainda merecem ser exploradas, fato que motiva o crescente número de trabalhos nessa área. Um dos tópicos mais estudados diz respeito à química do NO coordenado em complexos metálicos, que será discutida no tópico seguinte desta tese. Outra frente que tem sido estudada é a de desenvolvimento de doadores exógenos de NO, em que diferentes moléculas têm sido empregadas com esse propósito, e muitas delas também foram incorporadas em materiais, tais como nanopartículas e hidrogéis, com a finalidade de se produzir biomateriais doadores de NO³⁵⁻³⁷. Este tópico será discutido na Parte I desta tese.

1.2 Considerações gerais a respeito dos nitrosilo complexos

O primeiro nitrosilo complexo foi descoberto por J. Priestley em 1790³⁸, e se tratava da espécie $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{NO}]^{2+}$ ³⁸. O segundo foi o nitroprussiato, $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, sintetizado por K.L. Playfair em 1849³⁸, e que ainda é alvo de estudos até hoje. O interesse maior pela química fundamental de nitrosilo complexos ocorreu no século XX, principalmente a partir da década de 1950³⁹; mas os esforços para o desenvolvimento desse tema cresceram consideravelmente na década de 1990, devido, principalmente, à descoberta do papel que o NO desempenha no organismo. Desde então, um grande número de trabalhos sobre os nitrosilo metálicos tem sido publicados anualmente³⁹.

Em geral, a ligação do NO em centros metálicos ocorre predominantemente pelo átomo de nitrogênio. Essa ligação envolve a doação de densidade eletrônica do NO para o metal por meio do orbital σ (Figura 6), e também a retrodoação dos orbitais d_π do metal para o orbital π^* do NO^{19,40}.

Figura 6. Representação simplificada dos orbitais moleculares envolvidos na ligação $d_\pi-\pi^*$ entre metais (M) e o NO.

Fonte: referência ⁴⁰.

Essa descrição é análoga àquela proposta para o CO em compostos de coordenação. Entretanto, existem diferenças significativas na natureza da distribuição eletrônica das ligações M–NO e M–CO^{19,40}: o NO é mais eletronegativo que o CO, e é portanto um doador sigma mais fraco, mas um melhor receptor de densidade eletrônica π (ácido π), em comparação ao CO^{19,40}. Outra diferença é que na ligação M–NO, a distribuição da densidade eletrônica ocorre de forma mais uniforme nos orbitais do NO, em relação ao CO, no qual mais carga é transferida ao átomo de C do que ao do O¹⁹.

A literatura descreve que a ligação M–NO em nitrosilo metálicos tem natureza covalente e que a distribuição eletrônica nesse fragmento ocorre de forma relativamente uniforme¹⁹. Como resultado, existe certa dificuldade em se atribuir estados de oxidação formais ao metal e ao ligante NO. Em reconhecimento a essa característica, Enemark e Feltham⁴¹ propuseram um formalismo que trata os nitrosilo metálicos como uma única entidade, representada por $\{MNO\}^n$. Nesta notação, n é o número total de elétrons associados com os orbitais d do metal e π^* do NO, sendo que o número de elétrons d é determinado pelo estado de oxidação formal do metal^{19-20,41}.

Em nitrosilo complexos, o caráter do ligante NO pode variar desde NO⁺, o qual liga-se ao metal com um ângulo M–N–O de ~180°, até NO[−], para o qual o ângulo da ligação M–N–O é de ~120°. O NO⁺ é isoeletrônico do CO, o que confere uma geometria linear para a ligação M–N–O, enquanto o NO[−] é isoeletrônico ao O₂, portanto, se liga ao metal com geometria angular¹⁹. Uma característica interessante em relação ao ângulo de ligação M–N–O, é que a variação observada para os complexos mononitrosil hexacoordenados são comparáveis aos ângulos da ligação O–N–O no NO₂^(+1, 0, -1) (Figura 7). A distância da ligação O–N–O para NO₂^(+1, 0, -1) também é similar àquela observada para as espécies NO^(+1,0,-1): NO₂⁺¹ = 1.15 Å; NO₂ = 1.19 Å; NO₂^{−1} = 1.24 Å (comparar com os valores apresentados na Tabela 1 para a espécie NO^(+1, 0, -1))⁴².

Figura 7. Comparação entre os ângulos de ligação das espécies **(A)** $\text{NO}_2^{(+1,0,-1)}$ e **(B)** em nitrosilos metálicos $\text{M}-\text{N}-\text{O}$.

A	$[\text{O}-\text{N}-\text{O}]^+$	$[\text{O}-\text{N}-\text{O}]^0$	$[\text{O}-\text{N}-\text{O}]^-$
	180°	134°	119°
B	$[\text{M}-\text{N}-\text{O}]$	$[\text{M}-\text{N}-\text{O}]$	$[\text{M}-\text{N}-\text{O}]$
	~180°	145 ± 10°	126 ± 10°
	{MNO} ⁿ n ≤ 6	n = 7	n = 8

Fonte: referências^{19,43}

De acordo com os dados cristalográficos da base de dados “*Cambridge Crystallographic Data Centre*”, mais de 90% dos nitrosilo complexos registrados têm ângulo $\text{M}-\text{N}-\text{O}$ entre 160 e 180°, Tabela 2⁴². O primeiro complexo de metal de transição em que foi possível, inequivocamente, determinar que a ligação $\text{M}-\text{N}-\text{O}$ era angular, foi $[\text{Ir}(\text{NO})(\text{CO})\text{Cl}(\text{PPh}_3)_2]^+$ (PPh_3 = trifenilfosfina), o qual tem ângulo $\text{Ir}-\text{N}-\text{O}$ igual a 124°⁴². Outra característica interessante foi observada para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO})\text{Cl}(\text{PPh}_3)_2]^+$, que tem em sua esfera de coordenação dois ligantes NO, um linear e o outro angular (Figura 8).

Tabela 2. Estatística a respeito da ligação $\text{M}-\text{N}-\text{O}$ em nitrosilo complexos.

Ângulo da ligação $\text{M}-\text{N}-\text{O}$ (°)	Número de estruturas	Descrição
180-170	2058	linear
170-160	461	linear
160-150	76	intermediária
150-140	45	Intermediária
140-130	44	angular
130-120	54	angular
120-110	15	angular
110-100	2	angular
100-90	1	ligação π

Fonte: ref.⁴².

Figura 8. Estrutura molecular do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO})\text{Cl}(\text{PPh}_3)_2]^+$.

Fonte: referência ⁴²

A Figura 9 ilustra, de forma simplificada, os orbitais moleculares envolvidos na ligação M–NO linear, intermediária e angular⁴². Nota-se nessa figura que a população eletrônica do orbital π^* do NO resulta na angulação da ligação M–N–O.

Figura 9. Representação simplificada dos orbitais moleculares envolvidos na ligação M–NO linear (NO^+), intermediária (NO) e angular (NO^-).

Fonte: referência ⁴²

As técnicas espectroscópicas (RMN, UV-vis e infravermelho (IV)), eletroquímicas e os cálculos quânticos fornecem importantes informações e auxiliam na determinação da geometria dos nitrosilo complexos. Entretanto, não é possível chegar-se a uma conclusão inequívoca a respeito da geometria da ligação M–N–O apenas por meio dessas técnicas^{19,42}. Isso está ilustrado na Figura 10, que mostra a faixa de νNO e também de deslocamento químico (δ) do ligante ^{15}NO para diversos nitrosilo metálicos^{19,42,44}. Nessa figura é possível verificar que existe certa sobreposição entre as regiões do espectro referentes aos diferentes modos de ligação (linear, angular e em ponte), Figura 10. Entretanto, apesar das dificuldades experimentais e das possíveis ambigüidades em relação à determinação da geometria da ligação M–N–O, no caso dos complexos hexacoordenados do tipo $\{MNO\}^n$, já é possível sugerir de forma bastante razoável que o ângulo M–N–O será em torno de $180 \pm 10^\circ$ para $n \leq 6$, $145 \pm 10^\circ$ para $n = 7$, e $125 \pm 10^\circ$ para $n = 8$ ⁴³.

Figura 10. Faixa observada para a frequência de estiramento do NO (νNO , em cm^{-1}) e para o deslocamento químico (δ , em ppm, para ^{15}NO) em nitrosilo complexos.

Fonte: autoria própria, com base nas ref. ^{19,42,44}.

A reatividade dos nitrosilo complexos pode ser dividida em duas classes principais: reações em que (i) ocorre, e em que (ii) não ocorre transformação química em um ou mais dos ligantes NO¹⁹. Nesta última classe, as reações podem acontecer nos outros ligantes ou no centro metálico, e são freqüentemente favorecidas pela presença do nitrosilo¹⁹. Uma das reações principais é a mudança conformacional da ligação M–N–O, de linear para angular (Figura 9), que pode ocorrer por meio da redução do nitrosilo complexo por um ou mais elétrons, por reações fotoquímicas, ou por alterações na esfera de coordenação do complexo^{19,45}. Devido a essa propriedade da ligação M–N–O é que se atribui que as reações de substituição em nitrosilo complexos procedem, em geral, por mecanismo associativo ao invés de dissociativo¹⁹. Outros tipos de reações incluem a protonação, a adição eletrofílica, e a transferência de oxigênio do NO¹⁹, a formação de metaestados⁴⁶⁻⁴⁸ e as reações dos nitrosilo com eletrófilos e nucleófilos. Este último tipo, que faz parte de um dos temas de estudo desta tese, será discutido na *Parte II*.

Uma característica interessante observada para os nitrosilo complexos é o seu caráter eletrofílico⁴⁹. As reações de adição nucleofílica em nitrosilo complexos ([L₅M–NO]) são conhecidas de longa data⁵⁰⁻⁵³. O complexo mais estudado nesse tipo de reação é o nitroprussiato [Fe(CN)₅NO]²⁻¹⁹. Um dos primeiros trabalhos nessa área foi publicado em 1861^{50,53-54}, e trata da reação entre o ânion sulfito (SO₃²⁻) e o complexo Na₂[Fe(CN)₅NO], que origina um aduto de coloração vermelha: [Fe(CN)₅N(O)SO₃]⁴⁻. Apesar de o nitroprussiato apresentar carga negativa, o estiramento νNO nesse complexo é de 1939 cm⁻¹, fato compatível com um caráter de NO⁺. Uma analogia foi sugerida em relação à reatividade entre os íon NO⁺ e OH⁻ (Eq. 2), com aquela do NO coordenado no nitroprussiato (Eq. 3)^{49,53}:

A comparação dos valores de K_{eq} para as Eqs. (2) e (3), indica que íon “livre” NO⁺ é um eletrófilo muito mais forte que o nitrosilo coordenado, e que o NO⁺, quando coordenado ao complexo [Fe(CN)₅(NO)]²⁻ é bastante estabilizado em relação à sua conversão à NO₂⁻ pela reação com íons OH⁻^{49,53}.

Reações semelhantes às descritas acima para o nitroprussiato também foram estendidas para outros nucleófilos, tais como HS⁻, hidroxilamina, azida, *S*-nitrosotióis e

sulfito^{45,53,55-58}. A reação com o nucleófilo sulfito (SO_3^{2-}) é alvo de estudo desta tese, e a química desta, e também de outras espécies relacionadas será discutida na *Parte II*.

Parte I

1. INTRODUÇÃO ESPECÍFICA – Parte I

1.1 Materiais doadores de NO

Existem diferentes formas de se empregar o NO em terapia. Sua fonte pode provir desde o NO gasoso ($\text{NO}_{(g)}$), como também de moléculas doadoras de NO (nitrosotióis, diazeniodiolatos e nitrosilos metálicos, Figura 11).

Figura 11. Exemplos representativos de compostos doadores de NO.

Fonte: Autoria própria com base nas ref. ^{32,34,59}.

Um exemplo do uso de $\text{NO}_{(g)}$ foi realizado na terapia de cicatrização de uma úlcera⁶⁰. Conforme apresentado na Figura 12, o sistema para utilização de $\text{NO}_{(g)}$ consistia em revestir a área afetada com um dispositivo plástico (uma espécie de bota), pelo qual passaria o fluxo de $\text{NO}_{(g)}$ ⁶⁰. Nesse caso, antes da terapia com $\text{NO}_{(g)}$, o paciente foi tratado com medicamentos convencionais por um período de dois anos, sem que houvesse a completa cicatrização da ferida⁶⁰. O tratamento com o $\text{NO}_{(g)}$ foi conduzido durante 14 dias ($\text{NO}_{(g)}$ 200 ppm, 1,0 L/min, por um período médio de 8,1 h por noite de tratamento), e como resultado observou-se 75% de redução no tamanho da ferida. A completa cicatrização ocorreu 26 semanas após a interrupção do tratamento com o $\text{NO}_{(g)}$.

Figura 12. Dispositivo para a aplicação de NO gasoso na cicatrização de úlcera: (A) cilindro de NO, e (B) sistema para aplicação do NO gasoso.

Fonte: ref. ⁶⁰

Além do uso tópico do $\text{NO}_{(g)}$ ⁶¹⁻⁶², a literatura também relata o emprego da inalação do $\text{NO}_{(g)}$ em algumas terapias, tais como no tratamento da hipertensão pulmonar e hipoxemia (baixa concentração de oxigênio no sangue arterial)⁶³⁻⁶⁴.

A vantagem em se empregar o $\text{NO}_{(g)}$ está associada com a redução dos efeitos colaterais presentes durante o uso dos demais compostos doadores de NO, tais como os subprodutos tóxicos. Entretanto, a terapia baseada no uso de $\text{NO}_{(g)}$ pode apresentar algumas desvantagens^{63,65}: *i)* o NO é um gás potencialmente tóxico, e qualquer vazamento ou contaminação pode causar danos ao paciente; *ii)* pode ocorrer a oxidação do NO a outros gases também tóxicos, como o dióxido de nitrogênio ($2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2$), o qual pode gerar o trióxido de dinitrogênio ($\text{NO}_2 + \text{NO} \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_3$)¹ também tóxico; *iii)* em determinados casos, a técnica exige a imobilização do paciente para a aplicação do NO; *iv)* falta de especificidade do local de aplicação do $\text{NO}_{(g)}$.

Com base nesses fatos, do ponto de vista das aplicações biológicas, o emprego de moléculas doadoras de NO que liberem este gás de forma controlada é mais conveniente do que a utilização do NO gasoso. Mais especificamente, a incorporação de espécies doadoras de NO em diferentes materiais é uma estratégia interessante e que vem sendo investigada por diversos grupos de pesquisa^{35,37,66-68}. Em geral, os doadores de NO, tais como diazeniodiolatos, *S*-nitrosotióis e nitrosilos metálicos, são incorporados em diversos materiais (sílica⁶⁹, nanopartículas⁷⁰, dendrímeros^{67,71}, quantum-dots⁷², polímeros e hidrogéis³⁷), e a liberação de NO ocorre por meio de irradiação com luz ou por transformações metabólicas (pH, temperatura, reação com moléculas presentes no organismo).

Os materiais à base de sílica têm sido bastante utilizados na área biomédica, e este material apresenta como principal vantagem a possibilidade de adaptar a sua composição, tamanho e morfologia às necessidades locais⁶⁶. Já as nanopartículas apresentam as vantagens de armazenarem grandes concentrações de NO e de também poderem ser administradas na forma de pó ou suspensas em pomadas⁶⁶. Os dendrímeros apresentam a vantagem de armazenarem grandes concentrações de doadores de NO em uma única molécula^{67,71}, e também a possibilidade de se imobilizar, além de doadores de NO, peptídeos ou outras moléculas empregadas para se atingir um alvo específico no organismo^{66,71} (como por exemplo, células cancerígenas). Três exemplos representativos de doadores de NO imobilizados em sílica, nanopartículas e hidrogéis são descritos a seguir.

Um material foi produzido imobilizando-se o nitrosilo complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(ina)(NO⁺)]³⁺ (ina = ácido isonicotínico) na superfície da sílica gel⁶⁹. Os ensaios realizados demonstraram que a liberação de NO foi desencadeada nesse material por irradiação com luz e por redução química⁶⁹. Além disso, após a liberação de NO, foram realizados testes de regeneração do complexo imobilizado por meio de reação com íons nitrito, com a finalidade de se verificar as possibilidades de reciclagem desse material⁶⁹. A regeneração com íons nitrito ocorreu de forma satisfatória, e três ciclos de liberação de NO/regeneração foram realizados sem que houvesse significativa lixiviação do complexo imobilizado na sílica⁶⁹.

Em outro recente trabalho⁷⁰ foi descrito a imobilização dos complexos *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ e [Ru(NO)(Hedta)] em nanopartículas de poli(ácido lático-co-glicólico), abreviado como PLGA. Verificou-se que o material produzido apresentou atividade *in vitro* no combate a células cancerígenas, fato este atribuído ao NO liberado por irradiação com luz⁷⁰.

Um terceiro exemplo descreveu a incorporação do complexo [Ru(Me₂bpb)(NO)(4-vpi)](BF₄) (em que Me₂bpb = 1,2-bis(piridina-2-carboximido)-4,5-dimetilbenzene; 4vpi = 4-vinilpiridina) em hidrogéis de poli(2-hidroxietil metacrilato), abreviado como PoliHEMA⁷³. Neste complexo, o grupo vinil do ligante 4-vinilpiridina, foi utilizado na reação de polimerização, e formou uma ligação covalente com a matriz de PoliHEMA durante a polimerização⁷³. Isso evitou a lixiviação do complexo a partir dessa matriz. A liberação de NO desencadeada por luz foi estudada para esse complexo em solução e imobilizado em PoliHEMA⁷³. Outros exemplos de materiais que utilizaram luz para desencadear a liberação de NO foram descritos em artigos de revisão^{36-37,68}.

De acordo com os exemplos supracitados e também em diversos outros trabalhos na literatura, nota-se que uma dos agentes mais interessantes utilizados para desencadear a liberação de NO nos materiais é a luz³⁶. Aspectos como rápida velocidade de reação fotoquímica e pouca interferência em parâmetros fisiológicos tais como pH, temperatura e força iônica, tornam a liberação de NO desencadeada por luz uma estratégia amplamente utilizada^{36,68,74-75}. Uma vantagem adicional é que esta técnica é, em geral, pouco invasiva³⁶. Apesar dessas vantagens, em muitos casos, é necessário o emprego de luz UV na ativação da liberação de NO, a qual é imprópria para aplicações biológicas, pois a janela fototerapêutica (intervalo em que há boa penetração de luz e danos reduzidos aos tecidos) está entre $\lambda = 650\text{-}1350\text{ nm}$ ⁷⁵⁻⁷⁷. Por esse motivo, diversos esforços têm sido empregados para a elaboração de doadores de NO ativados por luz visível e por infravermelho próximo^{68 74-75,78-81}.

Os exemplos discutidos nos parágrafos anteriores ilustram a versatilidade dos materiais transportadores e doadores de NO e algumas das suas vantagens, tais como a liberação local e controlada de NO. Esses materiais podem ser utilizados, por exemplo, para recobrir dispositivos médicos implantáveis, reduzindo a agregação de plaquetas e infecções por meio da liberação de NO^{66,82-83}. Outra possibilidade é a associação de uma ou mais moléculas que apresentem atividade biológica juntamente aos doadores de NO, todos no mesmo material³⁶. Essa estratégia pode conduzir a um efeito sinérgico na ação desses compostos, contribuindo para um tratamento mais efetivo. Nesse contexto, a busca por novos materiais doadores de NO se faz necessária, visto que as possibilidades de aplicação são diversas. O amido é um material em potencial para ser utilizado com essa finalidade.

1.2 Amido e materiais produzidos com amido

O amido é formado por polissacarídeos que são sintetizados e armazenados pelas plantas em seus cloroplastos, e constitui a fonte principal de energia desses organismos. Os dois maiores componentes do amido são os polissacarídeos amilose e amilopectina⁸⁴⁻⁸⁵. A amilose é formada por uma cadeia linear de unidades de glicose (Figura 13) unidas por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto que a amilopectina apresenta estrutura ramificada formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6⁸⁴. A amilose apresenta massa molecular típica entre $10^5\text{-}10^6\text{ Da}$ e a amilopectina entre $10^7\text{-}10^9\text{ Da}$ ⁸⁴⁻⁸⁵. Em geral o amido pode conter em torno de 20-30% de α -amilose e de 70-80% de amilopectina^{84,86}.

Figura 13. Estrutura molecular do amido: amilose e amilopectina.

Fonte: Autoria própria.

O amido é utilizado em diversos setores da indústria, na produção de alimentos, no processamento de papel, na indústria têxtil, farmacêutica e de cosméticos⁸⁴. Materiais biodegradáveis também têm sido desenvolvidos empregando-se o amido como matéria-prima, como por exemplo, filmes de amido destinados para a produção de embalagens (Figura 14) em substituição aos derivados de petróleo. Além dessas aplicações, um campo crescente de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvimento de polímeros à base de amido para uso na área biomédica, como por exemplo, na produção de cimentos ósseos e de sistemas de transporte e liberação de medicamentos⁸⁶.

Figura 14. Filmes formulados com amido, glicerol e água.

Fonte: referências.⁸⁷ e <http://revistapesquisa.fapesp.br/2011/05/27/cor-nos-fungos/>

Uma característica importante da maioria dos materiais utilizados na área biomédica está relacionada com a reação do organismo aos materiais implantados e com os respectivos

produtos de degradação. No caso do amido, a principal vantagem é que os produtos de degradação são constituídos basicamente por oligossacarídeos, que podem ser metabolizados^{86,88}. A biocompatibilidade do amido está relacionada com o fato da estrutura da amilopectina ser similar à do glicogênio (em animais o glicogênio é o equivalente ao amido em plantas)⁸⁸. A principal diferença está na dimensão das ramificações, que no caso do glicogênio é menor em comparação à da amilopectina (Figura 15). Apesar disso, a frequência no número de ramificações é maior no glicogênio.

Figura 15. Representação simplificada das estruturas da amilose, amilopectina e glicogênio.

Fonte: Autoria própria.

Além da biocompatibilidade, o amido como matéria-prima apresenta como vantagem a capacidade de ser moldado de acordo com a necessidade, formando desde filmes a géis. Conforme será discutido no próximo tópico, o amido é um material com grande potencial para ser utilizado na produção biomateriais doadores de NO.

1.3 Nitrosilo complexo de rutênio imobilizado em filmes de amido

É grande o interesse no desenvolvimento de sistemas capazes de armazenar e liberar NO de forma controlada devido às propriedades fisiológicas dessa molécula sinalizadora¹. Conforme discutido nos tópicos anteriores, diferentes classes de compostos tais como

S-nitrosotióis, diazeniodiolatos e nitrosilos metálicos (Figura 11), tem sido desenvolvidas como doadores exógenos de NO^{29,32-33,59}. Muitos desses compostos foram incorporados em matrizes com a finalidade de se produzir dispositivos que permitam o controle temporal e espacial da liberação de NO³⁵⁻³⁶. Uma variedade de dispositivos capazes de liberar NO por mecanismos desencadeados por luz ou por transformações metabólicas foi recentemente descrito em artigos de revisão^{31,35-36,66-67}. Em particular, materiais contendo nitrosilos metálicos suportados (complexos de Mn, Fe e Ru) têm sido estudados como uma estratégia de liberação de NO^{37,68,74}, e muitos desses materiais têm apresentado atividade biológica de interesse^{37,89-92}.

O nosso Grupo acumulou experiência sobre a reatividade e as aplicações biológicas de tetraaminas de rutênio, de fórmula geral *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(L)(NO⁺)]³⁺ (L= N-heterocíclicos ou ésteres de fósforo) e também [Ru(NO)(hedta)], Figura 16^{33-34,37,58,93-96}. Os complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(L)(NO⁺)]³⁺ e [Ru(NO)(hedta)] representam uma classe de compostos bem conhecida e estudada, e cuja modelagem é amplamente difundida na literatura^{33-34,93-94,96-100}. Isso se deve basicamente à sua solubilidade em água, estabilidade em solução aquosa, e a relativa inércia dos ligantes no plano equatorial (formado pelas aminas) em relação às reações de substituição^{33,96}. Esses complexos, em função das suas características, são representados pela estrutura eletrônica {RuNO}⁶^{33,41}, e não apresentam sinal de paramagnetismo no espectro de EPR, sugerindo o caráter Ru^{II}-NO⁺ para esse fragmento³³.

Figura 16. Estrutura das tetraaminas de rutênio com o ligante nitrosônio (NO⁺) e também do complexo [Ru(NO)(hedta)]. L = ligantes N-heterocíclicos ou ésteres de fósforo

Fonte: autoria própria.

A principal vantagem do sistema de tetraaminas de rutênio em relação a outros nitrosilo complexos é a possibilidade de se modular a reatividade do NO coordenado em função do ligante L *trans*-posicionado ao NO (Figura 16). Por exemplo, o ν_{NO} nesses compostos pode variar desde 1888 cm^{-1} (L = Cl) até 1942 cm^{-1} (L = pirazina)³³. No caso do complexo [Ru(NO)(hedta)], o $\nu_{NO} = 1846\text{ cm}^{-1}$ ³³. Isso ocorre em função da maior ou menor população eletrônica no orbital π^* do NO coordenado. De forma geral, quanto maior a população nesse orbital, mais enfraquecida a ligação N–O, e conseqüentemente menor o valor da frequência de estiramento do NO (ν_{NO}). A constante de liberação de NO (k_{NO}), após redução monoelétrica do nitrosilo complexo³³, Eqs. (4) e (5) também varia em função da esfera de coordenação, desde $k_{NO} = 0,025\text{ s}^{-1}$ (T= 25°C) para L = nicotinamida, até $k_{NO} = 4,0\text{ s}^{-1}$ (T= 25°C) para L = imidazol coordenado ao rutênio pelo átomo de carbono⁹⁶.

Alguns dos complexos $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO^+)]^{3+}$ foram incorporados em materiais³⁷, tais como dendrímeros⁷¹, sílica gel⁶⁹, nanopartículas⁷⁰ e sol-gel¹⁰¹, com o objetivo de aumentar a versatilidade de sua aplicação como transportadores de NO. Os complexos $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO^+)]^{3+}$ e os respectivos suportados em materiais, apresentaram a propriedade de liberação de NO desencadeada por via fotoquímica e por redução química^{33,37}. Nesses sistemas, não foram observadas alterações significativas nas propriedades químicas e fotoquímicas dos complexos suportados em comparação aos complexos “livres” (não-suportados em materiais)^{37,69,71}.

Nesse contexto, o amido é uma nova plataforma e com bom potencial para ser empregado no desenvolvimento de materiais doadores de NO. O amido oferece algumas vantagens em relação às matrizes previamente utilizadas para esse propósito, tais como baixo custo, disponibilidade a partir de fontes renováveis, biodegradabilidade e biocompatibilidade⁸⁶. De fato, materiais à base de amido já vêm sendo utilizados para o transporte de fármacos e na engenharia de tecidos⁸⁶. Além disso, filmes produzidos com amido de mandioca têm sido estudados para a produção de embalagens de alimentos^{87,102}.

(Figura 14) principalmente devido às propriedades mecânicas desse material, além de sua flexibilidade e da ausência de odor e de cor.

Com a finalidade de se desenvolver novos materiais capazes de armazenar e liberar NO de forma controlada, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de incorporar o complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)](BF₄)₃ em filmes à base de amido, e avaliar o efeito dessa imobilização nas propriedades do complexo e na liberação de NO. Esse complexo foi escolhido devido à sua solubilidade em água, potencial de redução acessível a redutores biológicos ($E^{\circ'}_{\text{NO}^+/\text{NO}} = 54 \text{ mV vs. NHE}$), constante de liberação de NO de $k_{\text{NO}} = 0,043 \text{ s}^{-1}$ e baixa citotoxicidade⁹⁵⁻⁹⁶. A liberação de NO desencadeada por luz e também por redução química por meio da reação com cisteína foram investigadas.

2 OBJETIVO e JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo desenvolver um material doador de óxido nítrico à base de amido de mandioca. Deseja-se que esse material apresente propriedades mecânicas adequadas (seja resistente e permeável a gases) e que seja degradado pelo organismo.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se o processo de imobilização do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ nos filmes altera de forma significativa as propriedades químicas desse complexo;
- Estudar a reatividade química e fotoquímica do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ imobilizado nos filmes e identificar os produtos formados durante a fotólise e a reação de redução química (utilizando cisteína como redutor);
- Avaliar se o filme de amido é degradado pelo organismo em testes *in vivo*.

Pretende-se com esses resultados avaliar a viabilidade dos filmes de amido como transportador e entregador de óxido nítrico visando-se aplicações biológicas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes, materiais e solventes

Os reagentes foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich, Fluka ou Merck e utilizados da forma que recebidos, com exceção das ressalvas indicadas no decorrer do texto. Os solventes Mallinckrodt, Baker, Merck ou Panreac foram purificados conforme procedimentos descritos na literatura¹⁰³. Tricloreto de rutênio(III) hidratado ($\text{RuCl}_3 \times n\text{H}_2\text{O}$ Strem Chemicals) foi o precursor sintético dos demais complexos de rutênio. Quando necessário, as soluções foram desaeradas com argônio 99,999%, ou 99,998%. Para este último, o argônio foi purificado pela passagem em dois frascos lavadores, sendo que o primeiros deles continha uma solução ácida (HCl) de Cr(II) e amálgamas de zinco e mercúrio (Zg(Hg)), e o segundo, ácido sulfúrico concentrado¹⁰⁴.

3.2 Síntese dos complexos

O nitrosilo complexo de rutênio *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}^+)](\text{BF}_4)_3$ (**RuNOisn**) e os respectivos precursores foram sintetizados conforme descrito na literatura^{33,93-94}. O fluxograma simplificado da rota sintética para a obtenção desse complexo é apresentado na Figura 17, e o detalhamento de cada uma das etapas será descrito em seguida.

Figura 17. Rota sintética para a obtenção do nitrosilo complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}^+)](\text{BF}_4)_3$.

Fonte: Autoria própria, com base nas ref.⁹³⁻⁹⁴

3.2.1 $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_3$ ¹⁰⁵

Dissolveu-se 2,00g de tricloreto de rutênio ($\text{RuCl}_3 \times n\text{H}_2\text{O}$) em 27,0 mL de água destilada, seguido da adição cuidadosa de 26,0 mL de hidrato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) sob agitação constante e banho de gelo. A mistura permaneceu reagindo por 12 horas. Em seguida, adicionou-se a esta solução 50,0 mL HCl concentrado sob banho de gelo. A solução foi refluxada por duas horas, ocorrendo então a formação de um precipitado amarelo após o resfriamento da solução até a temperatura ambiente. Em seguida a mistura foi resfriada em banho de gelo, filtrada, e o sólido lavado duas vezes com HCl 1,5 M, gelado. O sólido obtido foi totalmente dissolvido em 200 mL de HCl 0,1 M a quente (50–60 °C). Após completa dissolução, a solução foi filtrada à quente em um funil de placa porosa. Ao filtrado foi adicionado excesso de HCl concentrado (12,0 M), sob banho de gelo. O sólido de cor amarela foi separado por filtração, seco a vácuo e estocado ao abrigo da luz. Rendimento: 55–60%

3.2.2 *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2\text{Cl}]\text{Cl}$ ¹⁰⁶

Em um balão de fundo redondo de duas bocas, adicionou-se 140 mL de água destilada, aqueceu-se até 75 °C (banho-maria) e borbulhou-se $\text{SO}_2(\text{g})$ por uma hora. Sob agitação magnética, dissolveram-se 5,32g de metabissulfito de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e 2,0 g de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$, continuando-se o borbulhamento de SO_2 por mais uma hora. Esta solução foi colocada em banho de gelo, e então o sólido *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{HSO}_3)_2]$ foi filtrado rapidamente, lavado com éter e seco sob vácuo. Todo esse sólido foi dissolvido em cerca de 400,0 mL de HCl 6,0 M e refluxado por 30 min. A solução foi filtrada a quente e resfriada em geladeira por cerca de 12 horas. Os cristais marrons foram coletados por filtração, lavados com HCl 6,0 M gelado, éter, e secos e estocados à vácuo. Rendimento: 75%

3.2.3 *trans*- $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_4)\text{isn}]\text{Cl}$ ⁹³⁻⁹⁴

150 mg do complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_2)\text{Cl}]\text{Cl}$ foram dissolvidos em 9,0 mL de água destilada previamente desaerada e em seguida adicionou-se carbonato de sódio (Na_2CO_3) até a solução atingir pH 9,0. A solução final tem coloração amarelada. Em seguida adicionou-se 400 mg de isonicotinamida, tornando a solução avermelhada escura, e deixou-se reagir por 5 min. Foram adicionados 3,0 mL de HCl 6,0 M, resultando em uma solução de coloração marrom, seguido da adição de 2,0 mL de solução 30% de H_2O_2 sob agitação. A

solução de cor amarela clara permaneceu sob agitação por 5 minutos, quando então foram adicionados 30 mL de acetona. A solução foi acondicionada em refrigerador por 12 horas. O sólido obtido foi coletado por filtração, lavado com acetona, seco e estocado sob vácuo e ao abrigo da luz. Rendimento: 65–70%.

3.2.4 *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)](BF₄)₃ (NO = ¹⁴NO ou ¹⁵NO) ^{93-94,99}

Dissolveram-se^{93-94,99} 100mg de *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄(SO₄)ina]Cl em 5,0 mL de solução desaerada de HBF₄ com pH previamente ajustado entre 4,0–4,5. O complexo foi então reduzido pela adição de amálgamas de zinco (7-10 peças), Zn(Hg), sob fluxo de argônio por 20 minutos sob agitação. A solução inicial tem coloração amarelada, e torna-se avermelhada durante o processo de redução. Essa solução foi transferida por cânula de teflon para um frasco contendo 1,5 mL de uma solução desaerada de HBF₄ 5,0 M. Em seguida, foram adicionados a esta solução 150mg de NaNO₂ (Na¹⁴NO₂ ou Na¹⁵NO₂). A solução permaneceu em agitação por 1 hora e então foram adicionados 15 mL de etanol, o que conduziu à precipitação de um sólido de cor rósea, o qual foi coletado por filtração, lavado com etanol, seco e estocado a vácuo. Rendimento: 60–65%.

3.3. Instrumentação

3.3.1 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-vis-NIR da marca Shimadzu, modelo UV3600 ou em um UV-vis Thermo Scientific Multiskan GO, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm. Os espectros eletrônicos dos filmes de amido contendo o nitrosilo complexo de rutênio incorporado foram obtidos imobilizando-se os filmes em uma cubeta de quartzo. Os filmes de amido sem a incorporação do complexo de rutênio foram utilizados como branco.

3.3.2 Espectroscopia Vibracional - Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico, 256 *scans* e resolução de 4 cm⁻¹ na região de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹. No caso dos filmes de amido, o espectro de IV foi obtido de acordo com o procedimento que será descrito no item 3.7 Ensaios fotoquímicos.

3.3.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR)

Os espectros de EPR foram obtidos em um espectrômetro Bruker EMX Plus banda-X com as amostras em temperatura ambiente ou de nitrogênio líquido (77 K).

3.3.4 Voltametria cíclica

As voltametrias cíclicas (VC) foram realizadas em um potenciostato DropSens μ STAT 400, utilizando-se eletrodos impressos DS 110 (screen printed electrodes), ilustrado na Figura 18. A solução do eletrólito (100 μ L de $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CF}_3\text{COONa}$, pH 2,0, $\mu = 0,10$ M) foi adicionada nos eletrodos e os filmes de amido foram colocados sobre essa solução para realizar as VC. O processo eletroquímico observado para o complexo hexaaminrutênio(III) ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$; Strem Chemicals) foi utilizado como um potencial de referência nos ensaios de VC, e a partir desse valor, os demais potenciais foram convertidos para a referência do eletrodo normal de hidrogênio (NHE).

Figura 18. Eletrodo impresso DS 110 (*screen printed electrodes*) utilizado nos ensaios eletroquímicos com os filmes de amido.

Fonte: Adaptado do site http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html

3.3.5. Analisador de NO por quimioluminescência (Nitric oxide Analyzer - NOA)

A liberação de NO foi monitorada utilizando-se um analisador de NO por quimioluminescência GE Sievers 280i (NOA). A curva de calibração foi gerada por meio da reação de diferentes concentrações de solução de NaNO_2 com solução ácida (ácido acético) de

iodeto de potássio (KI), de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante. Por se tratar de um equipamento relativamente novo, uma breve descrição sobre o analisador de NO por quimioluminescência (NOA) será exposta a seguir.

Uma ilustração simplificada do equipamento NOA é mostrado na Figura 19. O sistema é composto por um frasco reacional (1), no qual todo o NO gerado durante a reação é arrastado por um fluxo contínuo de N₂ (2) para um analisador de NO que opera por princípio de quimioluminescência (QL) (3). Neste analisador por QL, o NO reage com ozônio (O₃, gerado *in situ*) formando dióxido de nitrogênio no estado excitado (NO₂*), conforme mostrado na Eq. (6) ($k > 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ¹⁰⁷⁻¹⁰⁸). O decaimento do NO₂* para o estado fundamental (Eq. 7) resulta na emissão de fótons ($\lambda = 600\text{-}875 \text{ nm}$) que são analisados por um tubo fotomultiplicador¹⁰⁹. O sinal analítico é proporcional à concentração instantânea de NO¹⁰⁹.

Figura 19. Representação simplificada do equipamento NOA utilizado para a detecção e quantificação de NO ¹⁰⁹.

Fonte: Autoria própria, com base na ref. [ref]

3.4. Modificação química do amido

O amido de mandioca (19,7 % de amilose, gentilmente fornecido pela Cargill Agrícola S.A.) foi modificado utilizando-se o agente de ligação cruzada trimetafosfato de sódio (STMP), de acordo com o procedimento descrito por Dermigöz *et. al.*¹¹⁰, e ilustrado no Esquema 1, e detalhado mais abaixo no texto.

Esquema 1. Modificação do amido com trimetafosfato de sódio (STMP)¹¹⁰.

Diferentes concentrações de STMP foram utilizadas para preparar o amido modificado (5, 10, 15 ou 30 g de STMP/100 g de amido). Observou-se que o amido modificado com 15% de STMP apresentou as melhores propriedades mecânicas, o que está de acordo com um trabalho anterior¹¹⁰, no qual a concentração ideal de STMP foi de 15,7%. Por esse motivo, no presente trabalho foram utilizados o amido nativo e o amido modificado com 15% de STMP. O procedimento de modificação do amido foi o seguinte: 50g de amido de mandioca e STMP (15% m/m) foram adicionados a 500 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 11,0 utilizando-se solução de NaOH. Esta solução permaneceu sob agitação durante 5 h a 50 °C (banho termostático), e então o pH foi ajustado para 6,8 utilizando-se solução de HCl. A solução foi filtrada e o amido coletado foi ressuspensionado por duas vezes em 500 mL de água, seguido de filtração. O amido modificado foi seco a 60 °C durante 12 h e então armazenado à temperatura ambiente em um frasco de vidro com tampa.

A modificação química do amido foi verificada por meio da comparação dos espectros de infravermelho, Figura 20. Nota-se que no caso do amido modificado a intensidade relativa do sinal próximo a 3400 cm⁻¹, atribuído ao estiramento das hidroxilas do amido, foi reduzida no caso do amido modificado. Este resultado está em acordo com aquele apresentado na literatura¹¹⁰ e com o Esquema 1, que mostra que a reação envolve dois grupos hidroxila do amido para cada STMP.

Figura 20. Espectros de infravermelho para o amido nativo e modificado com 15% de trimetafosfato de sódio (STMP).

Fonte: Autoria própria.

3.5. Incorporação do complexo RuNOisn nos filmes de amido

O procedimento descrito a seguir foi utilizado na preparação de filmes circulares com uma área de 28,3 cm². Filmes com outras dimensões foram produzidos variando-se a massa de reagentes em proporção com a área relativa de 28,3 cm². A solução filmogênica foi preparada adicionando-se 75 mg de glicerol (plastificante), 470 mg de amido e 7,0 mL de água à um béquer. Essa solução foi aquecida à agitação constante em um banho termostático entre 75-80 °C, temperatura na qual o amido gelatiniza-se e forma um gel transparente. Quando este gel atingiu a temperatura ambiente, uma solução aquosa (V = 7,0 mL) contendo 5, 10, 15, 20, 30 ou 50 µmol de **RuNOisn** previamente dissolvido, foi adicionada, e a solução final permaneceu sob agitação por aproximadamente 5 minutos. Esta solução foi transferida para uma placa de Petri de acrílico, de formato circular com área de 28,3 cm². Esta placa foi então alocada em uma estufa (37 ± 2 °C) para a secagem dos filmes, processo que durou entre 25-27 horas (a permanência desta solução por períodos maiores na estufa resulta no rompimento dos filmes). Após a secagem, os filmes foram cuidadosamente removidos das placas de Petri. Os filmes de amido incorporados com o complexo de rutênio serão descritos no decorrer do texto como **CS_x-RuNOisn**, em que a letra *x* refere-se à concentração total (em µmol) de **RuNOisn** que foi imobilizada no filme com área de 28,3 cm².

Os filmes de amido preparados sem a adição do complexo **RuNOisn** foram utilizados como controle em diversos experimentos, e também nos ensaios mecânicos e de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio. Os filmes foram estocados em frascos fechados, com 75% de umidade relativa (solução saturada de cloreto de sódio) à temperatura ambiente.

3.6. Caracterização dos filmes

Os ensaios mecânicos, de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio, e de degradação *in vitro* para os filmes de amido de mandioca foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Carmen Cecília Tadini e com a então doutoranda Helena de Fazio Aguiar, ambas da Escola Politécnica da USP São Paulo.

3.6.1. Propriedades Mecânicas dos filmes de amido

Ensaio de resistência à tração foram realizados em um analisador de textura TA.XTPlus (Stable Micro Systems, UK), com sonda A/TGT, de acordo com o método ASTM (*American Society for Testing and Materials*) D882-10¹¹. Espécies ($n = 10$) com 100 mm × 25 mm, armazenadas a 75% de umidade relativa e 25 ± 2 °C por pelo menos 48h, foram colocadas entre as garras do equipamento com uma distância inicial de 50 mm. Estas garras foram então distanciadas à velocidade constante de 0,8 mm/s. Os parâmetros adquiridos foram a resistência à tração (unidade megapascal, MPa; em que $\text{Pa} = \text{N/m}^2$ ou $\text{m}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$), porcentagem de alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade (MPa). A Figura 21 ilustra de forma simplificada o perfil da curva de tensão-deformação obtida nos experimentos e os demais parâmetros coletados.

Figura 21. Ilustração simplificada da curva de Tensão-deformação para os ensaios mecânicos realizados com os filmes de amido.

Fonte: autoria própria.

A espessura dos filmes foi medida com um micrômetro (Mitutoyo, Brasil), com resolução de 0,001 mm, em cinco posições randômicas para cada amostra. Os resultados reportados (média e desvio padrão) são referentes a dez amostras.

3.6.2. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os ensaios de permeabilidade ao vapor de água (PVA) foram realizados de acordo com o método gravimétrico, seguindo o procedimento descrito na norma ASTM E 96/E 96M-10 (2010)¹¹². Inicialmente, as espessuras dos filmes foram verificadas com auxílio do micrômetro de ponta plana (Mitutoyo, Brasil), em cinco posições aleatórias de cada amostra. Em seguida, as amostras foram seladas com parafina sobre cápsulas metálicas (Figura 22B) com auxílio do equipamento (REGMED, PVA/4, Brasil) (Figura 22A), de modo que uma área livre de 0,0044 m² ficou exposta ao ambiente controlado. Três das cinco cápsulas foram preenchidas com sílica gel ativada. A sílica, ao adsorver o vapor de água que adentra a cápsula, permitiu quantificar a massa de vapor que atravessou o filme. Isso foi feito acompanhando-se a variação de massa da cápsula ao longo do tempo de exposição ao ambiente com umidade controlada. Porém, para a correta avaliação da permeabilidade do filme ao vapor de água, foi necessário considerar a massa de vapor de água que ficou retida na superfície do filme (por se tratar de um material que absorve água). Dessa forma, outras duas

cápsulas foram seladas, porém vazias (controle), a fim de se quantificar a massa de vapor de água absorvida pelo filme (Figura 22C).

Figura 22. (A) Equipamento utilizado nos ensaios de permeabilidade ao vapor de água. Cápsula metálica contendo a amostras de filme e preenchidas com sílica (B) e vazias (C).

Fonte: <http://www.regmed.com.br/pva-4e.pdf>

As cápsulas foram colocadas em ambiente com umidade relativa igual a 75% (solução aquosa saturada de cloreto de sódio) e tiveram suas massas medidas ao longo do tempo. Realizaram-se 10 medidas durante o período de 48 h e a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) [$\text{g/s}\cdot\text{m}^2$] foi calculada de acordo com a Eq. 8:

$$\text{TPVA} = \frac{w}{t \times A} \quad (8)$$

em que, w/t é a inclinação da curva do ganho de massa (w , em g) em função do tempo (t , em s) e A é a área do filme (m^2).

Para o cálculo da permeabilidade ao vapor de água (PVA , $\text{g}\cdot\text{mm/d}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kPa}$) considerou-se a média das espessuras do material (e , em μm), a pressão de saturação do vapor na temperatura do ensaio (p_s , em kPa) e as umidades relativas no interior (UR_I) e exterior (UR_2) das cápsulas, de acordo com a Eq. 9:

$$PVA = \text{TPVA} \times \frac{e}{p_s (UR_2 - UR_1)} \quad (9)$$

3.6.3. Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio

A permeabilidade dos filmes de amido ao oxigênio foi avaliada no equipamento Oxtran 2/21 (Mocon, EUA), de acordo com a norma ASTM F1927-07 (2007). Por essa técnica verificou-se o volume de oxigênio que atravessa uma determinada área de um filme durante um intervalo de tempo. O equipamento possui duas células que permitem testar duas amostras simultaneamente (Figura 23). A taxa de permeabilidade ao oxigênio foi calculada por um sensor coulométrico que mede a corrente elétrica formada proporcionalmente ao volume de oxigênio que permeia o material durante o teste. Inicialmente, as amostras foram cortadas com molde próprio do equipamento, e cinco medidas aleatórias da espessura foram realizadas. As amostras foram fixadas em suportes, conectadas ao equipamento e mantidas nessas condições por 4 h (temperatura da câmara = 23 °C; umidade do gás de arraste = 75%). O gás oxigênio foi então liberado entre as células, numa vazão de 20 mL/min, enquanto que o gás de arraste, composto de 98% de N₂ e 2% de H₂, a uma vazão de 10 mL/min, fluiu pelo lado externo das amostras, conforme ilustrado na Figura 23.

Figura 23. Representação esquemática do equipamento utilizado nos ensaios de permeabilidade ao oxigênio.

Fonte: Autoria própria

O equipamento fornece valores de taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) (cm³/m²·d) e o teste é finalizado quando esse valor se torna constante. A taxa de permeabilidade foi considerada como o maior valor registrado ao longo do ensaio, ou seja, considerou-se o maior volume de oxigênio capaz de permear a amostra. A permeabilidade ao oxigênio, (PO₂) [cm³/m²·d·Pa], foi então calculada pela Eq. 10, em que Δp (kPa) é a diferença na pressão parcial de oxigênio entre os dois lados do filme, em relação à pressão atmosférica

(101,3 kPa), quando as amostras estão sujeitas ao gás oxigênio de um lado e ao gás de arraste do outro.

$$PO_2 = \frac{TPO_2}{\Delta p} \quad (10)$$

O coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$, $\text{cm}^3/\text{m}\cdot\text{d}\cdot\text{Pa}$) foi calculado pela Eq. 11, levando em consideração a espessura média (e , em mm) da amostra.

$$P'O_2 = \frac{TPO_2}{\Delta p} \times e \quad (11)$$

3.6.4. Degradação *in vitro*

Os ensaios de degradação *in vitro* dos filmes de amido foram realizados por um período de 60 dias, de acordo com o método ASTM F1635-11¹¹³. Foi verificada a perda de massa dos filmes imersos em solução de tampão fosfato, simulando condições fisiológicas (pH 7,4, 30mM, $\mu = 180 \text{ mM NaCl}$, a 37°C). Amostras de filme ($n = 4$ para cada dia) com dimensões de $2,5\text{cm} \times 2,5 \text{ cm}$ foram acondicionadas em estufa a 60°C até atingirem massa constante, e então foram imersas em 80 mL de solução tampão fosfato. Os frascos foram selados e mantidos a 37°C , e em determinados intervalos de tempo (1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias) quatro amostras dos filmes foram removidas da solução, lavadas por duas vezes com água destilada e secas em estufa a 60°C até massa constante. A perda de massa foi calculada de acordo com a Eq. 12

$$PM (\%) = \frac{Md_0 - M_d}{Md_0} \times 100 \quad (12)$$

em que PM é a perda de massa (%), M_{d0} e M_d são respectivamente, a massa do filme seco (em g) antes e após os intervalos de imersão.

3.6.5 Ensaios *in vivo* de implantação dos filmes de amido

Este estudo preliminar foi realizado em colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor), da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo, com a colaboração da Dra. Ayumi Aurea Miyakawa e do Prof. Dr. José Eduardo Krieger. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética local, com o protocolo CAPPesq – 527/04). Os animais (ratos Wistar) foram anestesiados com uma mistura de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e então um filme com 1 cm² foi implantado no dorso do animal. Filmes utilizados como controle foram aqueles sem o complexo **RuNOisn** (n = 4), e os filmes em estudo foram aquelas contendo o complexo **RuNOisn** imobilizado (n = 4). Em intervalos de 1 e 7 dias após a implantação dos filmes, as amostras foram coletadas dos animais, lavadas com solução salina de NaCl (0,9 % m/V) e fixadas em uma solução tampão fosfato com 4% de formalina. A imunohistoquímica com CD68 foi realizada para a identificação da presença de macrófagos.

3.7. Ensaios fotoquímicos

Os ensaios fotoquímicos foram realizados empregando-se um laser Nd:YAG (Continuum, Serulite-II) operando no terceiro harmônico ($\lambda = 355$ nm). Um medidor de energia Coherent Lasermate-P foi utilizado para ajustar a energia dos pulsos em 5 mJ/pulso. As amostras foram irradiadas com um pulso de laser a cada 2 segundos. Os filmes de amido foram irradiados fixando-os em uma cela utilizada no espectrofotômetro de IV (Figura 24), na qual uma placa metálica contendo um orifício de 2 mm de diâmetro estava previamente conectada. O feixe de laser foi orientado para o orifício, permitindo que a irradiação dos filmes e os ensaios de IV fossem realizados sempre na mesma região da amostra.

Figura 24. Cella utilizada durante a fotólise dos filmes de amido e na obtenção dos espectros vibracionais.

Fonte: Autoria própria

As fotólises em solução foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico, utilizando-se solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM) ou solução aquosa de CF₃COOH/CF₃COONa (pH 2,0, μ = 0,10 M CF₃COOH/CF₃COONa).

3.8. Regeneração do nitrosilo complexo de rutênio imobilizado nos filmes

Este ensaio foi realizado de forma similar àquela descrita para outros sistemas^{69,101}, e o procedimento é detalhado a seguir. Após a fotólise do filme **CS₅₀-RuNOisn**, 20 μ L de uma solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO₂) 1,0 mM^{69,101} foi adicionada à área fotolisada para regenerar o complexo **RuNOisn** imobilizado no filme^{69,101}. Ensaios de IV foram realizados antes e após a fotólise, e também após a reação com NaNO₂.

3.9. Quantificação do NO liberado durante a fotólise

A determinação da concentração de NO liberado durante a fotólise dos filmes foi realizada utilizando-se a oximioglobina (oxiMb) como “agente sequestrador” de NO. A oxiMb foi obtida a partir da redução da mioglobina (músculo esquelético equino, Sigma) por meio da reação com ditionito de sódio (Na₂S₂O₄)¹¹⁴ em solução de tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). A solução resultante foi purificada em duas colunas cromatográficas (2 $\times$ 25 cm) empacotadas com Sephadex-G25, as quais foram previamente equilibradas com solução de tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). A solução de oxiMb coletada das colunas foi mantida em banho de gelo (0 °C) e utilizada durante o dia de trabalho. A concentração da solução estoque de oxiMb foi determinada por meio da banda Soret em 418 nm (ϵ_{418} = 136.000 M⁻¹ cm⁻¹)¹¹⁵ e das bandas em 542 nm (ϵ_{542} = 13.900 M⁻¹ cm⁻¹)¹¹⁶ e em 580 nm (ϵ_{580} = 14.400 M⁻¹ cm⁻¹)^{114,116}. A concentração de oxiMb foi ajustada para 5,4 μ M, e então 1 cm² do filme **CS₅-RuNOisn** foi adicionado. A solução resultante foi irradiada em uma cubeta (λ_{irr} = 355 nm, 5 mJ/pulso) e o curso da reação foi monitorado por meio de espectroscopia eletrônica. A fim de minimizar a fotooxidação da oxiMb¹¹⁵, a temperatura durante a fotólise foi mantida a 2 °C. Experimentos controle foram realizados irradiando-se uma solução de oxiMb contendo um filme de amido sem complexo **RuNOisn** imobilizado.

3.10. Liberação de NO desencadeada pela reação com cisteína

A liberação de NO dos filmes **CS₅₀-RuNOisn** também foi estudada por meio da reação de redução³³. Os ensaios foram conduzidos sob condições fisiológicas em uma solução de tampão TRIS (tris(hidroximetil)aminometano, 150 mM, 5 mM EDTA, pH 7,4 a 37 °C) utilizando-se *L*-cisteína como redutor ($E^{\circ'}_{\text{CisSSCis/CisH}} = -245 \text{ mV vs. NHE}$ para cisteína¹¹⁷). Uma amostra de **CS₅₀-RuNOisn** (1 cm²) foi colocada no frasco de reação do analisador de NO (NOA), seguido da adição de 3,0 mL de tampão TRIS. Em seguida foi adicionado ao frasco de reação uma solução de cisteína (vinte vezes de excesso em relação ao complexo **RuNOisn**) para desencadear a liberação de NO dos filmes. A reação prosseguiu em fluxo de nitrogênio¹⁰⁹, e os gases formados durante a reação foram purgados para o detector do NOA. Os parâmetros obtidos durante a reação de liberação de NO foram representados conforme indicado pela literatura¹⁰⁹: total de NO liberado, [NO]_T (mol NO); fluxo máximo da liberação de NO, [NO]_{max} (mol NO/unidade de tempo); período de tempo até o [NO]_{max}, $t[\text{NO}]_{\text{Max}}$ (unidade de tempo); a duração total, t_d (unidade de tempo) e o tempo de meia-vida de liberação de NO, $t_{1/2}$ (unidade de tempo).

Ensaio similares aos descritos no parágrafo anterior foram realizados para a reação entre a cisteína e o complexo **RuNOisn** em solução (não-imobilizado no filme). A massa de **RuNOisn** utilizada nesse ensaio foi determinada por meio de uma estimativa da concentração deste complexo que estaria imobilizada em 1 cm² do filme **CS₅₀-RuNOisn** (~1,77 μmol de **RuNOisn**, correspondente à massa deste complexo imobilizada em 1cm² de um total de 50 μmol imobilizada em 28,3 cm²).

3.11. Liberação do complexo RuNOisn a partir dos filmes de amido

Amostras ($n = 5$) de 2 cm² do filme **CS₅₀-RuNOisn** foram acondicionadas individualmente em frascos plásticos tampados contendo 2,0 mL de solução aquosa a 37 °C (CF₃COOH/CF₃COONa pH 5,0, μ=0,10 M). Em determinados intervalos de tempo os filmes foram removidos da solução, secos à temperatura ambiente e então submetidos a ensaios de espectroscopia vibracional (IV). Após esse procedimento, os filmes foram imersos em uma nova solução aquosa a 37 °C (CF₃COOH/CF₃COONa pH 5,0, μ=0,10 M) a fim de reiniciar o processo. A intensidade (absorbância) do ν_{NO} foi utilizada para estimar a concentração de **RuNOisn** que permaneceu imobilizada no filme de amido após a imersão em água. A

porcentagem do complexo **RuNOisn** remanescente nos filmes após a imersão em água foi determinada com relação à concentração inicial de **RuNOisn** que foi imobilizada nos filmes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos filmes

4.1.1 Testes mecânicos e de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio

Os filmes de amido (modificado com STMP) são visualmente translúcidos, flexíveis, e podem ser moldados e cortados conforme o necessário. A Figura 25 ilustra os filmes com e sem o complexo **RuNOisn** imobilizado.

Figura 25. Fotos do filme de amido (A) sem e (B) com a presença do complexo **RuNOisn** imobilizado.

Filme de amido o sem o complexo RuNOisn

(A)

Filme de amido com o complexo RuNOisn

(B)

Fonte: Autoria própria.

A espessura média desses filmes foi de $0,180 \pm 0,010$ mm, a resistência à tração = $11,8 \pm 1,4$ MPa, o alongamento na ruptura foi de $72,7 \pm 33,6\%$ e o módulo de elasticidade (MPa) foi de $208,1 \pm 14,4$ MPa. A resistência à tração dos filmes de amido modificado (com STMP) foi aproximadamente duas vezes maior que aquela descrita para filmes produzidos com o amido nativo (não modificados com STMP)¹⁰², enquanto que a porcentagem de alongamento na ruptura reduziu em 56%. O módulo de elasticidade aumentou em 96% nos filmes produzidos com amido modificado em comparação ao amido nativo. Essas alterações foram atribuídas às interações entre as moléculas de amido resultantes da ligação entrecruzada, o que restringe a mobilidade das cadeias. Os resultados das propriedades mecânicas obtidos neste trabalho com o amido modificado são consistentes com trabalhos similares¹¹⁸⁻¹¹⁹.

O coeficiente de permeabilidade ao oxigênio foi similar para os filmes produzidos com o amido modificado e nativo, respectivamente $1,46 \pm 0,19$ e $1,17 \pm 0,2 \times 10^{-8} \text{ cm}^3/\text{m} \cdot \text{d} \cdot \text{Pa}$. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) nos filmes produzidos com amido modificado e nativo foi de $9,7 \pm 0,1$ e $7,8 \pm 0,7 \text{ g mm/m}^2 \text{ d kPa}$, respectivamente. Há diversos fatores que podem influenciar na permeabilidade de gases e de vapor de água nos filmes, tais como a mobilidade das cadeias, a razão entre as zonas cristalinas e amorfas, e as interações entre os grupos funcionais dos materiais e os gases^{80,120}. Como a mobilidade das cadeias foi reduzida pela reticulação do amido (utilizando-se STMP), o resultado esperado seria a diminuição na permeabilidade ao vapor de água com o aumento da concentração de STMP. Entretanto, resultados anteriores demonstraram que a PVA em filmes de amido não apresenta uma correlação linear com a concentração do agente de ligação entrecruzada (STMP)¹¹⁹. A PVA aumenta com o aumento do grau de ligação entrecruzada até atingir um máximo, e então tende a permanecer constante ou diminuir com o aumento da concentração do agente de ligação cruzada¹¹⁹.

4.1.2 Degradação *in vitro* dos filmes de amido

A curva de degradação *in vitro* dos filmes de amido é ilustrada na Figura 26, onde é possível verificar que os filmes produzidos com amido modificado com STMP (ligação entrecruzada) apresentara menor velocidade de degradação em relação aos filmes produzidos com amido nativo.

Figura 26. Degradação *in vitro* dos filmes produzidos com (a) amido modificado (STMP) e (b) amido nativo. Condições experimentais: amostras de 2,5 cm × 2,5 cm ($n = 4$ para cada dia) de filmes de amido imersos em 80 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4, 30mM, $\mu = 180 \text{ mM NaCl}$, a 37 °C).

Fonte: Autoria própria.

Durante a primeira semana, a perda de massa (PM) do filme produzido com amido nativo e modificado foi relativamente similar, $PM = 8,8 \pm 1,3\%$ e $12,1 \pm 2,3\%$, respectivamente. Entretanto, a partir do sétimo dia até o sexagésimo, as diferenças na PM foram mais perceptíveis. No sexagésimo dia, a PM do filme produzido com amido modificado foi de $PM = 11,1 \pm 4,5\%$, e para o amido nativo foi de $37,9 \pm 11,7\%$. A literatura descreve que o processo de degradação de filmes de amido é governado principalmente pela lixiviação de plastificantes (glicerol, no caso do presente trabalho), eliminação das cadeias com baixa massa molecular, e/ou degradação química¹¹⁰. A ligação entrecruzada no amido modificado provavelmente diminuiu a difusão de moléculas e cadeias com baixa massa molecular, resultando em menor perda de massa em relação ao amido nativo (não modificado). Resultados similares foram observados para filmes produzidos com diferentes amidos de milho (amido de milho/etileno vinil álcool; amido de milho/acetato de celulose e amido de milho/ ϵ -caprolactona), nos quais a PM foi reduzida quando esses diferentes tipos de amido foram modificados com STMP¹¹⁰.

4.1.3 Ensaios espectroscópicos

Os ensaios espectroscópicos (UV-vis, Infravermelho e EPR) realizados para o filme **CS_x-RuNOisn** indicaram que a esfera de coordenação do complexo **RuNOisn** foi mantida durante a fabricação do filme de amido. Na Figura 27 observa-se que o espectro eletrônico do complexo **RuNOisn** imobilizado (**CS_x-RuNOisn**) é similar ao do complexo em solução. A frequência de estiramento de NO (ν_{NO}) para **CS_x-RuNOisn** (1935 cm^{-1}) foi semelhante à obtida para **RuNOisn** (1933 cm^{-1}), e essa frequência é consistente com o caráter de nitrosênio (NO^+) do ligante NO^{33} . Os ensaios de EPR demonstraram que tanto o filme **CS_x-RuNOisn** quanto o complexo **RuNOisn** não apresentaram sinal a 77 K, o que é consistente com as características de um complexo metálico de Ru(II) d^6 de baixo-spin³³.

Figura 27. Espectros eletrônicos do filme **CS₅-RuNOisn** e do complexo **RuNOisn**. Condições experimentais: filme seco, e complexo **RuNOisn** em solução aquosa pH 2,0, $\mu = 0,10$ M CF₃COOH/CF₃COONa. A figura inserida mostra a estrutura do nitrosilo complexo de rutênio **RuNOisn**.

Fonte: autoria própria

Foram produzidos filmes **CS_x-RuNOisn** nos quais seis diferentes concentrações do complexo **RuNOisn** foram utilizadas ($x = 5, 10, 15, 20, 30$ e $50 \mu\text{mol}$ de **RuNOisn**/filme com área de $28,3 \text{ cm}^2$), resultando em um filme com coloração rósea (Figura 25B). O filme sem a incorporação do complexo **RuNOisn** é transparente (Figura 25A). Na Figura 28 são apresentados os sinais referentes ao ν_{NO} para essas seis concentrações de **RuNOisn**. Observou-se uma boa correlação linear entre a absorvância do ν_{NO} e a concentração de complexo imobilizado no filme (figura inserida na Figura 28). Esse resultado sugere que o método utilizado para a incorporação do nitrosilo complexo de rutênio nos filmes de amido tem boa reprodutibilidade.

Figura 28. Espectros de infravermelho do filme **CS_x-RuNOisn** incorporado com diferentes concentrações de **RuNOisn** imobilizado/filme. As concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 50 $\mu\text{mol RuNOisn/filme}$ são representadas respectivamente pelas letras de “a” a “f”. A figura inserida representa a correlação entre a concentração de **RuNOisn**/filme vs. a absorbância do ν_{NO} , $R^2 = 0,9905$.

Fonte: autoria própria

4.2. Liberação de NO ativada por luz

A literatura^{74,121} descreve um grande número de nitrosilo complexos de rutênio do tipo $\{Ru-NO\}^{6,122}$ que exibem a propriedade de liberar NO por meio de irradiação com luz UV, gerando como fotoproduto o respectivo solvato complexo de Ru(III)^{74,121}, Eq. (13).

De forma análoga, a fotólise dos nitrosilo complexos do tipo $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO^+)]^{3+}$ com fótons com energia correspondentes com a faixa de $\lambda_{\text{irr}} = 300-370 \text{ nm}$ resulta em liberação do NO, com concomitante fotooxidação do centro metálico^{74,121}, Eq. (14):

O rendimento quântico (ϕ) para a fotoreação apresentada na Eq. (14) quando L = isonicotinamida é de $\phi = 0,05-0,07$ ($\lambda_{\text{irr}} = 330$ nm, pH 3,0 a 4,9), e este ϕ está na faixa de valor observada para outros nitrosilo complexos de rutênio com estrutura química análoga^{74,121}.

O filme **CS₅-RuNOisn** foi irradiado com luz UV ($\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm, 5 mJ/pulso) e o curso da reação foi monitorado por espectroscopia eletrônica. Esse resultado é apresentado na Figura 29A, onde é possível observar a diminuição na absorbância das bandas em 228 e 275 nm, concomitante com o aumento na absorbância das bandas na região de 300-400 nm e 500 nm. Mudanças similares foram verificadas no espectro eletrônico do complexo **RuNOisn** durante a fotólise em solução aquosa, pH 2,0 (Figura 29B), com exceção da banda em 275 nm, na qual a absorbância aumentou durante a irradiação. A banda em 275 nm foi atribuída em um trabalho anterior^{33,94} como sendo referente às transições $d \rightarrow d$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{isn})$. A diferença observada no comportamento da banda em 275 nm durante a fotólise do filme em comparação à do complexo em solução provavelmente ocorreu devido a interações entre a matriz (amido) e o nitrosilo complexo. A banda alargada observada na região de 400-600 nm (figura inserida nas Figuras 29A e 29B) é provavelmente proveniente de transições $d \rightarrow d$ e de transferência de carga do metal para o ligante ($\text{Ru} \rightarrow \text{isn}$)¹¹⁵. Em geral, os resultados da fotólise do complexo **RuNOisn** (em solução e imobilizado) estão de acordo com dados reportados a respeito da fotolabilização em complexos do tipo $\text{trans}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{L})(\text{NO}^+)]^{3+}$ em solução ou imobilizados em diferentes matrizes^{37,71,121}.

Figura 29. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise do (A) filme **CS_x-RuNOisn** e do (B) complexo **RuNOisn** em solução aquosa (pH 2,0, $\mu = 0,10$ M $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CF}_3\text{COONa}$). As figuras inseridas mostram o espectro eletrônico na região de 300-700nm. Condições: $\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm; 5mJ/pulso.

Fonte: Autoria própria.

O espectro de EPR obtido após a fotólise do filme **CS₅₀-RuNOisn** confirmou a formação do fotoproduto de Ru(III) (Figura 30a)^{94,121}. Este sinal no espectro é mais largo do que aquele obtido após a fotólise do complexo **RuNOisn** em solução (Figura 30b), e esse fato foi atribuído à efeitos da matriz, conforme descrito para outros sistemas³⁷. Essa característica pode ser comprovada comparando-se o espectro de EPR para diferentes formulações da amostra do filme fotolisado (Figura 31), em que é possível verificar que o espectro de EPR do filme triturado (Figuras 30a e 31a) é similar ao obtido para o fotólise do complexo em solução aquosa (pH 2,0), Figura 30b, mas é muito diferente daquele obtido para o filme não-triturado (Figura 31b). Os valores de g para os produtos da fotólise de **RuNOisn** e **CS₅₀-RuNOisn** (Figura 30) são respectivamente $g = 2,52$ e $g = 2,56$.

Figura 30. Espectros de EPR obtidos após a fotólise (a) do filme **CS₅₀-RuNOisn** e (b) do complexo **RuNOisn** em solução aquosa (pH 2,0, $\mu = 0,10$ M $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CF}_3\text{COONa}$), ambos adquiridos a $T = 77$ K.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Espectros de EPR obtidos para diferentes formulações do filme **CS₅₀-RuNOisn** fotolisado: (a) filme triturado e (b) filme não-triturado, ambos adquiridos a $T = 77$ K.

Fonte: Autoria própria.

É provável que durante a fotólise do filme contendo o complexo **RuNOisn**, o NO seja liberado e que o produto formado tenha uma molécula de água como ligante, substituindo o NO (Eqs. (13) e (14)). Isso é sugerido em função com análises

termogravimétricas, que demonstraram que os filmes de amido são constituídos, em massa, de aproximadamente 10% de água, e esse valor representa um excesso em relação à concentração de **RuNOisn** imobilizado no filme. Resultados similares aos descritos para os filmes de amido foram reportados por Doro *et al.*, os quais imobilizaram um nitrosilo complexo de rutênio na superfície da sílica-gel, na qual havia entre 1-2% de água adsorvida⁶⁹.

Investigações adicionais a cerca do produto formado no filme de amido após a fotólise foram realizadas por meio de técnicas eletroquímicas. Voltametrias cíclicas do filme fotolisado mostraram um processo com $E_{1/2} = 415$ mV vs. NHE (Figura 32). Esse valor é muito próximo ao reportado¹²³⁻¹²⁴ para o par Ru(III)/Ru(II) no íon complexo *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄(isn)(H₂O)]³⁺ ($E_{1/2} = 0,42$ V¹²³ ou 0,428 V¹²⁴ vs. NHE), sugerindo que esse aquo-complexo foi formado no filme após a fotólise. Esse processo eletroquímico não foi observado para o filme não-fotolisado (Figura 32). Portanto, os dados eletroquímicos são consistentes com os resultados obtidos nos ensaios de EPR (Figura 30).

Figura 32. Voltamogramas cíclicos do filme **CS₅₀-RuNOisn** obtidos antes e após a fotólise. Condições experimentais: solução aquosa, pH 2,0, $\mu = 0,10$ M CF₃COOH/CF₃COONa.

Fonte: Autoria própria.

A intensidade do ν_{NO} do filme **CS₅₀-RuNOisn** também foi monitorada por espectroscopia vibracional durante a fotólise (Figura 33).

Figura 33. Alterações no espectro de IV durante a fotólise do filme **CS₅₀-RuNOisn**. A figura inserida mostra as mudanças na absorbância em 1935 cm⁻¹ durante a fotólise. Condições experimentais: $\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm, 5mJ/pulso.

Fonte: Autoria própria

A diminuição na intensidade do sinal ν_{NO} em 1935 cm⁻¹ (Figura 33) sustenta a hipótese dos dados obtidos por EPR, UV-vis e eletroquímicos, os quais sugerem que o NO é labilizado pela exposição do filme à luz UV ($\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm), formando o fotoproduto *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄(isn)(H₂O)]³⁺. O decaimento exponencial do ν_{NO} durante a fotólise (figura inserida na Figura 33) é análogo ao reportado para a fotólise de outros nitrosilo complexos⁷⁴. Também foi observado durante a fotólise (Figura 33) o aparecimento de uma banda na região de 1850-1910 cm⁻¹ (centrada em 1888 cm⁻¹), e um ponto isobéstico em 1913 cm⁻¹. Para auxiliar na atribuição dessa banda, o complexo contendo o NO marcado com ¹⁵N, *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(¹⁵NO⁺)]³⁺, foi sintetizado e incorporado no filme de amido. O sinal referente ao ν_{NO} para esse complexo (¹⁵NO) imobilizado no filme, estava deslocado para menor número de onda, $\nu(^{15}\text{NO}) = 1894$ cm⁻¹ (Figura 34), em relação ao complexo análogo (¹⁴N), em que $\nu_{\text{NO}} = 1935$ cm⁻¹ (Figura 33). Esse deslocamento está dentro da faixa apresentada para outros nitrosilo complexos¹²⁵⁻¹²⁶. As alterações no espectro vibracional observadas durante a fotólise do filme produzido com ¹⁵NO foram similares às observados para o filme produzido com ¹⁴NO, mas também deslocadas para menor número de onda (Figura 34). Esse resultado sugere que o aparecimento da banda alargada durante a fotólise do filme (Figuras 33 e 34) é proveniente do NO, o qual provavelmente estava “preso” no filme seco. Isto é sugerido com base na frequência de estiramento do NO livre, o qual é reportado como sendo em 1875 cm⁻¹¹⁹. Apesar do possível aprisionamento do NO no filme, quando a fotólise do filme é

realizada em solução aquosa, a presença de água provavelmente facilita a difusão do NO, e este é liberado para a solução, conforme será discutido a seguir.

Figura 34. Alterações no espectro de IV durante a fotólise do filme de amido incorporado com o complexo marcado com ^{15}N , $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(^{15}\text{NO}^+)]^{3+}$. Condições experimentais: $\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$, 5 mJ/pulso .

Fonte: Autoria própria

A fotólise do filme **CS₅-RuNOisn** foi realizada em solução aquosa contendo oximioglobina (oxiMb), utilizada para a detecção de NO. Essa proteína reage com NO gerando metmioglobina (metMb) e nitrato ($k = 3,4\text{--}4,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 7,0), de acordo com a Eq. 15:

Ao imergir uma amostra de 1 cm^2 do filme **CS₅-RuNOisn** em solução contendo oxiMb, nenhuma alteração no espectro eletrônico da oxiMb foi observada, mesmo após 10 min. Entretanto, quando essa mistura foi irradiada com luz UV ($\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$), verificou-se que a banda Soret em 418 nm deslocou-se para 410 nm, concomitantemente com a diminuição na intensidade das bandas em 542 e 580 nm (Figura 35). Essas alterações no espectro eletrônico da oxiMb estão de acordo com a reação descrita na Eq. 15¹¹⁵. A banda em 410 nm ($\epsilon_{410} = 188.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{116,127} foi utilizada para quantificar a concentração de NO liberado durante a fotólise do filme **CS₅-RuNOisn**¹¹⁵. Observou-se boa correlação linear entre os valores de absorbância em 410 nm e o número de pulsos de laser direcionados na amostra (figura inserida na Figura 35). A concentração de NO liberado por meio da fotólise foi

de $5,02 \pm 0,12 \mu\text{M}$ ($10,04 \pm 0,24 \text{ nmol NO}$ em 2 mL) após 17 minutos de irradiação (500 pulsos de laser em intervalos de 2 s). Um experimento controle, em que uma amostra do filme de amido (1 cm^2) não contendo o complexo **RuNOisn** imobilizado foi irradiado com $\lambda = 355 \text{ nm}$ em uma solução de oxiMb, não mostrou alterações no espectro eletrônico durante a fotólise, mesmo após 1000 pulsos de laser (Figura 36). Esse resultado sugere que é possível controlar a liberação de NO nos filmes **CS_x-RuNOisn** por meio da irradiação com luz ($\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$), e isso está de acordo com outros trabalhos reportados na literatura para nitrosilo complexos imobilizados em diferentes matrizes^{37,69,71,90,101,128}.

Figura 35. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise de uma solução contendo oxiMb e **CS₅-RuNOisn**: (a) oxiMb (traço em vermelho) e (b) metMb (traço em azul). A figura inserida mostra as alterações da absorbância em 410 nm durante a fotólise. Condições: 1 cm^2 de filme **CS₅-RuNOisn** e $5,4 \mu\text{M}$ de oxiMb em solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM); $\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$, 5mJ/pulso, 500 pulsos de laser (um pulso a cada 2 s); $T = 2 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3$.

Fonte: autoria própria.

Figura 36. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise de uma solução contendo oxiMb e uma amostra de filme de amido (1cm²) sem complexo de rutênio imobilizado. Condições experimentais: 5,8 µM de oxiMb em solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM); λ_{irr} = 355 nm, 5mJ/pulso, 1000 pulsos de laser (um pulso a cada 2 s); T = 2 °C.

Fonte: autoria própria.

4.3 Regeneração do filme CS₅₀-RuNOisn após a liberação fotoquímica de NO

A possibilidade de gerar NO cataliticamente por meio da liberação e regeneração com nitrito é uma vantagem significativa dos nitrosilo complexos de rutênio em comparação com outros doadores de NO^{69,101}. Nesse contexto, após a fotólise do filme **CS₅₀-RuNOisn**, 20 µL de uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂, 1,0 mM) foram adicionados sobre a área fotolisada a fim de se promover a regeneração do complexo imobilizado no filme, de forma similar à descrita em outros trabalhos^{69,101}. Durante esse processo, a coloração da área fotolisada foi alterada pela reação com os íons NO₂⁻, sugerindo que a reação de regeneração do complexo inicial esteja ocorrendo no filme (Figura 37A). Esse processo foi confirmado comparando-se os espectros de IV obtidos antes e após a fotólise, e também após a adição da solução de nitrito (Figura 37B).

Figura 37. (A) Regeneração do filme **CS₅₀-RuNOisn** após a fotólise e reação com solução de nitrito (1,0 mM): (I) área fotolisada do filme; (II) adição da solução aquosa de NO₂⁻; (III) 15 min após a adição da solução de NO₂⁻. (B) Espectro vibracional do filme **CS₅₀-RuNOisn**: (a) antes da fotólise, (b) após a fotólise e (c) após a reação com nitrito.

Fonte: autoria própria.

Um segundo ciclo de fotólise/regeneração também foi realizado, conforme apresentado na Figura 38.

Figura 38. (A) Alterações no espectro vibracional durante o segundo ciclo de fotólise do filme **CS₅₀-RuNOisn** ($\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$, 5 mJ/pulse). A figura inserida mostra a alteração na absorbância em 1935 cm^{-1} durante a fotólise. (B) Segunda regeneração do filme **CS₅₀-RuNOisn** após a reação com solução de nitrito ($1,0 \text{ mM}$).

Fonte: autoria própria.

Experimentos de regeneração similares aos discutidos no presente trabalho foram realizados por Bordini *et al.*¹⁰¹ e Doro *et al.*⁶⁹, nos quais os nitrosilo complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{salen})(\text{OH}_2)(\text{NO})]^+$ (salen = N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina) e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{ina})\text{NO}]^{3+}$ (ina = ácido isonicotínico) foram imobilizados, respectivamente, em sol-gel de silicato e em superfície de sílica gel modificada. No sistema descrito por

Bordini, a regeneração ocorreu após 1 (um) dia de reação com solução ácida de nitrito (HClO_4 pH 1,0; 1,0 M nitrito) e após 7 (sete) dias em solução aquosa contendo apenas íons nitrito (1,0 M)¹⁰¹. O filme de amido **CS₅₀-RuNO** descrito no presente trabalho foi regenerado em aproximadamente 20 min (em solução aquosa 1,0 mM de nitrito), conforme indicado pela alteração nas cores e no espectro de IV apresentado na Figura 37. Doro *et al.* atribuiu o longo período necessário à regeneração do sistema descrito por Bordini à lenta difusão da solução de íons nitrito no ambiente da rede de silicato. No caso do sistema descrito por Doro⁶⁹, a regeneração ocorreu assim que a solução de nitrito foi adicionada ao material. Os filmes de amido do presente trabalho são materiais que absorvem água, o que possivelmente facilitou a difusão da solução de nitrito e conseqüentemente favoreceu a regeneração do complexo imobilizado no filme com os íons NO_2^- .

Apesar de ter sido discutido em alguns trabalhos^{69,101}, o mecanismo de regeneração em nitrosilo complexos de Ru(II) (realizado após a liberação de NO promovida pela fotólise) ainda não foi completamente elucidado. Devido ao fato desse tema não se tratar do objetivo principal do presente trabalho, ensaios mais aprofundados para entender esse mecanismo não foram efetuados. Entretanto, uma possível proposta para tal mecanismo pode ser sugerida com base nas reações de desproporcionamento, conforme explicado resumidamente a seguir. A fotólise dos nitrosilo complexos de rutênio em solução aquosa leva à liberação de NO e formação de uma espécie paramagnética de Ru(III)^{74,115,129}, provavelmente $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{H}_2\text{O}]$, conforme descrito na Eq. 13 e 14. A literatura descreve que a reação entre espécies de $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{H}_2\text{O}]$ e íons nitrito pode formar espécies instáveis do tipo $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{NO}_2]$, as quais se desproporcionam no nitrosilo complexo de Ru(II), $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$, e no nitrato complexo de rutênio(III), $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{NO}_3]$ ¹³⁰⁻¹³². Esse pode ser um dos mecanismos pelo qual o nitrosilo complexo é regenerado. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, esta é apenas uma sugestão, e novos estudos serão necessários para a compreensão do mecanismo de regeneração.

Apesar do mecanismo completo ainda não ter sido elucidado, os resultados de regeneração descritos no presente trabalho e também em outros^{69,101}, sugerem que na presença de complexos do tipo $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{H}_2\text{O}]$, os íons nitrito podem servir como uma fonte em potencial para a geração de NO. No organismo humano, o nitrito pode ser ingerido na dieta e também ser produzido pela redução de nitrato, processo realizado por bactérias existentes na cavidade oral¹³³⁻¹³⁴. A concentração de nitrito no plasma é da ordem de 0,1-0,5 μM ¹³⁵ e em alguns tecidos a sua concentração é superior em uma ou duas ordens de grandeza¹³⁵. A redução de

nitrito a NO é importante principalmente em condições ácidas e de hipóxia¹³⁵ (comum em isquemia: redução ou falta de suprimento sanguíneo a um tecido), em que a geração de NO pela NO-sintase (a partir da *L*-arginina) é comprometida. Nesses casos, o filme **CS_x-RuNOisn** seria útil como uma fonte de armazenamento e liberação de NO. Além disso, a biodisponibilidade do nitrito oferece a possibilidade de aumentar os níveis e o período de liberação de NO a partir dos filmes contendo os nitrosilo complexos imobilizados.

Conforme será discutido no próximo tópico, o complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(L)(NO⁺)]³⁺ também apresenta a característica de liberação de NO desencadeada por reação de redução³³. Tomando-se conhecimento de que regiões de hipóxia são inerentemente ambientes redutores¹³⁶, a utilização dos filmes **CS_x-RuNOisn** possibilitaria a liberação local de NO mediada por redutores presentes no organismo. Regiões de hipóxia são comumente encontradas em tumores¹³⁷⁻¹³⁸, o que possibilitaria o emprego dos filmes de amido nesses casos¹³⁷⁻¹³⁸.

4.4. Liberação de NO ativada por redução química: reação com cisteína

Além da liberação de NO desencadeada por luz, os complexos do tipo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(L)(NO⁺)]³⁺ apresentam a propriedade de liberar NO por meio de redução por um elétron³³. Esta reação foi previamente estudada utilizando-se métodos eletroquímicos e também pela reação dos complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(L)(NO⁺)]³⁺ com európio (Eu^{II})^{33,93-94}, conforme descrito nas Eqs. (16) e (17):

A fim de simular uma situação mais próxima àquela encontrada em aplicações biológicas, a liberação de NO nos filmes **CS_x-RuNOisn** foi investigada por meio da reação com cisteína^{97,139-140} ($E^{\circ}_{NO^+/NO} = 54$ mV vs. NHE para **RuNOisn**³³, e $E^{\circ}_{CisSSCis/CisH} = -245$ mV vs. NHE para cisteína¹¹⁷) sob condições fisiológicas (tampão TRIS 150 mM, 5 mM EDTA, pH 7,4 a 37 °C). A curva de liberação de NO em função do tempo para a reação entre o filme **CS₅₀-RuNOisn** e a cisteína é mostrada na Figura 39A. Analogamente, a curva de liberação de NO para a reação do complexo **RuNOisn** em solução é mostrado na Figura 39B.

Nas Figuras 39C e 39D são apresentadas as curvas referentes ao NO liberado (total acumulado) em função do tempo (obtido pela integração da curva), respectivamente para o complexo o filme **CS₅₀-RuNOisn** e para o complexo **RuNOisn** em solução. O conjunto de parâmetros referentes à liberação de NO desencadeada pela reação com cisteína para **CS₅₀-RuNOisn** e **RuNOisn** é apresentado na Tabela 3.

Figura 39. Curva de liberação de NO desencadeada pela reação com cisteína: perfil de liberação de NO vs. tempo, para uma amostra (A) de 1cm² do filme **CS₅₀-RuNOisn** e (B) 1,77 µmol de **RuNOisn**. Total de NO liberado (acumulado) em função do tempo para (C) 1cm² do filme **CS₅₀-RuNOisn** e (D) 1,77 µmol de **RuNOisn**. Condições experimentais: tampão TRIS 0,150 M, 5 mM EDTA, pH 7,4, a 37 °C.

Fonte: autoria própria.

Tabela 3. Parâmetros da liberação de NO para a reação entre a cisteína e o nitrosilo complexo de rutênio em solução (**RuNOisn**) ou imobilizado no filme (**CS₅₀-RuNOisn**)*.

Composto	[NO] _T (nmol NO) ^a	[NO] _{max} (pmol NO s ⁻¹) ^b	<i>t</i> [NO] _{max} (h) ^c	<i>t</i> _{1/2} (h) ^d	<i>t</i> _d (h) ^e
CS₅₀-RuNOisn (1 cm ²)	49 ± 5	5,6 ± 0,6	0,66 ± 0,15	1,65 ± 0,22	7,1 ± 0,5
RuNOisn	62 ± 6	6,1 ± 0,8	0,70 ± 0,19	1,85 ± 0,25	7,5 ± 0,7

*Os resultados (média e desvio padrão) são referentes a dados obtidos em três experimentos realizados nas mesmas condições, tampão TRIS 0,150 M, 5 mM EDTA, pH 7,4, 37°C; ^a Quantidade total de NO liberado(nmol); ^b Fluxo máximo da liberação de NO (pmol s⁻¹). ^c Período de tempo até o fluxo máximo de liberação de NO (h). ^d Tempo de meia-vida da liberação de NO(h). ^e Duração total da liberação de NO (h).

Fonte: autoria própria.

Na Figura 39A nota-se que a liberação de NO do filme foi iniciada após a adição de cisteína ao frasco reacional, e que o fluxo máximo de NO foi alcançado em aproximadamente 40 minutos de reação (Tabela 3). Nas condições empregadas, foram liberadas concentrações fisiologicamente relevantes de NO por mais de 7 horas a partir do filme **CS₅₀-RuNOisn**, com fluxo um médio de aproximadamente 1,9 pmol NO s⁻¹ cm⁻². Esse valor é comparável àquele produzido por células endoteliais, em que o fluxo de NO é de 1,67 pmol s⁻¹ cm⁻² ⁸³. E o tempo de meia-vida para a liberação de NO no filme foi de aproximadamente 1,6 h. Resultados similares a estes foram observados para a reação entre o complexo **RuNOisn** não-imobilizado (solução aquosa) e a cisteína (Figura 39 e Tabela 3). Esses dados sugerem que o processo de liberação de NO para o complexo **RuNOisn** não sofreu alterações significativas quando este foi imobilizado em filmes de amido, o que é consistente com dados reportados para outros nitrosilo complexos de rutênio imobilizados em diferentes matrizes ^{37,69,71}.

Os valores de *t*_{1/2} para a liberação de NO obtidos para o complexo **RuNOisn** em solução e imobilizado nos filmes de amido (Tabela 3) são comparáveis aos observados para um outro material doador de NO, constituído por dendrímeros funcionalizados com diazeniodiolatos em sua superfície ¹⁴¹. Nesses dendrímeros, o *t*_{1/2} da liberação de NO variou desde 0,30 a 4,9 horas, dependendo do grupo funcional presente na superfície do dendrímero ¹⁴¹.

O total de NO liberado (mols) durante a reação com a cisteína foi de apenas 2,5-3,5% do total de **RuNOisn** utilizado nos experimentos, tanto para o complexo em solução quanto para o imobilizado no filme (estimou-se que o total de **RuNOisn** imobilizado em 1cm² do filme **CS₅₀-RuNOisn** foi de aproximadamente 1,77 μmol). Essa discrepância entre os valores

teóricos e experimentais em relação ao total de NO liberado pode ser explicada em função de alguns dados reportados na literatura e resultados obtidos recentemente em nossos laboratórios⁹⁸. O mecanismo da reação entre nitrosilos de rutênio e redutores como a cisteína não está completamente elucidado⁵⁸. A literatura sugere que nitrosilo complexos de rutênio reagem com a cisteína formando exclusivamente NO¹⁴⁰ ou HNO¹³⁹. Entretanto, há evidências de que essa reação possa gerar ambos os produtos, NO e HNO⁹⁷⁻⁹⁸ (HNO não é detectado pelo NOA) dependendo das condições experimentais (como por exemplo, pH, excesso relativo de cisteína e potencial de redução do nitrosilo complexo)^{58,98}. O NO liberado também pode gerar outros produtos a partir da reação com cisteína. Com base nesses fatos, esse tópico está sob investigação em nossos Laboratórios.

Apesar do que foi exposto no parágrafo anterior, o presente trabalho demonstrou que redutores biológicos como a cisteína são capazes de promover a liberação de NO a partir dos filmes de amido (**CS_x-RuNOisn**). Com base nesses dados, esse material pode ser utilizado como uma potencial plataforma para o armazenamento (*scaffold*) e liberação de NO com vista a aplicações biológicas, especialmente aquelas que requerem a entrega de NO a partir de uma interface^{66,82}.

4.5. Liberação do complexo RuNOisn a partir dos filmes de amido

Com a finalidade de se verificar o perfil de liberação do nitrosilo complexo **RuNOisn** a partir dos filmes (lixiviação), amostras de **CS₅₀-RuNOisn** foram imersas em solução aquosa (CF₃COOH/CF₃COONa pH 5,0, a 37 °C), e em determinados intervalos de tempo essas amostras foram retiradas da solução, secas à temperatura ambiente e submetidas a ensaios de espectroscopia vibracional. A concentração de complexo que permaneceu imobilizada no filme foi verificada com base na intensidade do ν_{NO} , tomando-se como referência a intensidade inicial do ν_{NO} obtida antes da imersão dos filmes em solução. Conforme apresentado na Figura 40, a curva de liberação do complexo exibiu um comportamento exponencial.

Figura 40. Perfil de liberação do complexo **RuNOisn** a partir dos filmes de amido. Condições experimentais: amostras de 2cm² de **CS₅₀-RuNOisn** imersas em 2 mL de solução aquosa, pH 5,0 (CF₃COOH/CF₃COONa) a 37 °C.

Fonte: Autoria própria.

Aproximadamente 50% da concentração inicial do complexo imobilizado lixiviou-se do filme durante o primeiro dia de imersão em solução aquosa (Figura 40), e tornou-se praticamente completa no quinto dia de imersão. O tempo de meia-vida de liberação do complexo **RuNOisn** dos filmes **CS₅₀-RuNOisn** ($t_{1/2} = 26h$) foi superior ao observado para drogas-modelo (sotalol, timolol, isotiocianato de fluoresceína-dextran e albumina do soro bovino – BSA) imobilizadas em filmes de amido de batata¹⁴². Nestes, o tempo de meia-vida variou entre 0,17 e 3,37 horas, e a liberação total foi observada dentro de um período de 3 dias¹⁴² (solução de tampão fosfato, pH 7,4). Já o tempo de meia vida dessas mesmas drogas-modelo imobilizadas em filmes de amido de batata acetilado variou entre 1,8 e 2000 horas¹⁴². Esses resultados sugerem que é possível controlar o perfil de liberação de compostos imobilizados em filmes de amido por meio de modificações químicas na estrutura do amido. Isso é importante do ponto de vista de desenvolvimento de transportadores de fármacos produzidos com materiais biodegradáveis, no caso, os filmes de amido, nos quais seria possível modular o tempo de liberação das drogas de acordo com as modificações químicas na matriz em função da aplicação desejada (liberação contínua, lenta ou rápida).

Adicionalmente, o perfil de liberação observado para outros dois nitrosilo complexos de rutênio (*trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ e [Ru(NO)(Hedta)]) imobilizados em nanopartículas⁷⁰ de poli(ácido lático-co-glicólico, PLGA) foi similar ao observado no presente trabalho para o complexo **RuNOisn** imobilizado nos filmes de amido. No caso dos

complexos *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ e [Ru(NO)(Hedta)], estes foram totalmente liberados do material entre 6 e 8 dias⁷⁰

Em aplicações biológicas, a lixiviação do complexo **RuNOisn** a partir dos filmes de amido pode ser interessante em determinados casos. Essa característica do filme de amido permitiria, por exemplo, a liberação controlada do doador de NO (**RuNOisn**) em tecidos próximos ou em contato com os filmes. Outro possível uso para o filme **CS₅₀-RuNOisn** seria como um revestimento para aumentar a biocompatibilidade de dispositivos médicos implantáveis^{66,82-83}, em que o NO liberado dos filmes preveniria a agregação de plaquetas nesses dispositivos⁸². Além desses exemplos, o filme poderia ser utilizado no auxílio da cicatrização de feridas^{28,31} (especialmente em diabéticos), utilizando-se, por exemplo, os filmes de amido junto a curativos adesivos¹⁴³.

Nesse contexto cabe destacar que uma grande variedade de materiais tem sido desenvolvida objetivando-se a liberação localizada e controlada de compostos com atividade biológica¹⁴⁴. Em geral os fármacos são inseridos no interior (hidrogéis e pastilhas) ou entre os materiais de suporte (filmes camada por camada), e a sua liberação ocorre principalmente pela degradação do material, por difusão passiva ou estimulada pelo ambiente (como temperatura, pH, reação química ou eletroquimicamente)¹⁴⁴. Com base nesses fatos, os filmes de amido constituem-se uma plataforma em potencial para a incorporação de fármacos, os quais poderiam ser liberados continuamente dos filmes, e após determinado período, a matriz (amido) seria degradada pelo organismo.

4.6 Ensaios preliminares *in vivo* com os filmes de amido

Os ensaios *in vivo* realizados com os filmes de amido são ainda preliminares, mas podem auxiliar em estudos futuros. Nestes ensaios, os filmes de amido sem o complexo de rutênio foram implantados no dorso de ratos, e os resultados demonstraram que após 30 dias da implantação, os filmes foram completamente absorvidos pelo organismo dos animais.

Além desse ensaio, outros dois foram realizados com os filmes contendo o complexo de rutênio imobilizado. As amostras foram implantadas no dorso dos ratos e retiradas após 1 e 7 dias. A Figura 41A ilustra as imagens do tecido próximo ao local em que foi implantado o filme sem o complexo imobilizado (controle), e na Figura 41B, o tecido em contato com o filme contendo o complexo **RuNOisn** imobilizado (31,2 mg **RuNOisn**/g de amido).

Figura 41. Imagens obtidas por microscopia ótica dos filmes de amido implantados no dorso dos ratos: filme sem o complexo **RuNOisn** após (**A_{1d}**) 1 dia e (**A_{7d}**) 7 dias, e filme com o complexo **RuNOisn** após (**B_{1d}**) 1 dia e (**B_{7d}**) 7 dias implantado no animal. As setas indicam a aglomeração dos macrófagos.

Fonte: imagem obtida em colaboração com a Dra. Helena de Fazio Aguiar.

Os resultados iniciais indicam que houve grande agregação de macrófagos na região próxima àquela em que o filme foi implantado, sugerindo uma possível inflamação nos tecidos. Não foi possível observar diferença significativa na agregação dos macrófagos para os ensaios controle (filmes sem o complexo **RuNOisn**) com relação ao ensaio realizado com o filme contendo o complexo **RuNOisn** imobilizado. Novos ensaios com concentrações maiores de complexo **RuNOisn** serão necessários para verificar se a presença deste doador de NO pode resultar na diminuição da agregação de macrófagos e reduzir a inflamação dos tecidos. Esses ensaios são promissores, pois estudos recentes publicados pelo nosso Grupo¹⁴⁵ demonstraram que os complexos $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO)]^{3+}$ e $[Ru^{II}(NH_3)_5(L)]^{3+}$ (L = ácido

isonicotínico ou ácido nicotínico) apresentaram atividade analgésica e antiinflamatório em teste realizados *in vivo*¹⁴⁵.

5. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS FUTURAS

O complexo doador de NO *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)](BF₄)₃ (**RuNOisn**) foi imobilizado em filmes de amido de mandioca (**CS_x-RuNOisn**) sob condições brandas. Além de o amido ser um material biodegradável e de baixo custo, outra vantagem desse dispositivo é que a liberação de NO pode ser desencadeada por meio de irradiação com luz e também por redução química. Após a liberação de NO pela fotólise, o complexo imobilizado no filme foi regenerado por meio da reação com solução aquosa de nitrito de sódio. Foi realizado um ciclo de liberação de NO seguido de regeneração com nitrito, demonstrando que o filme **CS_x-RuNOisn** pode ser reciclado.

A liberação de NO desencadeada por redução foi eficientemente realizada utilizando-se cisteína como redutor. Para essa reação, a liberação de NO permaneceu por mais de 7 horas, com um fluxo médio similar ao produzido por células endoteliais. Baseado nesse resultado, o filme **CS_x-RuNOisn** é um material com potencial para ser utilizado em aplicações biológicas.

Devido às condições brandas utilizadas na produção dos filmes de amido, essa plataforma também pode ser facilmente adaptada para a incorporação de outros doadores de NO ou moléculas de interesse. Conforme proposto por Sortino³⁶, a incorporação de doadores de NO ativados por irradiação com luz juntamente a outras moléculas foto-ativáveis poderia expandir o uso desses dispositivos, resultando em materiais capazes de liberar NO simultaneamente a outros agentes terapêuticos. Os filmes de amido descritos no presente trabalho são potenciais candidatos para essa finalidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FUKUTO, J. M.; CARRINGTON, S. J.; TANTILLO, D. J.; HARRISON, J. G.; IGNARRO, L. J.; FREEMAN, B. A.; CHEN, A.; WINK, D. A. Small Molecule Signaling Agents: The Integrated Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Oxides, Oxides of Carbon, Dioxygen, Hydrogen Sulfide, and Their Derived Species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 769-793, 2012.
2. FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
3. IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.
4. IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, v. 61, n. 6, p. 866-879, 1987.
5. VINCENT, S. R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 2, p. 246-255, 2010.
6. BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
7. WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y. S.; SWITZER, C. H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 6, p. 873-891, 2011.
8. BURKE, A. J.; SULLIVAN, F. J.; GILES, F. J.; GLYNN, S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p. 503-512, 2013.
9. NAPOLI, C.; DE NIGRIS, F.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; PIGNALOSA, O.; SICA, V.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 265-279, 2006.
10. MCCLEVERTY, J. A. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 403-418, 2004.
11. GODBER, B. L. J.; DOEL, J. J.; SAPKOTA, G. P.; BLAKE, D. R.; STEVENS, C. R.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7757-7763, 2000.
12. BASU, S.; AZAROVA, N. A.; FONT, M. D.; KING, S. B.; HOGG, N.; GLADWIN, M. T.; SHIVA, S.; KIM-SHAPIRO, D. B. Nitrite Reductase Activity of Cytochrome c. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32590-32597, 2008.
13. COSBY, K.; PARTOVI, K. S.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P.; REITER, C. D.; MARTYR, S.; YANG, B. K.; WACLAWIW, M. A.; ZALOS, G.; XU, X. L.; HUANG, K. T.; SHIELDS, H.; KIM-SHAPIRO, D. B.; SCHECHTER, A. N.; CANNON, R. O.; GLADWIN, M. T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1498-1505, 2003.

14. KIM-SHAPIO, D. B.; GLADWIN, M. T.; PATEL, R. P.; HOGG, N. The reaction between nitrite and hemoglobin: the role of nitrite in hemoglobin-mediated hypoxic vasodilation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 237-246, 2005.
15. LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156-167, 2008.
16. SHIVA, S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 40-44, 2013.
17. PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.
18. ZWEIER, J. L.; WANG, P. H.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P. Enzyme-independent formation of nitric-oxide in biological tissues. **Nature Medicine**, v. 1, n. 8, p. 804-809, 1995.
19. RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. **Metal Nitrosyls**. New York: Oxford University Press, 1992. 369 p.
20. FORD, P. C.; LORKOVIC, I. M. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 993-1017, 2002.
21. IGNARRO, L. J. **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. San Diego: Academic Press 2000. p.
22. HARCOURT, R. D. The origin of the long N-N bond in N₂O₂: an ab initio valence bond study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 206, n. 3-4, p. 253-264, 1990.
23. ORENHA, R. P.; GALEMBECK, S. E. Molecular Orbitals of NO, NO⁺, and NO⁻: A Computational Quantum Chemistry Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 7, p. 1064-1069, 2014.
24. LANCASTER, J. R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 18-30, 1997.
25. MALINSKI, T.; TAHA, Z.; GRUNFELD, S.; PATTON, S.; KAPTURCZAK, M.; TOMBOULIAN, P. Diffusion of Nitric-Oxide in the Aorta Wall Monitored in-Situ by Porphyrinic Microsensors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, n. 3, p. 1076-1082, 1993.
26. THOMAS, D. D.; MIRANDA, K. M.; COLTON, C. A.; CITRIN, D.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. Heme proteins and nitric oxide (NO): The neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 3, p. 307-317, 2003.
27. WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 434-456, 1998.
28. CARPENTER, A. W.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 10, p. 3742-3752, 2012.
29. HRABIE, J. A.; KEEFER, L. K. Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate ("nitrosohydroxylamine") functional group and its oxygen-substituted derivatives. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1135-1154, 2002.

30. KEEFER, L. K. Fifty years of diazeniumdiolate research. From laboratory curiosity to broad-spectrum biomedical advances. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 11, p. 1147-1155, 2011.
31. SEABRA, A. B.; DURAN, N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1624-1637, 2010.
32. SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Nitric Oxide: State of the Art in Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 386-405, 2012.
33. TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1-2, p. 57-69, 2003.
34. TFOUNI, E.; TRUZZI, D. R.; TAVARES, A.; GOMES, A. J.; FIGUEIREDO, L. E.; FRANCO, D. W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.
35. KIM, J.; SARAVANAKUMAR, G.; CHOI, H. W.; PARK, D.; KIM, W. J. A platform for nitric oxide delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. p. 341-356, 2014.
36. SORTINO, S. Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2903-2913, 2010.
37. TFOUNI, E.; DORO, F. G.; GOMES, A. J.; DA SILVA, R. S.; METZKER, G.; BENINI, P. G. Z.; FRANCO, D. W. Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 3-4, p. 355-371, 2010.
38. HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. **Inorganic Chemistry**. San Diego, Academic Press; Berlin, New York, De Gruyter: 2001. 1884 p.
39. Web of Science. www.webofknowledge.com. Acesso em setembro de 2015.
40. MCCLEVERTY, J. A. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 403-418, 2004.
41. ENEMARK, J. H.; FELTHAM, R. D. Principles of Structure, Bonding, and Reactivity for Metal Nitrosyl Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 339-406, 1974.
42. MINGOS, D. M. P. **Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry, Biochemistry and Medicine I**. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2014. 232 p.
43. FELTHAM, R. D.; ENEMARK, J. H. Structures of Metal Nitrosyls. In: Topics in Inorganic and Organometallic Stereochemistry, . New York, Chichester, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons, 1981. v. 12, p. 352.
44. MASON, J.; LARKWORTHY, L. F.; MOORE, E. A. Nitrogen NMR spectroscopy of metal nitrosyls and related compounds. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 913-934, 2002.

45. RONCAROLI, F.; VIDELA, M.; SLEP, L. D.; OLABE, J. A. New features in the redox coordination chemistry of metal nitrosyls {M-NO⁺; M-NO center dot; M-NO⁻ (HNO)}. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p. 1903-1930, 2007.
46. BITTERWOLF, T. E. Photochemical nitrosyl linkage isomerism/metastable states. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, n. 9-10, p. 1196-1207, 2006.
47. COPPENS, P.; NOVOZHIOVA, I.; KOVALEVSKY, A. Photoinduced linkage isomers of transition-metal nitrosyl compounds and related complexes. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 861-883, 2002.
48. CORMARY, B.; LADEIRA, S.; JACOB, K.; LACROIX, P. G.; WOIKE, T.; SCHANIEL, D.; Malfant, I. Structural Influence on the Photochromic Response of a Series of Ruthenium Mononitrosyl Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 7492-7501, 2012.
49. BOTTOMLEY, F. Electrophilic Behavior of Coordinated Nitric-Oxide. **Accounts of Chemical Research**, v. 11, n. 4, p. 158-163, 1978.
50. BOEDEKER, C. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 117, n. p. 193-195, 1861.
51. PLAYFAIR, L. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 373-373, n. p. 317-340, 1849.
52. SIDGWICK, N. V. **The chemical elements and their compounds**. 1950. 1344-1346 p.
53. SWINEHART, J. H. The nitroprusside ion. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 2, n. p. 385-402, 1967.
54. BOTTOMLEY, F.; BROOKS, W. V. F.; PAEZ, D. E.; WHITE, P. S.; MUKAIDA, M. Electrophilic Behavior of Nitrosyls - the Boedeker Reaction, the Reactions of Sulfite with Nitrosyls, and the Crystal and Molecular-Structure of Cis-Bis(2,2'-Bipyridine)Chloro(Nitrosylsulphito)Ruthenium. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, v. n. 11, p. 2465-2472, 1983.
55. ALLUISETTI, G. E.; ALMARAZ, A. E.; AMOREBIETA, V. T.; DOCTOROVICH, F.; OLABE, J. A. Metal-catalyzed anaerobic disproportionation of hydroxylamine. Role of diazene and nitroxyl intermediates in the formation of N₂, N₂O, NO⁺, and NH₃. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 41, p. 13432-13442, 2004.
56. GUTIERREZ, M. M.; OLABE, J. A.; AMOREBIETA, V. T. Nucleophilic Addition Reactions of the Nitroprusside Ion - The Case of O-Methylhydroxylamine. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. n. 28, p. 4433-4438, 2012.
57. OLABE, J. A. The coordination chemistry of nitrosyl in cyanoferrates. An exhibit of bioinorganic relevant reactions. **Dalton Transactions**, v. n. 28, p. 3633-3648, 2008.
58. SOUZA, M. L.; ROVEDA JR, A. C.; PEREIRA, J. C. M.; FRANCO, D. W. New perspectives on the reactions of metal nitrosyls with thiolates as nucleophiles. **Coordination Chemistry Reviews**, v. doi:10.1016/j.ccr.2015.03.008, n. p. 2015.
59. MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Review - Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305-321, 2007.

60. MILLER, C. C.; MILLER, M. K.; GHAFARI, A.; KUNIMOTO, B. Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 8, n. 4, p. 233-238, 2004.
61. SHEKHTER, A. B.; SEREZHENKOV, V. A.; RUDENKO, T. G.; PEKSHEV, A. V.; VANIN, A. F. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 210-219, 2005.
62. GHAFARI, A.; MILLER, C. C.; MCMULLIN, B.; GHAHARY, A. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 21-29, 2006.
63. TRONCY, E.; FRANCOEUR, M.; BLAISE, G. Inhaled nitric oxide: clinical applications, indications, and toxicology. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 44, n. 9, p. 973-988, 1997.
64. ICHINOSE, F.; ROBERTS, J. D.; ZAPOL, W. M. Inhaled nitric oxide - A selective pulmonary vasodilator - Current uses and therapeutic potential. **Circulation**, v. 109, n. 25, p. 3106-3111, 2004.
65. WEINBERGER, B.; LASKIN, D. L.; HECK, D. E.; LASKIN, J. D. The toxicology of inhaled nitric oxide. **Toxicological Sciences**, v. 59, n. 1, p. 5-16, 2001.
66. RICCIO, D. A.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part I. Macromolecular scaffolds. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 10, p. 3731-3741, 2012.
67. ROVEDA JR., A. C.; FRANCO, D. W. Nitric Oxide Releasing-dendrimers: an Overview. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. p. 1-14, 2013.
68. FORD, P. C. Photochemical delivery of nitric oxide. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 34, n. p. 56-64, 2013.
69. DORO, F. G.; RODRIGUES, U. P.; TFOUNI, E. A regenerable ruthenium tetraammine nitrosyl complex immobilized on a modified silica gel surface: Preparation and studies of nitric oxide release and nitrite-to-NO conversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, n. 2, p. 405-417, 2007.
70. GOMES, A. J.; ESPREAFICO, E. M.; TFOUNI, E. trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)(2) and [Ru(NO)(Hedta)] Incorporated in PLGA Nanoparticles for the Delivery of Nitric Oxide to B16-F10 Cells: Cytotoxicity and Phototoxicity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 10, p. 3544-3554, 2013.
71. ROVEDA JR., A. C.; PAPA, T. B. R.; CASTELLANO, E. E.; FRANCO, D. W. PAMAM dendrimers functionalized with ruthenium nitrosyl as nitric oxide carriers. **Inorganica Chimica Acta**, v. 409 part A, n. Special Issue, p. 147-155, 2014.
72. TAN, L.; WAN, A.; LI, H. Ag₂S quantum dots conjugated chitosan nanospheres toward light-triggered nitric oxide release and near-infrared fluorescence imaging. **Langmuir**, v. 29, n. 48, p. 15032-15042, 2013.
73. HALPENNY, G. M.; OLMSTEAD, M. M.; MASCHARAK, P. K. Incorporation of a designed ruthenium nitrosyl in PolyHEMA hydrogel and light-activated delivery of NO to myoglobin. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 16, p. 6601-6606, 2007.
74. ROSE, M. J.; MASCHARAK, P. K. Photoactive ruthenium nitrosyls: Effects of light and potential application as NO donors. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 18-20, p. 2093-2114, 2008.

75. BURKS, P. T.; GARCIA, J. V.; GONZALEZIRIAS, R.; TILLMAN, J. T.; NIU, M.; MIKHAILOVSKY, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, F.; FORD, P. C. Nitric oxide releasing materials triggered by near-infrared excitation through tissue filters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 48, p. 18145-18152, 2013.
76. KONIG, K. Multiphoton microscopy in life sciences. **Journal of Microscopy**, v. 200, n. Pt 2, p. 83-104, 2000.
77. SMITH, A. M.; MANCINI, M. C.; NIE, S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 11, p. 710-711, 2009.
78. EROY-REVELES, A. A.; LEUNG, Y.; BEAVERS, C. M.; OLMSTEAD, M. M.; MASCHARAK, P. K. Near-infrared light activated release of nitric oxide from designed photoactive manganese nitrosyls: Strategy, design, and potential as NO donors (vol 130, pg 4447, 2008). **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6650-6650, 2008.
79. FRY, N. L.; MASCHARAK, P. K. Photoactive Ruthenium Nitrosyls as NO Donors: How To Sensitize Them toward Visible Light. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 4, p. 289-298, 2011.
80. GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. **Starch-Starke**, v. 52, n. 4, p. 118-124, 2000.
81. BECKER, T.; KUPFER, S.; WOLFRAM, M.; GORLS, H.; SCHUBERT, U. S.; ANSLYN, E. V.; DIETZEK, B.; GRAFE, S.; SCHILLER, A. Sensitization of NO-Releasing Ruthenium Complexes to Visible Light. **Chemistry-a European Journal**, v. 21, n. 44, p. 15554-+, 2015.
82. FROST, M. C.; REYNOLDS, M. M.; MEYERHOFF, M. E. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1685-1693, 2005.
83. HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 9, p. 780-789, 2006.
84. HALLEY, P. J.; AVÉROUS, L. **Starch polymers: from Genetic Engineering to Green Applications**. Oxford: Elsevier, 2014. p.
85. DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.
86. MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4-5, p. 207-233, 2007.
87. KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1088-1094, 2010.
88. BJORSES, K.; FAXALV, L.; MONTAN, C.; WILDT-PERSSON, K.; FYHR, P.; HOLST, J.; LINDAHL, T. L. In vitro and in vivo evaluation of chemically modified degradable starch microspheres for topical haemostasis. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2558-2565, 2011.

89. HALPENNY, G. M.; GANDHI, K. R.; MASCHARAK, P. K. Eradication of Pathogenic Bacteria by Remote Delivery of NO via Light Triggering of Nitrosyl-Containing Materials. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 4, p. 180-183, 2010.
90. HALPENNY, G. M.; STEINHARDT, R. C.; OKIALDA, K. A.; MASCHARAK, P. K. Characterization of pHEMA-based hydrogels that exhibit light-induced bactericidal effect via release of NO. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 20, n. 11, p. 2353-2360, 2009.
91. HEILMAN, B.; MASCHARAK, P. K. Light-triggered nitric oxide delivery to malignant sites and infection. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 371, n. 1995, p. 2013.
92. HEILMAN, B. J.; ST JOHN, J.; OLIVER, S. R. J.; MASCHARAK, P. K. Light-Triggered Eradication of *Acinetobacter baumannii* by Means of NO Delivery from a Porous Material with an Entrapped Metal Nitrosyl. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 28, p. 11573-11582, 2012.
93. BORGES, S. S.; DAVANZO, C. U.; CASTELLANO, E. E.; Z-SCHPECTOR, J.; SILVA, S. C.; FRANCO, D. W. Ruthenium Nitrosyl Complexes with N-Heterocyclic Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2670-2677, 1998.
94. GOMES, M. G.; DAVANZO, C. U.; SILVA, S. C.; LOPES, L. G. F.; SANTOS, P. S.; FRANCO, D. W. Cis- and trans-nitrosyltetraammineruthenium(II). Spectral and electrochemical properties and reactivity. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, v. n. 4, p. 601-607, 1998.
95. TFOUNI, E.; DORO, F. G.; FIGUEIREDO, L. E.; PEREIRA, J. C. M.; METZKER, G.; FRANCO, D. W. Tailoring NO Donors Metallopharmaceuticals: Ruthenium Nitrosyl Ammines and Aliphatic Tetraazamacrocycles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3643-3657, 2010.
96. TOLEDO, 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**, v. n. 9, p. 1879-1885, 2004.
97. PEREIRA, J. C. M.; CARREGARO, V.; COSTA, D. L.; DA SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q.; FRANCO, D. W. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4180-4187, 2010.
98. PEREIRA, J. C. M.; SOUZA, M. L.; FRANCO, D. W. Nitric oxide and nitroxyl products from the reaction of L-cysteine with *trans*-[RuNO(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 6, p. 1005-1011, 2015.
99. ROVEDA JR., A. C.; AGUIAR, H. D.; MIRANDA, K. M.; TADINI, C. C.; FRANCO, D. W. Light-triggered and cysteine-mediated nitric oxide release from a biodegradable starch-based film. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 41, p. 7232-7242, 2014.
100. SILVA, J. J.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 112-121, 2007.
101. BORDINI, J.; FORD, P. C.; TFOUNI, E. Photochemical release of nitric oxide from a regenerable, sol-gel encapsulated Ru-salen-nitrosyl complex. **Chemical Communications**, v. n. 33, p. 4169-4171, 2005.

102. SOUZA, A. C.; BENZE, R.; FERRAO, E. S.; DITCHFIELD, C.; COELHO, A. C. V.; TADINI, C. C. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 110-117, 2012.
103. PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. R. **Purification of laboratory chemicals**. Oxford: Pergamon Press, 1983. 662 p.
104. SHRIVER, D. F.; DREZDZON, M. A. **The Manipulation of Air-Sensitive Compounds**. New York: Wiley, 1986. p.
105. ALLEN, A. D.; BOTTOMLEY, F.; HARRIS, R. O.; REINSALU, V. P.; SENOFF, C. V. Ruthenium Complexes Containing Molecular Nitrogen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 22, p. 5595-&, 1967.
106. VOGT, L. H.; KATZ, J. L.; WIBERLEY, S. E. Crystal and Molecular Structure of Ruthenium-Sulfur Dioxide Coordination Compounds .I. Chlorotetraammine(Sulfur Dioxide)Ruthenium(2) Chloride. **Inorganic Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 1157-&, 1965.
107. FORD, H. W.; DOYLE, G. J.; ENDOW, N. Rate Constants at Low Concentrations .2. Reaction between Nitric Oxide and Ozone in Air at Room Temperature. **Journal of Chemical Physics**, v. 26, n. 5, p. 1337-1337, 1957.
108. JOHNSTON, H. S.; CROSBY, H. J. Kinetics of the Fast Gas Phase Reaction between Ozone and Nitric Oxide. **Journal of Chemical Physics**, v. 22, n. 4, p. 689-692, 1954.
109. CONESKI, P. N.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 10, p. 3753-3758, 2012.
110. DEMIRGOZ, D.; ELVIRA, C.; MANO, J. F.; CUNHA, A. M.; PISKIN, E.; REIS, R. L. Chemical modification of starch based biodegradable polymeric blends: effects on water uptake, degradation behaviour and mechanical properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 70, n. 2, p. 161-170, 2000.
111. ASTM Standard D882-10. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. West Conshohocken, PA: ASTM international. doi:10.1520/D0882-10.
112. ASTM E96/E96M - 10. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. West Conshohocken, PA: ASTM international. doi:10.1520/E0096_E0096M-10.
113. ASTM Standard F1635-11. Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. West Conshohocken, PA: ASTM international. doi: 10.1520/F1635-11
114. TITHERADGE, M. A. **Nitric Oxide Protocols** Totowa: Humana Press, 1998. 324 p.
115. MERKLE, A. C.; MCQUARTERS, A. B.; LEHNERT, N. Synthesis, spectroscopic analysis and photolabilization of water-soluble ruthenium(III)-nitrosyl complexes. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 26, p. 8047-8059, 2012.
116. MIRANDA, K. M.; NIMS, R. W.; THOMASA, D. D.; ESPEY, M. G.; CITRIN, D.; BARTBERGER, M. D.; PAOLOCCI, N.; FUKUTO, J. M.; FEELISCH, M.; WINK, D. A.

Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins - A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 93, n. 1-2, p. 52-60, 2003.

117. MILLIS, K. K.; WEAVER, K. H.; RABENSTEIN, D. L. Oxidation-Reduction Potential of Glutathione. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 4144-4146, 1993.

118. EBEWELE, R. O. **Polymer Science and Technology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2000. p.

119. RIOUX, B.; LSPAS-SZABO, P.; AIT-KADI, A.; MATEESCU, M. A.; JUHASZ, J. Structure-properties relationship in cross-linked high amylose starch cast films. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 4, p. 371-378, 2002.

120. DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. Water-Vapor and Oxygen Permeability of Wax Films. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 9, p. 867-873, 1993.

121. 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(NH₃)(4)L(NO)]³⁺ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 5, p. 1381-1388, 2004.

122. v. n. p. The {M-NO}ⁿ notation used in this paper is that of Feltham and Enemark. See Enemark, J. H.; Feltham, R. D. *Coord. Chem. Rev.* 1974, 13, 339-406.

123. ISIED, S. S.; TAUBE, H. Rates of Substitution in Cis and Trans Ruthenium(II) Aquotetraammines. **Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 3070-3075, 1976.

124. SILVA, H. A. D.; MCGARVEY, B. R.; SANTOS, R. H. D.; BERTOTTI, M.; MORI, V.; FRANCO, D. W. Sulfate as a ligand in ruthenium(II) and (III) ammines. **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie**, v. 79, n. 5, p. 679-687, 2001.

125. CODESIDO, N. O.; WEYHERMULLER, T.; OLABE, J. A.; SLEP, L. D. Nitrosyl-centered redox and acid-base interconversions in [Ru(Me₃[9]aneN₃)(bpy)(NO)]^(3,2,1+). The pK_a of HNO for its nitroxyl derivative in aqueous solution. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 981-997, 2014.

126. FREEDMAN, D. A.; KRUGER, S.; ROOSA, C.; WYMER, C. Synthesis, characterization, and reactivity of [Ru(bpy)(CH₃CN)₃(NO₂)]PF₆, a synthon for [Ru(bpy)(L₃)NO₂] complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 23, p. 9558-9568, 2006.

127. ANTONINI, E.; BRUNORI, M. **Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, Frontiers of Biology**. Amsterdam: North Holland, 1971. p.

128. EROY-REVELES, A. A.; LEUNG, Y.; MASCHARAK, P. K. Release of nitric oxide from a sol-gel hybrid material containing a photoactive manganese nitrosyl upon illumination with visible light. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 22, p. 7166-7167, 2006.

129. 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(NH₃)(4)L(NO)]⁽³⁺⁾ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 5, p. 1381-1388, 2004.

130. BIRKMANN, B.; OWENS, B. T.; BANDYOPADHYAY, S.; WU, G.; FORD, P. C. Synthesis of a nitro complex of Ru(III)(salen): Unexpected aromatic ring nitration by a nitrite salt. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 237-242, 2009.

131. KEENE, F. R.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. Nitro Complexes of Ruthenium(III) as Oxidation Catalysts . Chemically Catalyzed, Net Electrochemical Oxidation of Triphenylphosphine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 14, p. 4821-4822, 1977.
132. KEENE, F. R.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. Disproportionation at Ligand in Nitro Complexes of Ruthenium(III). **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 7, p. 2384-2387, 1977.
133. TANNENBAUM, S. R.; WEISMAN, M.; FETT, D. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 549-552, 1976.
134. KAPIL, V.; HAYDAR, S. M. A.; PEARL, V.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; AHLUWALIA, A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 55, n. p. 93-100, 2013.
135. LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 915-922, 2005.
136. CHEN, H.; SHI, H. L. A reducing environment stabilizes HIF-2 alpha in SH-SY5Y cells under hypoxic conditions. **Febs Letters**, v. 582, n. 28, p. 3899-3902, 2008.
137. WOUTERS, B. G.; WEPPLER, S. A.; KORITZINSKY, M.; LANDUYT, W.; NUYTS, S.; THEYS, J.; CHIU, R. K.; LAMBIN, P. Hypoxia as a target for combined modality treatments. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 2, p. 240-257, 2002.
138. KIZAKA-KONDOH, S.; INOUE, M.; HARADA, H.; HIRAOKA, M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. **Cancer Science**, v. 94, n. 12, p. 1021-1028, 2003.
139. RONCAROLI, F.; OLABE, J. A. The reactions of nitrosyl complexes with cysteine. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 4719-4727, 2005.
140. SILVA, F. O. N.; CANDIDO, M. C. L.; HOLANDA, A. K. M.; DIOGENES, I. C. N.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F. Mechanism and biological implications of the NO release of cis-[Ru(bpy)(2)L(NO)](n+) complexes: A key role of physiological thiols. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 624-629, 2011.
141. LU, Y.; SUN, B.; LI, C.; SCHOENFISCH, M. H. Structurally Diverse Nitric Oxide-Releasing Poly(propylene Imine) Dendrimers. **Chemistry of Materials**, v. 23, n. 18, p. 4227-4233, 2011.
142. TUOVINEN, L.; PELTONEN, S.; JARVINEN, K. Drug release from starch-acetate films. **Journal of Controlled Release**, v. 91, n. 3, p. 345-354, 2003.
143. GAO, J.; ZHENG, W. T.; ZHANG, J. M.; GUAN, D.; YANG, Z. M.; KONG, D. L.; ZHAO, Q. Enzyme-controllable delivery of nitric oxide from a molecular hydrogel. **Chemical Communications**, v. 49, n. 80, p. 9173-9175, 2013.
144. PAVLUKHINA, S.; SUKHISHVILI, S. Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 9, p. 822-836, 2011.
145. FREITAS, C. S.; ROVEDA JR, A. C.; TRUZZI, D. R.; GARCIA, A. C.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; FRANCO, D. W. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ruthenium complexes with isonicotinic and nicotinic acids (niacin) as ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 4439-4448, 2015.

Parte II

Resumo da parte II

Um novo complexo de rutênio contendo o ligante nitrosilsulfito (N(O)SO_3^-) foi isolado, *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)](\text{X})$ (isn = isonicotinamida, $\text{X} = \text{PF}_6^-$ ou SiPF_6^{2-}), e a sua estrutura cristalina determinada por difração de raio-X. A síntese desse complexo foi realizada por meio da reação entre *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ e íons sulfito (SO_3^{2-}). O ataque nucleofílico do SO_3^{2-} ocorreu no nitrogênio do ligante nitrosônio (NO) coordenado ao centro metálico de rutênio ($[\text{Ru}-\text{NO}^+]$), originando o ligante $\text{O}=\text{N}-\text{SO}_3^-$: $[\text{RuNO}^+]^{3+} + \text{SO}_3^{2-} \rightarrow [\text{Ru}(\text{N(O)SO}_3)]^+$. Observou-se que em meio aquoso, no intervalo de pH de 7,4 a 5,2 o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ é estável, e a velocidade de decomposição (labilização do ligante isn) variou de $k = 0,86$ a $3,07 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Em soluções mais ácidas (tampão ácido acético/acetato pH 4,2, 3,9, ou 1,0 M ácido trifluoroacético) o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ decompõe-se formando o respectivo nitrosilo complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}^+]^{3+}$. A reação do íon *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ com íons hidróxido (OH^-) dá origem ao respectivo nitro complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$, que foi caracterizado por RMN de ^{15}N e por espectroscopia eletrônica. As constantes de velocidade para essa reação são $k = 6,16 \pm 0,22 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à $T = 25^\circ\text{C}$, e $k = 2,15 \pm 0,07 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à $T = 15^\circ\text{C}$. A reação entre o nitrosilo complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}^+]^{3+}$ e íons OH^- também resulta na formação do nitro complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$. Neste caso, a constante de velocidade foi estimada entre $k = 47\text{--}58 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à $T = 25^\circ\text{C}$, e o valor obtido experimentalmente à $T = 15^\circ\text{C}$ foi de $k = 10,53 \pm 0,29 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O espectro eletrônico do íon complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ em meio aquoso apresentou uma banda larga com $\lambda_{\text{max}} = 362 \text{ nm}$ ($\epsilon \sim 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), atribuída por cálculos teóricos às seguintes transições: transferência de carga do metal para o ligante (TCML) $\text{Ru} \rightarrow \text{N(O)SO}_3$ e $\text{Ru} \rightarrow \text{isn}$, e também $d \rightarrow d$. Os ensaios preliminares de fotólise ($\lambda_{\text{irrad}} = 355 \text{ nm}$) do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)](\text{PF}_6)$ em solução de tampão fosfato (pH 7,4) sugerem a formação das seguintes espécies nos intervalos iniciais de fotólise: i) NO, ii) $\text{SO}_3^{\bullet-}$, e iii) isn (labilizado do complexo). O mecanismo para a formação desses produtos ainda está sob investigação.

Abstract, Section II

A new nitrosylsulphito complex bearing the ligand $(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-)$ was isolated, *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{X})$ (isn = isonicotinamide, $\text{X} = \text{PF}_6^-$ or SiPF_6^-), and its structure was determined by X-Ray crystallography. This complex was obtained by the reaction between *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ and sulfite ions (SO_3^{2-}). X-Ray results confirmed that the nucleophilic attack of the sulphite anion (SO_3^{2-}) was on the nitrogen atom of the nitrosyl ligand (NO) coordinated to the ruthenium center ($[\text{Ru}-\text{NO}^+]$), yielding the ligand $\text{O}=\text{N}-\text{SO}_3^-$: $[\text{RuNO}^+]^{3+} + \text{SO}_3^{2-} \rightarrow [\text{Ru}(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. Complex *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ is stable in aqueous solution from pH 7.4 to 5.2, and the decomposition rates (k) (due to the isn labilization) are in the range of $k = 0.86\text{--}3.07 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. In more acidic conditions, (acetate buffer pH 4.2, 3.9, and trifluoroacetic acid solution 1.0 M) complex *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ is converted into the respective nitrosyl *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}^+]^{3+}$. Reaction of *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ and hydroxide ions (OH^-) yielded the nitro complex *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$, which was characterized by ^{15}N NMR and electronic spectroscopy. Rate constants for such reaction are $k = 6.16 \pm 0.22 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25°C , and $k = 2.15 \pm 0.07 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 15°C . In the case of complex *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}^+]^{3+}$, its reaction with OH^- also yield the nitro complex *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$. The estimated rate constant for such reaction was $k = 46.9\text{--}57.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25°C , and the experimental value obtained at 15°C was $k = 10.53 \pm 0.29 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The ion complex *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ showed an intense and broad band at 362 nm ($\epsilon \sim 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in aqueous solutions, which was assigned by DFT calculations to the following transitions: metal to ligand charge transfer (MLCT) $\text{Ru} \rightarrow \text{N}(\text{O})\text{SO}_3$ and $\text{Ru} \rightarrow \text{isn}$, and $d \rightarrow d$ as well. Preliminary photolysis assays ($\lambda_{\text{irrad}} = 355 \text{ nm}$) performed with complex *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ in phosphate buffer solution (pH 7.4) suggests that the following species have been formed (in the initial photolysis period): *i*) NO, *ii*) $\text{SO}_3^{\bullet-}$, and *iii*) isn (labilized). The whole mechanism to yield such products is still under investigation.

LISTA DE FIGURAS – PARTE II

Figura 1. Possíveis reações entre sulfito e nitrito.	90
Figura 2. Estrutura das tetraaminas de rutênio com o ligante nitrosônio (NO^+) e também do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{hedta})]$. L = ligantes N-heterocíclicos ou ésteres de fósforo.	90
Figura 3. Espectros de infravermelho dos complexos $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}](\text{BF}_4)_3$, $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ e $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)_2](\text{SiF}_6)$	94
Figura 4. Estrutura Cristalina (ORTEP-3) do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)_2](\text{SiF}_6) \times 4(\text{H}_2\text{O})$	100
Figura 5. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ em D_2O (referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm).	104
Figura 6. Espectros eletrônicos dos complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ e $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ em solução aquosa, tampão fosfato pH 7,4.	105
Figura 7. Espectro experimental e teórico do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$. O espectro teórico foi obtido utilizando-se o funcional <i>b3lyp</i> e as bases <i>gdzvp</i> para o rutênio, <i>dgtzvp</i> para os ligantes NH_3 e <i>isn</i> , e <i>6-311+g(2d,3p)</i> para o fragmento NOSO_3	108
Figura 8. Variação do espectro eletrônico do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ em solução de tampão fosfato (pH 7,4, C = 20mM), T = 25°C). Gráficos inseridos: <i>ln (A) vs. tempo</i> , e também <i>(A) vs. tempo</i>	109
Figura 9. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão fosfato pH 7,4, (A) t = 0 min, (B) t = 24 h e (C) apenas o ligante isonicotinamida. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm.	110
Figura 10. Dependência da constante de velocidade para a decomposição do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa em diferentes pH's.	111
Figura 11. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão acetato (A) t = 0 min, pH 3,9, (B) t = 0 min, pH 4,2, e (C) t = 24 h, pH 3,9. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm.	112
Figura 12. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão fosfato pH 7,4, (A) t = 0 min, (B) t = 24 h e (C) apenas o ligante isonicotinamida. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm.	113
Figura 13. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão acetato em pH 5,2 (A) t = 0 min, (B) t = 24 h, e pH 3,9 (C) t = 0 min, (D) t = 24 h. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm. Fonte: Autoria própria.	114
Figura 14. Espectros de RMN de ^1H para os complexos (A) $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ e (B) $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$, ambos em solução 1,0 M de HTFA deuterado.	116
Figura 15. (A) Variação da absorbância (espectro eletrônico) em função do pH para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. (B) primeira e segunda derivadas da curva de titulação; (C) Gráfico obtido a partir da equação $\text{pH} = \text{pK}_a + \log [(A - A_M) / (A_I - A)]$ para a determinação do pK_a	117
Figura 16. Curva de titulação para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ entre os pH's 7,9 e 4,8, e ajuste da curva utilizando-se a função de Boltzman.	119

Figura 17. Variação no espectro eletrônico durante a reação entre <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)NO] ³⁺ e OH ⁻ . Espectros obtidos a cada 5 segundos; T = 25°C.	121
Figura 18. Variação no espectro eletrônico durante a reação entre <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ³⁺ e OH ⁻ . Espectros obtidos a cada 5 segundos.	121
Figura 19. Espectros de RMN de ¹⁵ N do produto da reação entre os íons OH ⁻ e (A) <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn) ¹⁵ NO] ³⁺ , ou (B) <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(¹⁵ N(O)SO ₃)] ⁺ . Como referência utilizou-se um capilar contendo ¹⁵ NH ₄ Cl, que tem δ ¹⁵ _N = 24 ppm em relação ao padrão primário NH ₃ líquido.	122
Figura 20. Curva cinética representativa da reação entre <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)NO] ³⁺ (1,0 × 10 ⁻⁴ M) e OH ⁻ (1,5 × 10 ⁻² M), T = 15°C, μ = 1,0 M (NaCl). Gráfico inserido: Curva de ln (A _{inf} - A) vs. tempo.	123
Figura 21. Dependência de k _{obs} em relação à concentração de íons OH ⁻ à T = 15°C. Condições experimentais: <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)NO] ³⁺ (C _{Ru} = 1,0 × 10 ⁻⁴ M); μ = 1,0 M (NaCl); n = 5 para cada concentração de OH ⁻	123
Figura 22. Curva cinética representativa da reação entre <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ (1,0 × 10 ⁻⁴ M) e OH ⁻ (2,0 × 10 ⁻² M), μ = 1,0 M (NaCl), T = 25°C. Gráfico inserido: Curva de ln (A _{inf} - A) vs. tempo.	124
Figura 23. Dependência de k _{obs} em relação à concentração de íons OH ⁻ à T = 15°C. Condições experimentais: <i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ C _{Ru} = 1,0 x 10 ⁻⁴ M; μ = 1,0 M (NaCl); n = 5 para cada concentração de OH ⁻	124
Figura 24. Dependência de k _{obs} em relação à concentração de íons OH ⁻ à T = 25°C. Condições experimentais: <i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ C _{Ru} = 1 × 10 ⁻⁴ M; μ = 1,0 M (NaCl); n = 5 para cada concentração de OH ⁻	125
Figura 25. Fotólise de uma solução contendo (A) RuNOSO ₃ isn (C = 1,2 × 10 ⁻⁴ M) e (B) RuNOisn (C=1,2 × 10 ⁻⁴ M). Condições experimentais: tampão fosfato pH 7,4 (Chelex 100), C =200mM, T = 25°C. λ _{irrad} = 355nm 5mJ/pulso, 10pulsos/s.	127
Figura 26. Estruturas moleculares do PTIO e do carboxi-PTIO.	129
Figura 27. Fotólise de uma solução contendo catalase (C=5,3 × 10 ⁻⁶ M) e RuNOisn (C=4,8 × 10 ⁻⁴ M). Condições experimentais: Tampão fosfato, pH 7,4, C=200mM, T = 25°C; λ = 355nm 5mJ/pulso, 10pulsos/s.	130
Figura 28. Fotólise de uma solução contendo catalase (C=5,3 × 10 ⁻⁶ M) e RuNOSO ₃ isn (C=4,8 × 10 ⁻⁴ M) fotolisada (A) entre 0 e 14 minutos, e (B) 16 a 45 minutos Condições experimentais: Tampão fosfato, pH 7,4, C=200mM (Chelex), T = 25°C; λ = 355nm 5mJ/pulso, 10pulsos/s.	130
Figura 29. Espectros de EPR obtidos antes e a após a fotólise de uma solução contendo RuNOSO ₃ isn e o captador de radical DMPO: (a) 2,0 × 10 ⁻⁴ M de RuNOSO ₃ isn + 100mM DMPO (500x excesso) em tampão fosfato pH 7,4, C=200mM, μ = 0,543 M; (b) espectro simulado; (c) solução de tampão fosfato + DMPO fotolisada por 10 min; (d) mesma solução que em (a) mas antes da fotólise. Espectros de EPR obtidos à temperatura ambiente. Soluções fotolisadas com laser λ = 355 nm, 5mJ/pulso, 10 pulsos/s.	131
Figura 30. Ilustração dos orbitais moleculares LUMO (estado fundamental) e HOMO(α) (estado excitado) para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺	132

Figura 31. Distâncias e ângulos de ligação obtidos por cálculos computacionais (DFT) para a estrutura otimizada do complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ no estado fundamental e triplete. A lista completa de ângulos e distâncias de ligação está listado na Tabela 7.	134
Figura 32. Estrutura otimizada (DFT) do complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ no estado (A) fundamental e (B) triplete.	134
Figura 33. Espectros de RMN de ¹ H para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(NO)] ³⁺ irradiado em diferentes intervalos de tempo: (A) 5 min; (B) 20 min; (C) 40 min; (D) 60 min. Complexos irradiados em tampão fosfato pH 7,4 (200mM), 25°C sob fluxo de argônio. RMN com 50% de D ₂ O e 50% de tampão com a amostra. C _{Ru} solução irradiada = 20 mM; C _{Ru} RMN = 3,1 mM.	135
Figura 34. Espectros de RMN de ¹ H para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ irradiado em diferentes intervalos de tempo: (A) 5 min; (B) 20 min; (C) 40 min; (D) 60 min. Complexos irradiados em tampão fosfato pH 7,4 (200mM), 25°C sob fluxo de argônio. RMN com 50% de D ₂ O e 50% de tampão com a amostra. C _{Ru} solução irradiada = 20 mM; C _{Ru} para RMN = 3,1 mM.	137
Figura 35. Produtos formados pela irradiação na banda de TCML do complexo [Ru(NH ₃) ₅ (py)] ²⁺ : labilização dos ligantes (a) piridina (py) e (b) amônia.	139
Figura 36. Modelo de diagramas de energia utilizados para explicar o comportamento fotoquímico dos complexos do tipo [Ru(NH ₃) ₅ (py-X)] ²⁺ (py-X = piridina ou piridina substituída): complexos (A) reativos, e (B) não-reativos.	140
Figura 37. Possíveis etapas e produtos formados durante a fotólise (λ _{irr} = 355 nm) do complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)] ⁺ em solução aquosa de tampão fosfato pH 7,4. As espécies com contorno pontilhado são aquelas que não foram identificadas por técnicas espectroscópicas, mas que podem ser formadas, e as com linha contínua correspondem às espécies identificadas pelas técnicas espectroscópicas.	142

LISTA DE TABELAS - PARTE II

Tabela 1. Potenciais redox para as espécies radicais $\text{SO}_3^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$, $\text{SO}_5^{\bullet-}$	87
Tabela 2. Distâncias e ângulos de ligação obtidos experimentalmente e por cálculo teórico (DFT) para a espécie <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]_2(\text{SiF}_6)$ no estado fundamental.	101
Tabela 3. Bandas principais na região do infravermelho (cm^{-1}) e respectivas atribuições para complexos do tipo $[\text{ML}_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^n$	103
Tabela 4. (A). Composição orbital, e (B) atribuição das bandas principais para o complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. Fonte: Autoria própria.	106
Tabela 5. Constantes de velocidade (<i>k</i>) para a reação entre <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ e <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ com íons OH^-	125
Tabela 6. Cargas de NBO calculadas para os complexos <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ e <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}(\text{SO}_3)]^+$	127
Tabela 7. Distâncias e ângulos de ligação para o complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ no estado fundamental e no estado excitado tripleto	133

LISTA DE ABREVIATURAS – PARTE II

Cat	–	catalase
DFT	–	<i>Density Functional Theory</i> (Teoria do Funcional da Densidade)
DMPO	–	5,5–dimetil-1-pirrolina N-óxido
DTFA	–	ácido trifluoroacético deuterado
EET	–	estado excitado triplete
EF	–	estado fundamental
EPR elétrons)	–	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> (Ressonância paramagnética de
HTFA	–	ácido trifluoroacético
isn	–	isonicotinamida
k_{-NO}	–	Constante de liberação de óxido nítrico
LF	–	campo ligante (do inglês <i>ligand field</i>)
LF*	–	estado excitado de campo ligante
LEES	–	<i>Lower Energy Excited State</i>
NaTFA	–	Trifluoroacetato de sódio
NBO	–	“ <i>Natural Bond Orbital</i> ”
NHE	–	eletrodo normal de hidrogênio
nic	–	nicotinamida
NO	–	óxido nítrico
NOS	–	óxido nítrico sintase
oxy-Mb	–	oximioglobina
P(OEt) ₃	–	triethylfosfito
PTIO	–	2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido 3-óxido
pz	–	pirazina
py	–	piridina
RuNOisn	–	<i>trans</i> -[Ru ^{II} (NH ₃) ₄ isn(NO)](BF ₄) ₃
RuNOSO ₃ isn	–	<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ isn(N(O)SO ₃)](PF ₆)
TCLM	–	Transferência de carga do metal para o ligante
TCLM*	–	estados excitados de Transferência de carga do metal para o ligante

TD-DFT	–	<i>Time-Dependent Density Functional Theory</i>
TMSP-D4	–	sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetradeutero propionico
δ	–	deslocamento químico
λ	–	comprimento de onda
ϵ	–	absortividade molar

Sumário

1 INTRODUÇÃO ESPECÍFICA – Parte II	86
1.1 Íon sulfito (SO_3^{2-}) e espécies radicalares relacionadas: $\text{SO}_x^{\bullet-}$	86
1.2 Sulfito como nucleófilo na reação com nitrosilo complexos: formação de nitrosilsulfito coordenado.	88
2 OBJETIVO e JUSTIFICATIVA	92
2.1 Objetivo Geral.....	92
2.2 Objetivos Específicos	92
3 MATERIAL E MÉTODOS	93
3.1. Reagentes, solventes e síntese dos complexos de rutênio	93
3.1.2 Síntese do novo complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$	93
3.2 Instrumentação	94
3.2.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR)	94
3.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	95
3.2.3 Análise elementar	95
3.3 Estabilidade do complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa	95
3.4 Determinação do pK_a do complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$	96
3.5 Reação dos complexos <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ e <i>trans</i> - $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}^+)]^{3+}$ com íons hidróxido (OH^-)	96
3.6 Ensaio fotoquímico	97
3.7 Determinação da estrutura do complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]_2(\text{SiF}_6)$ por difratometria de raio-X	98
3.8 Cálculos computacionais	99
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
4.1. Caracterização do complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$	100
4.1.1. Determinação da estrutura por difratometria de raio-X.	100
4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	102
4.1.3 Espectroscopia de RMN e de EPR.....	103
4.1.4 Espectroscopia eletrônica.....	104
4.2. Estabilidade do complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ em soluções aquosas.	109
4.2.1. Estabilidade em tampão fosfato e em tampão acetato.....	109
4.3 Determinação do pK_a do complexo <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$	117

4.4. Reação com íons OH^-	119
4.5. Ensaios fotoquímicos preliminares	127
5. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS	142
7. REFERÊNCIAS	144
ANEXO A. (A) Função de Boltzman e (B) modelo da curva utilizada para a determinação do pK_a . Os dados foram tratados com o software <i>Origin 8.5</i>	152
ANEXO B. Dados da estrutura cristalina e refinamento para o complexo <i>trans</i> - [Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃) ₂ (SiF ₆)	153
Anexo C. Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)	154
ANEXO D. Distâncias ($\text{\AA}$) e ângulos de ligação($^\circ$) para o crista do complexo <i>trans</i> - [Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃) ₂ (SiF ₆)	155
ANEXO E. Espectros de RMN de ^1H para a isonicotinamida em diferentes pH's (A) tampão fosfato pH 7,4, (B) tampão acetato, pH 5,2, e (C) tampão acetato, pH 3,9. RMN com 50% de D ₂ O e 50% de tampão com a amostra. Referência: TMSP-d ₄ , com $\delta = 0$ ppm.....	157
ANEXO F. Superfície de contorno dos orbitais do complexo <i>trans</i> - [Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)](PF ₆) listados na Tabela 4. Visão frontal, lateral e superior do complexo. Os números entre parênteses indicam a numeração do orbital.....	158
ANEXO G. Espectro eletrônico do complexo [Ru(NH ₃) ₅ NO] ³⁺ (a) antes e (b) após a reação com íons sulfito (solução aquosa, 20x de excesso de sulfito).	162
ANEXO H. Espectros de EPR para uma solução de sulfito de sódio + PTIO, irradiado com $\lambda = 355$ nm por 8 minutos (10 pulsos/s).	162
ANEXO I. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise de uma solução contendo oxiMb e sulfito de sódio (a) oxiMb (traço em azul) e (b) metMb (traço em vermelho). Condições: 5,0 μM de oxiMb, $2,0 \times 10^{-4}$ M de Na ₂ SO ₃ , em solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM); $\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm, 5mJ/pulso, T = 2 $^\circ\text{C}$, espectros adquiridos a cada 2 min de fotólise.	163
ANEXO J. Composição orbital para o estado triplete do complexo <i>trans</i> - [Ru ^{II} (NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)](PF ₆).....	163

1 INTRODUÇÃO ESPECÍFICA – Parte II

1.1 Íon sulfito (SO_3^{2-}) e espécies radicalares relacionadas: $\text{SO}_x^{\bullet-}$

O dióxido de enxofre (SO_2) é um contaminante atmosférico gerado principalmente pelo uso de combustíveis fósseis¹. As principais fontes naturais são provenientes de emissões vulcânicas e de produtos da oxidação de espécies reduzidas de enxofre, naturalmente emitidas². Esse gás é solúvel em água, onde pode formar as espécies bissulfito e sulfito (Eqs. 1 e 2). Em pH fisiológico (~7,4), ambas são espécies importantes contendo o enxofre no estado de oxidação +4 (S(IV))¹.

Uma das formas em que o sulfito pode ser introduzido no organismo humano é por meio da sua ingestão, devido ao seu uso como conservante em alimentos, sendo também encontrado em medicamentos e no vinho¹⁻². Esse tipo de emprego ocorre em virtude da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos íons sulfito e bissulfito³⁻⁴. O SO_2 inalado também pode ser considerado uma fonte de sulfito no organismo. A inalação do dióxido de enxofre pode levar à broncoconstrição em asmáticos, além de ser tóxico a células do sistema nervoso central e do pulmão⁵⁻⁸. Endogenamente, o sulfito pode ser gerado durante o metabolismo dos aminoácidos cisteína e metionina⁸⁻⁹.

A detoxificação do sulfito em animais ocorre pela oxidação de bissulfito (HSO_3^-) a sulfato, realizada pela enzima sulfito oxidase (enzima mitocondrial), em um processo que ocorre sem a formação de espécies radicalares^{4,8,10-13}. Outra rota para oxidação de bissulfito a sulfato pode ser catalisada enzimaticamente pela xantina oxidase^{4,14-16} e prostaglandina H-sintetase^{4,17}, levando à formação do radical $\text{SO}_3^{\bullet-}$ ⁴.

A toxicidade do SO_3^{2-} está relacionada às espécies radicalares derivadas desse íon, as quais podem ser geradas por via química, fotoquímica e enzimática^{8,12,17-20}. Sugere-se que no processo de oxidação do sulfito ocorra a formação dos seguintes intermediários radicalares, $\text{SO}_3^{\bullet-}$ (centrado no enxofre), $\text{SO}_4^{\bullet-}$ e $\text{SO}_5^{\bullet-}$ (centrados no oxigênio)^{4,21}, Eqs. 3–6. A autooxidação do SO_3^{2-} pode ser catalisada por íons de metais de transição, e também pode gerar as espécies radicais supracitadas, as quais são potencialmente nocivas a alvos

biológicos²²⁻²⁵, podendo levar à peroxidação de lipídeos e causar danos ao DNA²²⁻²⁴. Sugere-se que o processo de oxidação do íon SO_3^{2-} ocorre via reação em cadeia (Eqs. 3–6), onde há consumo de oxigênio:

A sequência de reações apresentadas nas Eqs. 3–6 foi sugerida após estudos realizados com radiólise de pulso e fotólise relâmpago (“*flash photolysis*”) das espécies Na_2SO_3 , NaHSO_3 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ²⁷. Os potenciais redox dos radicais $\text{SO}_3^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ e $\text{SO}_5^{\bullet-}$ também já foram determinados e são apresentadas na Tabela 1. Algumas propriedades desses radicais serão descritas a seguir.

Tabela 1. Potenciais redox para as espécies radicais $\text{SO}_3^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$, $\text{SO}_5^{\bullet-}$.

Processo Redox	Potencial (V) vs. NHE	Referência
$\text{SO}_3^{\bullet-} / \text{SO}_3^{2-}$	0,63 V (pH > 7,0)	1-2,28
	0,73 V (pH > 7,0)	21
$\text{SO}_3^{\bullet-} / \text{HSO}_3^-$	0,84 V (pH 3,6)	28-29
$\text{SO}_4^{\bullet-} / \text{SO}_4^{2-}$	2,5–3,1 V (pH 7,0)	1,30
$\text{SO}_5^{\bullet-} / \text{HSO}_5^-$	1,1 V (pH 7,0)	1,28
$\text{SO}_5^{\bullet-} / \text{SO}_5^{2-}$	0,81 V (pH > 7,0)	21

Fonte: autoria própria.

O radical $\text{SO}_3^{\bullet-}$ é um oxidante moderado, e os valores de potencial redox descritos na literatura são relativamente variados (Tabela 1). Além disso, o $\text{SO}_3^{\bullet-}$ também pode agir como redutor², conforme observado em reações entre esse radical com complexos de metais de transição inertes a reações de substituição³¹. Analogamente a outros radicais, sugere-se que a espécie $\text{SO}_3^{\bullet-}$ pode atacar moléculas orgânicas por abstração de hidrogênio^{2,26} e também ser adicionado a ligações insaturadas carbono-carbono ($\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}\equiv\text{C}$)^{1-2,29} e também $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{O}$ e

C=N³². O espectro eletrônico do SO₃^{•-} em solução aquosa apresenta banda com λ_{max} entre 250 e 260 nm^{2,27}.

O radical SO₄^{•-} é um intermediário importante nas reações de oxidação de SO₂ catalisadas por metais^{2,33}. O radical sulfato é um forte oxidante (Tabela 1), comparável ao radical hidroxila (OH[•], $E = 1,8\text{--}2,7\text{V}$ dependendo do pH^{26,30}), mas não muito reativo em reações de abstração de hidrogênio, o que torna-o mais seletivo que o radical OH[•]²⁶. O radical SO₄^{•-} também pode reagir por abstração de hidrogênio, mas em geral essas reações ocorrem com constantes de velocidade inferiores às observadas, respectivamente, para o radical OH[•]^{26,34}. Devido a essas características, o SO₄^{•-} tem sido empregado em tecnologias de descontaminação³⁵, como por exemplo, no tratamento de águas contaminadas com pesticidas³⁶ e outros poluentes³⁶⁻³⁸. Outra característica interessante é que, diferentemente de outros radicais do tipo SO_x^{•-}, o SO₄^{•-} apresenta banda na região visível do espectro, com λ_{max} entre 450–460 nm em solução aquosa^{2,27}.

O radical SO₅^{•-} (peroxisulfato) é um intermediário nas reações de oxidação de sulfito/bissulfito em solução^{2,27}. Após a oxidação do sulfito/bissulfito, o radical formado (SO₃^{•-}) pode reagir com o oxigênio molecular (Eq. 4), gerando SO₅^{•-}. Este é um oxidante mais forte que SO₃^{•-} (Tabela 1), podendo oxidar diversos compostos orgânicos^{1-2,39}, normalmente com constantes de velocidade mais rápidas do que as respectivas reações com SO₃^{•-}. O radical SO₅^{•-} pode oxidar alguns substratos, como por exemplo, a anilina e a dimetilnilina²⁹. O radical SO₅^{•-} tem uma banda de absorção relativamente larga, com $\lambda_{\text{max}} = 260\text{ nm}$ ². De acordo com esta breve descrição, é possível inferir que os radicais do tipo SO_x^{•-} são interessantes, tanto do ponto de vista da química fundamental como também das possíveis aplicações dessas espécies em reações químicas e na descontaminação de águas.

Outra característica interessante dos íons sulfito está relacionada aos estudos desse íon em reações nucleofílicas com nitrosilos metálicos⁴⁰⁻⁴¹, tópico este que será abordado a seguir.

1.2 Sulfito como nucleófilo na reação com nitrosilo complexos: formação de nitrosilsulfito coordenado.

Os primeiros trabalhos que trataram da reação entre o íon sulfito (SO₃²⁻) e nitrosilo complexos foram realizados por Boedeker em 1861⁴¹⁻⁴². Verificou-se que a reação entre o complexo [Fe(CN)₅NO]²⁻ e SO₃²⁻ formava um produto vermelho escuro, caracterizado como

sendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{4-}$ ^{41,43}. Essa reação ficou conhecida como “reação de Boedeker”⁴¹. O complexo de ferro formado, $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{4-}$, decompõem-se em solução^{41,43-44}, e o produto final é descrito como sendo o complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{SO}_3)]^{5-}$ ⁴¹.

Uma dúvida inicial em relação à estrutura do complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{4-}$ foi o modo pelo qual o sulfito estava ligado ao NO ⁴⁵. Uma das propostas era a de que a ligação ocorria entre o átomo de enxofre ou de oxigênio do SO_3^{2-} com o nitrogênio do NO ⁴¹. A segunda proposta sugeria que o átomo de enxofre do SO_3^{2-} estaria ligado ao oxigênio do NO ^{41,45-46}. Foi então que em 1983, Bottomley *et al.*⁴¹ obteve cristais do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{bipy})_2(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]$ (bipy = 2,2'-bipiridina) e verificou por difratometria de raio-X, que na verdade o SO_3^{2-} estava ligado ao nitrogênio do NO pelo átomo de enxofre, gerando o ligante $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$. Bottomley também sintetizou outros complexos contendo o ligante nitrosilsulfito $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$, *trans*- $[\text{RuCl}(\text{py})_4(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]$ (py = piridina) e *cis*- $[\text{RuBr}(\text{bipy})_2(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]$, mas não obteve cristais. O mesmo insucesso ocorreu com relação à tentativa de obtenção de cristais do complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{4-}$ ⁴¹.

Apesar da dúvida em relação à forma da ligação do íon sulfito ao nitrosilo complexo ter sido esclarecida por Bottomley, pouco se adiantou no conhecimento da reatividade dos nitrosilsulfito complexos até o momento. Além disso, de nosso conhecimento, nenhum ensaio fotoquímico foi realizado com essa classe de complexos. Apesar de o ânion nitrososulfonato ($\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$) e a respectiva espécie protonada ainda não terem sido isoladas⁴¹, o $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$ é descrito como um intermediário na síntese de Raschig da hidroxilamina^{41,47}. O ânion $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$ também pode ser formado no estômago³, pela reação entre HSO_3^- e HNO_2 (respectivamente provenientes do sulfito e nitrito/nitrato presentes em diversos alimentos)³. Diversas espécies podem então ser formadas a partir dessa reação, conforme ilustrado na Figura 1. Esses fatos ressaltam a importância dos estudos sobre o conhecimento da reatividade da espécie $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$, que, como já mencionado, ainda foi muito pouco explorada.

Figura 1. Possíveis reações entre sulfito e nitrito.

Fonte: referência ³

De acordo com o que foi discutido na introdução da *Parte I* deste trabalho (seção 1.3), o nosso Grupo acumulou experiência sobre a reatividade e as aplicações biológicas de tetraaminas de rutênio, de fórmula geral $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO^+)]^{3+}$ (L= N-heterocíclicos ou ésteres de fósforo) e também $[Ru(NO)(hedta)]$, Figura 2⁴⁸⁻⁵⁵. Um dos temas abordados em nosso Grupo é a reatividade dos nitrosilos complexos com nucleófilos, tais como OH^- e espécies contendo enxofre (ex: cisteína, glutatona)⁵⁵⁻⁵⁷. Isso nos motivou a estudar a reação entre o complexo $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(isn)(NO^+)]^{3+}$ (isn = isonicotinamida) e o ânion sulfito (SO_3^{2-}) como nucleófilo.

Figura 2. Estrutura das tetraaminas de rutênio com o ligante nitrosônio (NO^+) e também do complexo $[Ru(NO)(hedta)]$. L = ligantes N-heterocíclicos ou ésteres de fósforo.

Fonte: autoria própria.

Com base no exposto, a *Parte II* do presente trabalho descreve a síntese, a caracterização, estudos de estabilidade e a reatividade química e fotoquímica do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺, que foi obtido pela reação entre o complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)]³⁺ e o nucleófilo SO₃²⁻ em solução aquosa.

2 OBJETIVO e JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo estudar a reatividade do íon N(O)SO_3^- coordenado a complexos de rutênio. Estudos com esse íon são escassos e os poucos complexos reportados até o momento contendo o N(O)SO_3^- como ligante são pouco solúveis em solventes com os quais não são reativos⁴¹. Pretende-se, portanto, contribuir para o melhor entendimento das propriedades químicas do ligante N(O)SO_3^- utilizando-se o complexo modelo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a reatividade térmica e fotoquímica do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ em solução aquosa, e identificar os possíveis produtos formados;
- Estudar a reação do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ com íons hidróxido (OH^-);
- Compreender melhor as características eletrônicas do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ com o auxílio de cálculos teóricos (DFT).

A partir desses estudos, será possível compreender os efeitos que o ataque nucleofílico do íon sulfito acarretará na reatividade do nitrosilo complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$. Além disso, os ensaios realizados com o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N(O)SO}_3)]^+$ servirão de base para a modelagem de novos nitrosilsulfito complexos com características desejáveis para um determinado estudo e/ou aplicação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes, solventes e síntese dos complexos de rutênio

Os reagentes, as sínteses e os solventes utilizadas na *Parte II* deste trabalho foram os mesmos descritos nas seções 3.1 e 3.2 da *Parte I*. Isso também é válido para o caso da instrumentação utilizada nos ensaios de espectroscopia eletrônica e vibracional (IV). Os demais detalhes de síntese e de instrumentação que se aplicam para a *Parte II* serão apresentados nos tópicos seguintes.

3.1.2 Síntese do novo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆)

O nitrosilsulfito complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) (abreviado como **RuNOSO₃isn**) foi sintetizado a partir da reação entre o complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)](BF₄)₃ (50 mg, n = 8,6 × 10⁻⁵ mol) e o sulfito de sódio (Na₂SO₃, 43 mg, n = 3,4 × 10⁻⁴ mol) em água deionizada (V = 1,0 mL), à T=15°C sob agitação vigorosa. Após a adição de NH₄PF₆ (210 mg, n = 1,29 × 10⁻³ mol), seguido de refrigeração (15-20 min em banho de gelo ou refrigerador), cristais de um complexo de cor verde foram obtidos: *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆). Em uma síntese realizada de forma análoga, mas empregando-se um volume maior de água (4,0 mL de água deionizada ao invés de 1,0 mL), também obteve-se um sólido de cor verde, o qual foi formado após 24h sob refrigeração. Verificou-se que esse produto tem a mesma estrutura do complexo supracitado, mas foi isolado com outro contra-íon (SiF₆²⁻ ao invés de PF₆⁻), *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆)·4(H₂O), conforme apresentado na Figura 3 (de acordo com resultados reportados na literatura, o íon SiF₆²⁻ é uma impureza presente no sal NH₄PF₆)^{48,58}.

Na Figura 3 estão representados os espectros de infravermelho dos complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)NO](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) e *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆). Nesta figura estão indicadas as bandas referentes aos fragmentos NO, SO, PF₆, SiF₆ e BF₄ nesses complexos. É possível verificar na Figura 3 que os complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ com contra-íons SiF₆²⁻ e PF₆⁻ apresentaram espectros muito similares, com exceção das bandas na região de 845-833 e 558 cm⁻¹ (atribuídas a νPF₆ e δPF₆) e em 740 e 480 cm⁻¹ (νSiF₆ e δSiF₆). Os demais resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho serão discutidos de forma mais aprofundada no tópico “*Resultados e discussão*”.

Figura 3. Espectros de infravermelho dos complexos $trans\text{-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}](\text{BF}_4)_3$, $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ e $trans\text{-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)_2](\text{SiF}_6)$.

Fonte: autoria própria.

Os dados discutidos acima sugerem, obviamente, que o volume de água utilizado na síntese influencia no tempo necessário para a formação dos cristais, o que conseqüentemente, resultou na possibilidade de obtenção de complexos com contra-íons diferentes (SiF_6^{2-} ou PF_6^-). Em função disso, para os demais experimentos, o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ foi obtido a partir da síntese realizada com menor volume (1,0 mL), gerando assim apenas o complexo com contra-íon PF_6^- . Rendimento: 65–75%.

3.2 Instrumentação

3.2.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR)

Os espectros de EPR foram obtidos em um espectrômetro Bruker EMX Plus banda-X com as amostras em temperatura ambiente ou de nitrogênio líquido (77 K). Nas reações envolvendo a formação de radicais, utilizou-se o captador DMPO (5,5–dimetil-1-pirrolina N-

óxido), e neste caso, os espectros foram adquiridos em temperatura ambiente. Os espectros foram simulados com o auxílio do programa *Bruker WinEPR Simfonia*.

3.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os ensaios de RMN foram realizados em um espectrômetro Agilent 500 MHz. O óxido de deutério (D₂O) foi empregado como solvente, e o sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionico (TMSP-D₄, $\delta_{1H,13C} = 0$ ppm) foi utilizado como referência. Para os experimentos de ¹⁵N preparou-se um capilar contendo uma solução 0,1 mol/L de cloreto de amônio marcado (¹⁵NH₄Cl) em HCl (1,0 mol/L) como padrão externo (¹⁵NH₄Cl, $\delta_{15N} = 24$ ppm em relação ao padrão primário NH₃ líquido).

3.2.3 Análise elementar

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada em um Analisador Elementar Perkin Elmer 2400 Series ii, alocado na Central Analítica de Instrumentação do Instituto de Química da USP de São Paulo.

3.3 Estabilidade do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em solução aquosa

Os ensaios de estabilidade para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em solução aquosa foram realizados em diferentes valores de pH: para pH entre 6,2–7,4 utilizou-se tampão fosfato, C = 20mM, $\mu = 0,22$ M (trifluoroacetato de sódio, NaTFA); e para os ensaios com pH entre 3,9–5,6, utilizou-se tampão ácido acético/acetato, C = 20mM, $\mu = 0,22$ M (NaTFA). O curso da reação foi acompanhado por espectroscopia eletrônica, e a concentração de complexo utilizada foi de C_{Ru} = $6,4 \times 10^{-5}$ M. Os produtos formados também foram identificados por RMN de ¹H. Para este experimento, os complexos foram irradiados nas mesmas condições supracitadas nos ensaios cinéticos acompanhados por espectroscopia eletrônica (tampão fosfato e tampão acetato), com exceção da concentração dos complexos, que foi 5 vezes maior para o RMN (C_{Ru} = $3,2 \times 10^{-4}$ M).

A estabilidade do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em soluções mais ácidas (1,0 M HTFA) também foi realizada, e nesses experimentos, os produtos formados foram identificados por espectroscopia eletrônica e RMN de ¹H.

3.4 Determinação do pK_a do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺

A determinação do pK_a do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ foi realizada espectrofotometricamente⁵⁹, por meia da titulação desse complexo com ácido trifluoroacético (HTFA). Nesse método, a relação entre pH, pK_a e a absorbância é a seguinte (Eq. 7)⁵⁹:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{(A - A_M)}{(A_I - A)} \quad (7)$$

em que A = absorbância observada (A = A_I + A_M); A_M = Absorbância da espécie molecular; A_I = absorbância da espécie ionizada⁵⁹.

Uma solução aquosa (20 mL) com pH 7,9 e força iônica μ = 0,1 M (trifluoroacetato de sódio, NaTFA) contendo o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ (C = 1,8 × 10⁻⁴ M) foi titulada com pequenos volumes (2 – 5 μL) de HTFA com concentração entre 0,01 e 1,0 M. Por meio do ajuste linear da curva de $\log \frac{(A - A_M)}{(A_I - A)}$ vs. pH, foi possível determinar o pK_a⁵⁹. O pK_a também foi determinado por meio da primeira e segunda derivada da curva de titulação.

Além desses métodos, o pK_a foi estimado por meio do uso de um tratamento matemático, *Função de Boltzmann*⁶⁰⁻⁶¹ (Anexo A), com o auxílio do software *Origin 8.5*, conforme será discutido mais detalhadamente na seção “*Resultados e Discussão*”.

3.5 Reação dos complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ e *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)]³⁺ com íons hidróxido (OH⁻)

A reação dos complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ e *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO⁺)]³⁺ com íons hidróxido foi realizada de acordo com procedimento previamente descrito para complexos semelhantes⁵⁷, sob condições de pseudo-primeira ordem. Isso significa que para cada reação estudada (A + B → C) um dos reagentes foi mantido em uma concentração pelo menos dez vezes maior que o outro. A lei que descreve a

reação para o caso de B em excesso é a seguinte: $k_{obs} = k[B]$. A linearidade obtida no gráfico k_{obs} vs. $[B]$, fornece através da inclinação da reta, a constante de reação de segunda ordem, k ($M^{-1}s^{-1}$). As constantes de velocidade de pseudo primeira ordem foram determinadas a partir dos gráficos de $\ln(A_{inf} - A_t)$ vs. tempo (Eq. 8):

$$\ln(A_{inf} - A_t) = k_{obs} \cdot t \quad (8)$$

em que:

A_{inf} = absorbância final

A_t = absorbância em cada tempo da reação

k_{obs} = constante de velocidade de pseudo primeira ordem

Para os experimentos cinéticos, foram utilizadas soluções de OH^- com concentração entre 0,01 M e 0,045 M (determinada pela titulação com biftalato de potássio), com força iônica $\mu = 1,0$ M (NaCl), $T = 15$ e 25 °C⁵⁷, e com concentração de complexo $C_{Ru} = 1,0 \times 10^{-4}$ M. Pelo menos cinco repetições foram realizadas para cada concentração, e as constantes de velocidade (k) foram obtidas por meio da regressão linear do gráfico de k_{obs} vs. $[OH^-]$. Os produtos formados na reação entre os íons OH^- e os complexos *trans*- $[Ru(NH_3)_4(isn)(^{15}N(O)SO_3)]^+$ e *trans*- $[Ru(NH_3)_4(isn)(^{15}NO)]^{3+}$ foram identificados por meio de espectroscopia eletrônica e RMN de ^{15}N .

3.6 Ensaios fotoquímicos

Os ensaios fotoquímicos foram realizados em cubeta de quartzo, com caminho ótico de 1,0 cm. A fonte de luz ultravioleta (UV) foi um laser Nd:YAG (Continuum, model Serulite-II) operando no terceiro harmônico ($\lambda = 355$ nm). A energia de cada pulso foi medida por meio de um Medidor de Energia (Coherent, Lasermate-P) e esta foi ajustada para 5 mJ/pulso; a frequência de pulsos foi de 10 pulsos/s. O curso da reação foi acompanhado por espectroscopia eletrônica.

Para a obtenção do espectro de RMN de 1H , após as amostras serem irradiadas em tampão fosfato (pH 7,4, $C = 200$ mM), foram transferidas ao tubo de RMN contendo D_2O . A solução final foi constituída de 50% das soluções do complexo irradiado (em tampão) e 50%

de D₂O. TMSP-D4 ($\delta_{\text{H},13\text{C}} = 0$ ppm) foi utilizado como referência.

Para os ensaios de EPR, soluções contendo o complexo de rutênio foram irradiadas à temperatura ambiente, e então congeladas à temperatura de N₂ líquido (77 K) para a obtenção dos espectros. Para a identificação das espécies radicais de enxofre empregou-se o captador de radicais (*spin trap*) DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido)⁶². Neste caso, os espectros de EPR foram adquiridos à temperatura ambiente. Nos ensaios utilizando-se catalase (fígado bovino, 2,000-5,000 unidades/mg, Sigma) como captador de NO⁶³, soluções-estoque foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,4), e então diluídas até à concentração desejada (em 403 nm, $\epsilon = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Outros eventuais detalhes experimentais, tais como temperatura e excesso de DMPO utilizados, serão descritos na legenda das figuras.

3.7 Determinação da estrutura do complexo

trans-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) por difratometria de raio-X

A determinação da estrutura do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) foi realizada em colaboração com o Prof. Eduardo Ernesto Castellano, do Instituto de Física da USP de São Carlos.

Um cristal com coloração verde e com dimensões de $0,276 \times 0,221 \times 0,065 \text{ mm}^3$ foi selecionado e montado em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD com radiação MoK α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) monocromatizada por cristal de grafite. Os dados foram coletados à temperatura ambiente, utilizando-se até 52° em 2θ , e os parâmetros finais da cela unitária foram baseados em todas as reflexões. A coleta de dados foi realizada utilizando-se o programa *COLLECT*⁶⁴; a integração e o dimensionamento das reflexões foram efetuadas com o sistema de programas HKL Denzo-Scalepack⁶⁵. Correções de absorção numérica foram aplicadas, e a estrutura foi resolvida utilizando-se métodos diretos com o programa *SHELXS-97*⁶⁶. Os modelos foram refinados por matriz de mínimos quadrados F2 usando *SHELXL-97*⁶⁶ em um grupo espacial P2₁/c. Todos os átomos de hidrogênio foram posicionados estereoquimicamente e refinados com o modelo de *riding*, com exceção dos hidrogênios das moléculas de água, os quais foram localizados por meio do mapa diferencial, e refinados com restrições geométricas livres. A Figura 4 foi preparada utilizando-se o programa ORTEP-3 para Windows⁶⁷. A listagem das coordenadas atômicas e dos parâmetros equivalentes de deslocamento isotrópicos, distâncias de ligação intramolecular e ângulos, coordenadas dos

hidrogênios, e do parâmetro anisotrópico termal (ANEXOS B, C e D), foram disponibilizados e depositados em “*Cambridge Crystallographic Data Centre*”, com número de referência CCDC 1430828.

O íon SiF_6^{2-} está situado em um centro de simetria do cristal, contribuindo assim, com apenas uma carga negativa para cada complexo de rutênio, os quais estão localizados em posições gerais.

3.8 Cálculos computacionais

Todos os cálculos teóricos foram realizados utilizando-se o programa Gaussian 09 (G09)⁶⁸ empregando-se o método de Teoria do Funcional de Densidade⁶⁹⁻⁷⁰ (DFT, do inglês *Density Functional Theory*) com três parâmetros híbrido-funcional Becke's⁷¹ e gradiente corrigido de correlação funcional Lee-Yang-Parr's⁷² (B3LYP). A base *DGDZVP* (Degauss Duplo Zeta Valência Polarizada)⁷³⁻⁷⁴ foi utilizada em todos os cálculos para o átomo de rutênio, *DGTZVP* (Degauss Triplo Zeta Valência Polarizada)⁷³⁻⁷⁴ para os átomos de C, H, N e O (com exceção do ligante $-\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$), e *6-311+g(2d,3p)*⁷⁵⁻⁷⁶ para o ligante $-\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$.

As geometrias dos complexos no estado fundamental e triplete foram otimizadas na presença do solvente água através do Modelo Contínuo de Polarizabilidade⁷⁷ (Polarizable continuum model - PCM). O critério de convergência de campo auto-consistente (Self consistent field - SCF) foi empregado em todos os cálculos. Os estados tripletes de menor energia foram calculados utilizando-se B3LYP-unrestricted (UB3LYP) e as componentes α e β foram analisadas. Os espectros de absorção teóricos foram obtidos utilizando-se TD-DFT, com 80 estados excitados.

As populações dos orbitais foram calculadas e usadas na obtenção das superfícies de contorno, as quais foram geradas posteriormente no programa Gaussview 05. A análise da população orbital e dos dados de TD-DFT foram realizadas com o auxílio do programa GaussSum 3.0.⁷⁸

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆).

4.1.1. Determinação da estrutura por difratometria de raio-X.

A reação entre o nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)NO](BF₄)₃ com SO₃²⁻ originou cristais com coloração verde, e verificou-se por difratometria de raio-X que se tratava do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)₂](SiF₆). A representação ORTEP desse complexo é apresentada na Figura 4. Nessa estrutura, o ligante isonicotinamida está perpendicular ao plano formado pelas quatro aminas equatoriais e na bissetriz dos dois ângulos opostos N–Ru–N formados pelas aminas N(2), N(3), e N(4), N(5) (Figura 4). O ângulo O(1)–N(1)–S(1) é praticamente coplanar ao plano da isonicotinamida, e quatro moléculas de água também podem ser observadas na estrutura de raio-X. O ângulo da ligação N(1)–Ru–N(6) é próximo da linearidade, com 178,76(11)° (Tabela 2), similar ao observado para nitrosilo complexos análogos⁷⁹⁻⁸⁰ e também para o nitro complexo *trans*-Ru(NH₄)P(OEt)₃(NO₂)](PF₆) (P(OEt)₃ = trietilfosfito), onde o ângulo é de 178,47(7)°⁸¹. A distância das ligações S(1)–O(11, 12, 13) está na faixa de 1,396–1,433 Å, e o ângulo da ligação O(12)–S–O(13) é de 114,5(6)°. Para o sal Na₂SO₃, esses valores são, respectivamente, 1,53 Å e 107,4°⁸².

Figura 4. Estrutura Cristalina (ORTEP-3) do complexo *trans*-Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)₂(SiF₆)×4(H₂O).

Fonte: autoria própria / colaboração do Prof. Eduardo Ernesto Castellano (IFSC/USP).

Tabela 2. Distâncias e ângulos de ligação obtidos experimentalmente e por cálculo teórico (DFT) para a espécie *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) no estado fundamental.

Distância (Å)		
Ligação	Experimental	Calculado (DFT)
Ru–N(1)	1,881(3)	1,949
N(1)–O(1)	1,242(4)	1,209
N(1)–S(1)	1,839(3)	1,944
S(1)–O(11,12, 13) ^a	1,396–1,433	1,455–1,468
Ru–N(2, 3,4, 5) ^b	2,116–2,142	2,176–2,187
Ru–N(6)	2,161(3)	2,228
Ângulo da ligação (°)		
Ligação	Experimental	Calculado (DFT)
Ru–N(1)–O(1)	125,6 (2)	124,78
Ru–N(1)–S(1)	124,03(16)	123,27
O(1)–N(1)–S(1)	110,4(2)	111,86
N(1)–Ru–N(6)	178,76(11)	177,42
O(12)–S–O(13)	114,5(6)	114,40–115,74

^a Faixa observada para as três ligações S–O; ^b Faixa observada para as quatro ligações Ru–NH₃.

Fonte: Autoria Própria

Para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆), a distância da ligação Ru–N(O)SO₃ é aproximadamente 0,24 Å mais curta que a média da respectiva ligação Ru–NH₃ nesse complexo (Tabela 2), e tem o valor de 1,88 Å, indicando que existe um aumento na ordem de ligação (em relação à Ru–NH₃) devido à interação π na ligação Ru–N(O)SO₃⁸³. No caso de nitrosilo complexos de estrutura análoga, *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(N(O))]³⁺, a distância da ligação Ru–NO é de 1,741 Å para L = ácido isonicotínico⁷⁹, e 1,752 Å para L = nicotinamida⁸⁰, sugerindo que há maior retrodoação no caso dos nitrosilo complexos em relação ao complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆). Com base nesses dados, nota-se que o ataque nucleofílico do sulfito no nitrosilo complexo resultou no enfraquecimento da ligação Ru–N(O)SO₃ com relação à ligação Ru–NO (no nitrosilo), provavelmente devido à menor interação π do ligante N(O)SO₃ com o centro metálico. Isso estaria de acordo com o ângulo da ligação Ru–N–O que é praticamente linear (180°) no caso dos nitrosilo complexos, o que confere maior sobreposição do orbital $d\pi$ do metal com o orbital π^* do NO, e que no caso do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) tem o ângulo de 125,6(2)° (Tabela 2). Este ângulo é similar ao observado no caso de nitrosilo complexos com estrutura eletrônico {MNO}⁸ (discutido na Introdução geral deste trabalho – Parte I). Também é similar ao ângulo

da ligação Ru–N–O observado para o nitro complexo *trans*-Ru(NH₄)P(OEt)₃(NO₂)](PF₆), que tem o valor de 120,9° para um dos átomos de oxigênio, e de 121,4° para o outro ⁸¹.

As distâncias e os ângulos de ligação obtidos por cálculos quânticos (DFT) também estão listados na Tabela 2, e esses valores estão dentro de uma faixa satisfatória em relação aos obtidos experimentalmente.

As distâncias e os ângulos de ligação da fração [Ru–N(O)SO₃] do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) estão muito próximos (<0,4 Å, e <4°) dos resultados observados para o complexo *cis*-[RuCl(bipy)₂(N(O)SO₃)] (bipy = 2,2'-bipiridina)⁴¹. Isso sugere que, apesar das esferas de coordenação desses dois complexos serem bastante distintas, não houve variação significativa nos ângulos e nas distâncias de ligação no fragmento [Ru–N(O)SO₃] da molécula. A partir desse resultado, pode-se, portanto, inferir que a reatividade do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) é provavelmente similar àquela descrita para o complexo *cis*-[RuCl(bipy)₂(N(O)SO₃)]⁴¹.

Os resultados de análise elementar para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) × 4 H₂O foram o seguinte, teórico: C =14,17% / H = 4,36% / N = 19,28%, e experimental C =14,63% / H = 4,15% / N = 19,49%. A diferença entre o resultado teórico e experimental foi de no máximo 5,1%, e esses resultados são condizentes com a estrutura determinada por difração de Raio-X, *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]₂(SiF₆) × 4 H₂O.

4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Uma parte dos resultados obtidos por espectroscopia vibracional foi apresentado na seção 3.1.2 (“*Material e métodos*”), onde discutiu-se a obtenção de complexos com contra-íons diferentes SiF₆²⁻ ou PF₆⁻. Os demais resultados serão apresentados e discutidos a seguir.

Na Figura 3 estão ilustrados os espectros de infravermelho dos complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)NO](BF₄)₃ (**RuNOisn**) e *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]X (X= SiF₆²⁻ ou PF₆⁻). O νNO observado para o complexo **RuNOisn** em 1933 cm⁻¹ está deslocado para 1366 cm⁻¹ no caso do complexo **RuNOSO₃isn**, região similar à reportada para complexos contendo o ligante –NO₂ (nitro), os quais apresentam νNO entre 1320 e 1470 cm⁻¹ ⁸⁴. Esse resultado é consistente com o enfraquecimento da ligação N–O para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ (distância N–O = 1,242 Å) em comparação a nitrosilo

complexos análogos *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)NO]³⁺ (L = nicotinamida ou ácido isonicotínico), em que a distância da ligação N–O é de ~1.13 Å⁷⁹⁻⁸⁰.

Na Tabela 3 são apresentadas as bandas principais no espectro de infravermelho e as respectivas atribuições para diversos complexos do tipo [ML₅(N(O)SO₃)]ⁿ⁴¹. Os dados obtidos no presente trabalho para o complexo **RuNOSO₃isn** estão dentro da faixa observada para os demais complexos do tipo [ML₅(N(O)SO₃)]ⁿ⁴¹. É possível notar que apesar da diferença na esfera de coordenação dos diversos complexos [ML₅(N(O)SO₃)]ⁿ (Tabela 3), as bandas relacionadas aos modos vibracionais do ligante N(O)SO₃⁻ apresentaram uma variação de no máximo 30 cm⁻¹. Para os respectivos nitrosilo complexos dos compostos apresentados na Tabela 3 a variação no valor do νNO está entre 1910 cm⁻¹ para *trans*-[RuCl(py)₄(N(O)SO₃)] e 1945 cm⁻¹ para Cs₄[Fe(CN)₅(N(O)SO₃)]⁴¹. Mais dados seriam necessários para verificar se existe alguma correlação entre o νNO observado para os complexos do tipo [ML₅(N(O)SO₃)]ⁿ e [ML₅(NO)]ⁿ.

Tabela 3. Bandas principais na região do infravermelho (cm⁻¹) e respectivas atribuições para complexos do tipo [ML₅(N(O)SO₃)]ⁿ.

Complexo	Atribuição*					
	νN–O	ν _{assim} (S–O)	ν _{sim} (S–O)	ν _{sim} (S–O)	δ _{assim} (O–N–S)	δ _{assim} (O–S–O)
Cs ₄ [Fe(CN) ₅ (N(O)SO ₃)] ^a	1357s	1252s	1229s	1041s	758w	621s
<i>trans</i> -[RuCl(py) ₄ (N(O)SO ₃)] ^a	1346s	1273sh	1258s	1031s	770	604
<i>cis</i> -[RuBr(bipy) ₂ (N(O)SO ₃)] ^a	1372s	1270sh	1255s	1040s	775	605s
<i>cis</i> -[RuCl(bipy) ₂ (N(O)SO ₃)] ^a	1370s	1267sh	1250s	1038s	775	612
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (isn)(N(O)SO ₃)](PF ₆) ^b	1366s	1263sh	1225s	1040s	778m	623s

^aref.⁴¹; ^bpresente trabalho; *s = forte; m = média; w = fraca; sh = ombro

Fonte: Autoria Própria.

4.1.3 Espectroscopia de RMN e de EPR

Soluções do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) em D₂O foram caracterizadas por RMN de ¹H. Dois dubletos foram observados com deslocamento químico (δ) de 8,87 e 8,13 ppm (Figura 5), atribuídos, respectivamente aos hidrogênios nas posições orto e meta do ligante isonicotinamida. O deslocamento químico observado para os dois dubletos da isonicotinamida livre (não-coordenada) está na faixa de 8,70–8,74 ppm e 7,76–7,85 ppm, e esta pequena variação ocorre em função do pH utilizado no ensaio (Anexo E). No caso do complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)](BF₄)₃ os sinais observados para o ligante isonicotinamida coordenado apresentam deslocamento químico igual a 8,73 e 8,24 ppm.

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H para o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ em D_2O (referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm).

Fonte: Autoria própria.

O complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ não apresentou sinal no espectro de EPR ($T = 77$ K), o que sugere spin eletrônico $S = 0$ no estado fundamental, analogamente ao resultado observado para o nitrosilo complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})](\text{BF}_4)_3$ ^{48,85}. Esse resultado sugere que o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ pode formalmente ser descrito como Ru^{II} e $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3^-$, analogamente a outros complexos do tipo $[\text{ML}_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^n$ ⁴¹.

4.1.4 Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos dos complexos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ em tampão fosfato são apresentados na Figura 6.

Figura 6. Espectros eletrônicos dos complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ e $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ em solução aquosa, tampão fosfato pH 7,4.

Fonte: Autoria própria.

A adição nucleofílica do íon SO_3^{2-} no nitrosilo complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ resulta na formação de uma banda em 362 nm ($\epsilon = 6,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Figura 6. Resultados similares foram observados para a reação entre os nitrosilo complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})(\text{NO})]^{3+}$ com outro nucleófilo, OH^- , que resultaram na formação de nitro complexos do tipo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})(\text{NO}_2)]^+$, os quais tem $\lambda_{\text{max}} \sim 380\text{--}400 \text{ nm}$ ^{57,86}. O complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ também apresentou bandas com $\lambda_{\text{max}} = 225 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 275 nm ($\epsilon = 3,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A Tabela 4A apresenta a composição dos orbitais para o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$, e as atribuições das bandas são apresentadas na Tabela 4B, ambas obtidas com o auxílio de cálculos DFT. As superfícies de contorno dos orbitais moleculares relacionados com as transições apresentadas na Tabela 4B estão ilustradas no Anexo F. Os espectros eletrônicos experimental e teórico (TD-DFT) para o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ são apresentados na Figura 7. O orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) tem contribuição majoritária dos orbitais d do centro metálico (Tabela 4A e Anexo F), enquanto que o orbital molecular vazio de menor energia (LUMO) tem maior contribuição dos orbitais π do ligante $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$ (Tabela 4A e Anexo F).

Os cálculos teóricos (Tabela 4B) sugerem que a banda em 362 nm pode ser atribuída principalmente à transferência de carga do metal para o ligante (TCML) $\text{Ru} \rightarrow \text{N}(\text{O})\text{SO}_3$, com contribuição das transições $d \rightarrow d$ e $\text{Ru} \rightarrow \text{isn}$ (isn = isonicotinamida). Confirmou-se

experimentalmente que essa banda é majoritariamente referente à TCML $\text{Ru} \rightarrow \text{N}(\text{O})\text{SO}_3$ pela reação entre o íon complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{NO}]^{3+}$ e íons SO_3^{2-} , que resultou na formação de uma banda com $\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$ (Anexo G). A banda em 225 nm do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ foi atribuída (Tabela 4B) à transferência de carga do ligante para o metal (TCLM) $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3 \rightarrow \text{Ru}$ e à transferência de carga do ligante para ligante (TCLL) $\text{isn} \rightarrow \text{N}(\text{O})\text{SO}_3$. A banda em 275 nm foi atribuída à TCLL $\text{isn} \rightarrow \text{N}(\text{O})\text{SO}_3$.

Tabela 4. (A). Composição orbital, e **(B)** atribuição das bandas principais para o complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. Fonte: Autoria própria.

(A)

		Contribuição (%)			
Nº orbital	Orbital	isn	NH3	NOSO ₃	Ru
106	L+4	1	26	5	68
105	L+3	6	10	28	56
104	L+2	97	1	0	2
103	L+1	85	0	8	6
102	LUMO	14	1	70	15
101	HOMO	0	4	3	93
100	H-1	1	2	16	81
99	H-2	6	2	23	70
98	H-3	5	1	75	19
97	H-4	99	0	0	1
96	H-5	0	1	98	1
95	H-6	100	0	0	0
94	H-7	100	0	0	0
93	H-8	87	6	4	3

Cont.

(B)

λ_{max} (nm)		Transição	Orbitais envolvidos	Atribuição (teórico) ^a
Exper.	Teórico			
226	234	H-8→LUMO	$[\pi(\text{isn})+d_{xz}] \rightarrow [\pi_z^*(\text{NOSO}_3) - d_{xz} + \pi^*(\text{isn})]$	TCLL (isn→NOSO ₃)
	226	H-3→L+3	$[\pi_x^*(\text{NOSO}_3)+d_{xz}] \rightarrow [(d_z^2 - \sigma_x^*(\text{NOSO}_3) - \sigma_x^*(\text{isn})]$	TCML (isn→Ru)
	222	H-3→L+3	$[\pi_x^*(\text{NOSO}_3)+d_{xz}] \rightarrow [(d_z^2 - \sigma_x^*(\text{NOSO}_3) - \sigma_x^*(\text{isn})]$	TCLL (isn→NOSO ₃)
275	268	H-7→LUMO	$\pi(\text{isn}) \rightarrow [\pi_z^*(\text{NOSO}_3) - d_{xz} + \pi^*(\text{isn})]$	TCLL (isn→NOSO ₃)
362	353	H-2→LUMO	$[(d_{yz} + \pi_y^*(\text{NOSO}_3)] \rightarrow [\pi_z^*(\text{NOSO}_3) - d_{xz} + \pi^*(\text{isn})]$	TCML (Ru→NOSO ₃)
		H-1→L+1	$d_{yz} \rightarrow [\pi_x^*(\text{isn}) - d_{xz} - \pi^*(\text{NOSO}_3)]$	TCML (Ru → isn)
	350	H-1→L+1	$d_{yz} \rightarrow [\pi_x^*(\text{isn}) - d_{xz} - \pi^*(\text{NOSO}_3)]$	TCML (Ru → isn)
		H-2→LUMO	$[(d_{yz} + \pi_y^*(\text{NOSO}_3)] \rightarrow [\pi_z^*(\text{NOSO}_3) - d_{xz} + \pi^*(\text{isn})]$	TCML (Ru→NOSO ₃)
	336	H-1→L+3	$d_{yz} \rightarrow [(d_z^2 - \sigma_x^*(\text{NOSO}_3) - \sigma_x^*(\text{isn})]$	$d \rightarrow d$
		H-1→L+4	$d_{yz} \rightarrow [d_{xy} - \sigma(\text{NH}_3)]$	$d \rightarrow d$
	311	H-2→L+1	$[(d_{yz} + \pi_y^*(\text{NOSO}_3)] \rightarrow [\pi_x^*(\text{isn}) - d_{xz} - \pi^*(\text{NOSO}_3)]$	TCML (Ru → isn)
		HOMO→L+3	$d_{xy} \rightarrow [(d_z^2 - \sigma^*(\text{NOSO}_3) - \sigma^*(\text{isn})]$	$d \rightarrow d$

^a TCML – transferência de carga do metal para o ligante; TCML – transferência de carga do ligante para o metal, TCLL – transferência de carga de ligante para ligante

Figura 7. Espectro experimental e teórico do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆). O espectro teórico foi obtido utilizando-se o funcional *b3lyp* e as bases *gdgsvp* para o rutênio, *dgtzvp* para os ligantes NH₃ e isn, e *6-311+g(2d,3p)* para o fragmento NOSO₃.

Fonte: Autoria própria.

O íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{4-}$ apresenta banda intensa em 475 nm⁴¹. Os demais complexos de rutênio descritos, *cis*-[RuX(bipy)₂(N(O)SO₃)] (X = Br, Cl) e *trans*-[RuCl(py)₄(N(O)SO₃)], apesar de insolúveis em solventes que não reagem com eles⁴¹, apresentaram no espectro de reflectância, bandas com λ_{max} entre 450–475⁴¹. A banda de transferência de carga é influenciada pela natureza da esfera de coordenação, e no caso de TCML, substituintes retiradores de densidade eletrônica provocam deslocamento das bandas para frequências menores⁸⁷. Isso provavelmente explica o deslocamento da banda de TCML para frequências maiores, no caso do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺, com λ_{max} = 362 nm, em relação aos complexos *cis*-[RuX(bipy)₂(N(O)SO₃)] e *trans*-[RuCl(py)₄(N(O)SO₃)], que tem λ_{max} entre 450–475, e $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{4-}$, com λ_{max} = 475 nm⁴¹.

4.2. Estabilidade do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) em soluções aquosas.

4.2.1. Estabilidade em tampão fosfato e em tampão acetato

Em solução aquosa, a banda do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em 362 nm decai exponencialmente com o tempo (Figura 8), e a constante para essa reação em pH 7,4 à T = 25 °C é de $k = 3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 385 \text{ min}$). Os produtos formados foram identificados por RMN de ¹H. O complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ apresenta dois dubletos (Figura 9A) com δ em 8,87/8,85 ppm e 8,14/8,13 ppm (representado pela letra **X** na Figura 9A). Após 24 h em solução sob ausência de luz, os sinais observados para esse complexo foram 8,71/8,70 ppm e 7,78/7,70 ppm (letra **Z** na Figura 9B), cujos deslocamentos químicos correspondem aos da molécula isonicotinamida (não-coordenada) em solução (letra **Z** na Figura 9C). Esse mesmo comportamento foi observado para os experimentos realizados entre os pH's 5,2 (tampão acetato) e 7,4 (tampão fosfato). O valor da constante de velocidade diminui em função do aumento da acidez do meio, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 8. Variação do espectro eletrônico do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) em solução de tampão fosfato (pH 7,4, C = 20mM), T = 25°C). Gráficos inseridos: $\ln(A)$ vs. tempo, e também (A) vs. tempo.

Fonte: Autoria própria

Figura 9. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão fosfato pH 7,4, (A) $t = 0$ min, (B) $t = 24$ h e (C) apenas o ligante isonicotinamida. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm.

Fonte: Autoria própria

Figura 10. Dependência da constante de velocidade para a decomposição do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em solução aquosa em diferentes pH's.

Fonte: Autoria própria

Nos experimentos realizados em pH's 4,2 e 3,9 (tampão acetato), Figura 11A e 11B, verificou-se que no $t = 0$ min (assim que o complexo foi solubilizado), respectivamente 41% e 50% do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ (letra **X** na Figura 11) foi convertido no nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ (letra **Y** na Figura 11). Após 24 h em solução (amostra em pH 3,9, na ausência de luz), foram observados seis sinais, os quais foram atribuídos às seguintes espécies (Figura 11C): minoritariamente ao *i*) complexo inicial *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ (~8%, letra **X** na Figura 11C) e ao *ii*) nitrosilo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ (~6%, letra **Y** na Figura 11C), e *iii*) majoritariamente (~87%) à isonicotinamida (letra **Z** na Figura 11C) labilizada da esfera de coordenação. (Nota: a isonicotinamida não-coordenada apresentou sinais com uma pequena diferença no deslocamento químicos – variação menor que 0,13 ppm – nos diversos pH's utilizados nesse experimento, conforme pode ser verificado no Anexo E).

Figura 11. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão acetato **(A)** $t = 0$ min, pH 3,9, **(B)** $t = 0$ min, pH 4,2, e **(C)** $t = 24$ h, pH 3,9. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm.

Fonte: Autoria própria

O comportamento do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ em solução também foi acompanhado por RMN de ¹H, e este experimento foi utilizado como controle. Inicialmente, os dois dubletos da Figura 12A (letra **Y** nesta figura) são referentes ao ligante isonicotinamida (isn) no complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺. Após este complexo permanecer por 24h em solução (na ausência de luz), verificou-se por RMN de ¹H que aproximadamente 40% do ligante isn havia sido labilizado (letra **Z** na Figura 12B), e que o restante ainda permanecia coordenado ao nitrosilo complexo inicial (Figura 12B, letra **Y**). Entretanto, em meios mais ácidos (pH 5,2 e 3,9) o nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ permaneceu estável após 24 h em solução (Figura 13), não ocorrendo a labilização do ligante isonicotinamida.

Figura 12. Espectros de RMN de ¹H para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ em solução aquosa (50% D₂O) de tampão fosfato pH 7,4, (A) t = 0 min, (B) t = 24 h e (C) apenas o ligante isonicotinamida. Referência TMSPd-4, δ = 0 ppm.

Fonte: Autoria própria

Figura 13. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ em solução aquosa (50% D_2O) de tampão acetato em pH 5,2 (A) $t = 0$ min, (B) $t = 24$ h, e pH 3,9 (C) $t = 0$ min, (D) $t = 24$ h. Referência TMSPd-4, $\delta = 0$ ppm. Fonte: Autoria própria

Em resumo, com base nos dados apresentados nos parágrafos anteriores, observou-se que na faixa de pH 7,4–5,2 o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ é relativamente estável (Figuras 9 e 10), e que após 24h em solução ocorreu a labilização do ligante isonicotinamida da esfera de coordenação desse complexo (Figura 9B). Em soluções cujo pH é de 4,2 e 3,9, assim que o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ foi solubilizado parte dele (respectivamente 41% e 50%) foi convertida no nitrosilo complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ (Figura 11A e 11B). E após 24h em solução com pH 4,2 e 3,9 (sob ausência de luz), o ligante isonicotinamida também foi labilizado da esfera de coordenação do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ (Figura 11C).

No caso do complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺, a labilização do ligante isn foi observada apenas para as solução em pH 7,4, Figura 12 (no intervalo de tempo de 24h). Em soluções mais ácidas (pH's 5,2 e 3,9), não observou-se este fenômeno dentro de um período de 24h (Figura 13).

Diante do exposto conclui-se que em soluções aquosas na faixa de pH estudado neste trabalho o ligante N(O)SO₃⁻ apresenta maior efeito-*trans* que o ligante nitrosênio (NO⁺). Por se tratar de um ligante pouco estudado, não há relatos sobre o efeito-*trans* labilizante do ligante N(O)SO₃⁻. Entretanto, uma comparação relativamente próxima pode ser realizada com o ligante NO₂⁻ (coordenado pelo nitrogênio – nitro complexo), que é reportado na literatura como tendo um efeito-*trans* labilizante moderado⁸³. É provável, portanto, que o ligante N(O)SO₃⁻ tenha um efeito-*trans* de magnitude similar à do ligante NO₂⁻ (nitro).

Na Figura 14 é apresentado o espectro de ¹H RMN para os complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em solução 1,0 M de ácido trifluoroacético deuterado (DTFA). Os deslocamentos químicos observados para ambos os complexos foram os mesmos, sugerindo que em soluções mais ácidas (1,0 M DTFA), o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ é totalmente convertido em *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺, de acordo com a Eq. 9, provavelmente por meio da quebra heterolítica da ligação S–N.

Figura 14. Espectros de RMN de ^1H para os complexos (A) $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ e (B) $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$, ambos em solução 1,0 M de HTFA deuterado.

Fonte: Autoria própria.

A quebra da ligação S–N (ligante $-\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$) no caso do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ também foi observada para outros complexos do tipo $[\text{L}_5\text{Ru}-\text{N}(\text{O})\text{SO}_3]^n$ ⁴¹. Tanto em solução aquosa, quanto em solução 4,0 M de HCl, o complexo $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{bipy})_2(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]$ foi convertido no respectivo nitrosilo complexo $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{bipy})_2(\text{NO})]^{2+}$ ⁴¹. Já o complexo $\text{trans-}[\text{RuCl}(\text{py})_4(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]$ foi convertido no respectivo hidroxido complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{OH})(\text{py})_4(\text{NO})]^+$ em solução aquosa, e no nitrosilo complexo $\text{trans-}[\text{RuCl}(\text{py})_4(\text{NO})]^{2+}$ em soluções aquosas ácidas (HCl, 4,0 M)⁴¹. Esses resultados sugerem que em soluções fortemente ácidas ocorra a protonação dos dois átomos de oxigênio do fragmento $-\text{SO}_3$ (do ligante $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$), o que levaria ao rompimento da ligação S–N. O pK_a do fragmento $-\text{SO}_3$ do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ foi calculado, e os resultados serão apresentados e discutidos a seguir.

4.3 Determinação do pK_a do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺

O pK_a do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ foi determinado espectrofotometricamente⁵⁹, por meio da titulação desse complexo com ácido trifluoroacético (HTFA). A curva de titulação é apresentada na Figura 15A, e o valor de pK_a obtido por dois tratamentos diferentes (descritos na seção 3.4) foi de 5,05 (Figura 15B) e 5,12 (Figura 15C), respectivamente. Esse pK_a foi atribuído à seguinte reação (Eq. 10):

Figura 15. (A) Variação da absorbância (espectro eletrônico) em função do pH para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺. (B) primeira e segunda derivadas da curva de titulação; (C) Gráfico obtido a partir da equação $\text{pH} = \text{pK}_a + \log [(A - A_M)/(A_I - A)]$ para a determinação do pK_a.

Cont.

Fonte: Autoria própria.

Conforme discutido na seção anterior, o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ começa a ser parcialmente convertido no nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ em pH ≤ 4,2. Portanto, durante a titulação do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺, principalmente em pH's ≤ 4,2, existiu um erro associado na medida, pois a absorbância observada no espectro eletrônico a partir desse valor de pH tinha a contribuição da espécie protonada *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃H)]²⁺ e também do nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺. Apesar dessa característica intrínseca do sistema, e conseqüentemente do erro associado a essa medida, foi possível calcular o pK_a para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ de forma satisfatória. Isso foi confirmado por meio do uso de um tratamento matemático, *Função de Boltzmann*⁶⁰⁻⁶¹ (Anexo A), com o auxílio do software *Origin 8.5*. Esse tratamento foi empregado para a curva de titulação apenas no intervalo de pH no qual muito pouco ou nenhuma parte do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ teria sido convertida no respectivo nitrosilo complexo, ou seja, entre os pH's 7,9 e 4,8 (Figura 16). Dessa forma, o espectro observado durante a titulação na faixa de pH 7,9–4,8, seria referente apenas às espécies protonada e deprotonada do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺. O valor de pK_a obtido por esse método foi de 4,98 ± 0,05, valor muito próximo ao calculado pelos outros dois métodos, que foi de ~5,08 ± 0,06.

Figura 16. Curva de titulação para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ entre os pH's 7,9 e 4,8, e ajuste da curva utilizando-se a função de Boltzman.

Fonte: Autoria própria. Ref. ⁶⁰⁻⁶¹

O valor de pK_a determinado para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ está dentro de um intervalo esperado, já que o íon sulfito (não coordenado) apresenta $pK_a = 7,2$ (Eq. 2), e o sulfito coordenado ao complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(H₂O)(SO₃)] apresenta o valor de $pK_a = 5,05 \pm 0,1$ (Eq. 11)⁸⁸:

Infelizmente, não foi possível calcular o segundo pK_a para o ligante –N(O)SO₃, pois, conforme já discutido, a partir do pH 4,2 parte do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ é rapidamente convertida no nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺. Portanto, é provável que com a segunda protonação no fragmento –SO₃, a quebra da ligação S–N do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ seja favorecida.

4.4. Reação com íons OH[–]

Um dos tópicos de interesse a respeito da química dos nitrosilo complexos é o caráter eletrofílico do ligante nitrosônio. A reação entre nitrosilo complexos com diversos nucleófilos é bem descrita na literatura^{40,55,57,89}, e as principais espécies nucleofílicas estudadas são OH[–],

HS^- , N_3^- , NH_2OH e RS^- (tióis). Com a finalidade de se melhor compreender o caráter eletrofílico do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$, foram realizados ensaios para a reação entre esse complexo e íons hidroxila (OH^-).

De acordo com a literatura^{40,55,57}, em geral, complexos de fórmula $[\text{ML}_5(\text{NO})]^n$ reagem com OH^- (Eqs.12–14) formando os respectivos nitro complexos, $[\text{ML}_5(\text{NO}_2)]^{n-2}$. A etapa limitante da reação é a representada na Eq. 13.

A reação entre alguns nitrosilo complexos do tipo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})\text{NO}]^{3+}$ (L = pirazina, nicotinamida, picolina, piridina, 4-metil-piridina ou histidina) com OH^- foi estudada previamente⁵⁷, e verificou-se a formação de uma banda intensa na região de 380–400 nm para os diferentes complexos^{57,86,90}. No presente trabalho, inicialmente estudou-se a reação entre o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ (**RuNOisn**) e OH^- . As mudanças no espectro eletrônico observadas para essa reação são apresentadas na Figura 17. A partir desses resultados prosseguiu-se com a reação entre o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ (**RuNOSO₃isn**) e íons OH^- , Figura 18. Comparando-se os espectros eletrônicos para a reação entre os íons OH^- e **RuNOisn** ou **RuNOSO₃isn** (Figuras 17 e 18), nota-se a semelhança entre os espectros eletrônicos dos produtos formados em ambas as reações, indicando provavelmente a formação do nitro complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$ ⁵⁷ ($\lambda_{\text{max}} = 407 \text{ nm}$) em ambos os casos. A geração dessa espécie foi confirmada por meio de RMN de ^{15}N , obtido para a reação entre íons OH^- e os complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})^{15}\text{NO}]^{3+}$ e $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(^{15}\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$, como pode ser visto na Figura 19. O sinal observado com deslocamento químico $\delta = 536,2 \text{ ppm}$ foi atribuído ao átomo de nitrogênio na espécie $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(^{15}\text{NO}_2)]^+$, e este sinal está presente no espectro obtido para a reação entre OH^- com ambos os complexos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})^{15}\text{NO}]^{3+}$ e $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(^{15}\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. O sinal em 24 ppm é referente ao $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, que tem $\delta^{15}_{\text{N}} = 24 \text{ ppm}$ em relação ao padrão primário NH_3 líquido. Assim, com base nos dados espectroscópicos confirmou-se que os mesmos produtos foram obtidos em ambas as reações, e trata-se do nitro complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$ ⁵⁷.

Figura 17. Variação no espectro eletrônico durante a reação entre $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ e OH^- . Espectros obtidos a cada 5 segundos; $T = 25^\circ\text{C}$.

Fonte: Autoria própria

Figura 18. Variação no espectro eletrônico durante a reação entre $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^{3+}$ e OH^- . Espectros obtidos a cada 5 segundos.

Fonte: Autoria própria

Figura 19. Espectros de RMN de ^{15}N do produto da reação entre os íons OH^- e (A) $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})^{15}\text{NO}]^{3+}$, ou (B) $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(^{15}\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. Como referência utilizou-se um capilar contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, que tem $\delta^{15}_\text{N} = 24$ ppm em relação ao padrão primário NH_3 líquido.

Fonte: Autoria própria

O comportamento cinético típico para a reação entre **RuNOisn** e íons OH^- está representado na Figura 20. A dependência do k_{obs} ($T = 15^\circ\text{C}$) em relação à concentração de íons OH^- é mostrada na Figura 21. No caso da reação entre o complexo **RuNOSO₃isn** com íons OH^- , a curva cinética típica e a dependência do k_{obs} ($T = 15^\circ\text{C}$ e 25°C) em relação à

concentração de íons OH^- são apresentadas, respectivamente nas Figuras 22, 23 e 24. Todos esses dados cinéticos estão reunidos na Tabela 5.

Figura 20. Curva cinética representativa da reação entre $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ ($1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$) e OH^- ($1,5 \times 10^{-2} \text{ M}$), $T = 15^\circ\text{C}$, $\mu = 1,0 \text{ M}$ (NaCl). Gráfico inserido: Curva de $\ln(A_{\text{inf}} - A)$ vs. tempo.

Fonte: Autoria própria

Figura 21. Dependência de k_{obs} em relação à concentração de íons OH^- à $T = 15^\circ\text{C}$. Condições experimentais: $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ ($C_{\text{Ru}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$); $\mu = 1,0 \text{ M}$ (NaCl); $n = 5$ para cada concentração de OH^- .

Fonte: Autoria própria

Figura 22. Curva cinética representativa da reação entre $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ ($1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$) e OH^- ($2,0 \times 10^{-2} \text{ M}$), $\mu = 1,0 \text{ M}$ (NaCl), $T = 25^\circ\text{C}$. Gráfico inserido: Curva de $\ln(A_{\text{inf}} - A)$ vs. tempo.

Fonte: Autoria própria

Figura 23. Dependência de k_{obs} em relação à concentração de íons OH^- à $T = 15^\circ\text{C}$. Condições experimentais: $trans\text{-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ $C_{\text{Ru}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\mu = 1,0 \text{ M}$ (NaCl); $n = 5$ para cada concentração de OH^- .

Fonte: Autoria própria

Figura 24. Dependência de k_{obs} em relação à concentração de íons OH^- à $T = 25^\circ\text{C}$. Condições experimentais: $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ $C_{\text{Ru}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\mu = 1,0 \text{ M}$ (NaCl); $n = 5$ para cada concentração de OH^- .

Fonte: Autoria própria

Tabela 5. Constantes de velocidade (k) para a reação entre $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ e $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ com íons OH^- .

Complexo	$k \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	
	T = 15°C	T = 25°C
$\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$	$10,53 \pm 0,3$	$57,6^a / 46,9^b$
$\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$	$2,15 \pm 0,07$	$6,16 \pm 0,22$
$\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{nic})(\text{NO})]^{3+ c}$	12^d	$33 \pm 0,1^e$

^a valor estimado em função da K_{eq} , de acordo com a ref. ⁵⁷. O valor da K_{eq} foi obtido na ref. ⁴⁹, e é igual a $2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$; ^b valor estimado em função do potencial de redução NO^+/NO^0 para diferentes nitrosilo complexos, de acordo com a ref. ⁵⁷.

^c nic = nicotinamida; ^d T = 16 °C, ref. ⁹⁰; ^e ref. ⁵⁷.

Fonte: Autoria própria

As constantes de velocidade para a reação entre **RuNOisn** e OH⁻ a T = 15°C foi em média 5 vezes superior à respectiva reação com **RuNOSO₃isn** (Tabela 5). Para a T = 25°C, a velocidade estimada para a reação entre OH⁻ e **RuNOisn** foi de 7 a 10 vezes superior à respectiva reação com **RuNOSO₃isn** (Tabela 5). Essa estimativa é razoável, considerando-se que o valor de *k* reportado para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(nic)(NO)]³⁺ (nic = nicotinamida), que tem a estrutura muito similar à do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺, é de *k* = 33 ± 0,1 M⁻¹s⁻¹ (25°C)⁵⁷, Tabela 5. Esta constante é aproximadamente 5,4 vezes superior à observada para o complexo **RuNOSO₃isn**.

Supondo-se que o ataque nucleofílico ocorra no átomo de nitrogênio do complexo **RuNOSO₃isn** (de forma similar à do complexo **RuNOisn**), o menor valor de *k* observado para a reação do íon OH⁻ para esse complexo (Tabela 5) estaria provavelmente relacionado a dois fatores principais, *i*) ao efeito estérico do fragmento SO₃ no ligante NOSO₃, e *ii*) ao menor caráter positivo do átomo de nitrogênio do NO complexo **RuNOSO₃isn** em relação a **RuNOisn**. Esta última hipótese pode ser analisada comparando-se os νNO nesses dois complexos: νNO = 1933 cm⁻¹ para **RuNOisn**, e νNO = 1353 cm⁻¹ para **RuNOSO₃isn**. Isso sugere que há maior densidade eletrônica sobre o átomo de N (do NO) do complexo **RuNOSO₃isn** em relação ao átomo de N do complexo **RuNOisn**. Em acordo com essa observação, cálculos teóricos da carga de NBO (*Natural Bond Orbital*) foram realizados para os complexos **RuNOSO₃isn** e **RuNOisn**, e estão listados na Tabela 6. Os resultados sugerem que a carga no átomo de N do ligante NO para o complexo **RuNOisn** (0,444) é mais positiva que a respectiva carga no átomo de N no ligante N(O)SO₃ (-0,029), conforme listado na Tabela 6. Além disso, os cálculos também sugerem que a carga do átomo de S no ligante N(O)SO₃ é mais positiva (2,369) que a observada para o átomo de N (-0,029) desse ligante (na verdade, a carga do N é negativa), conforme apresentado na Tabela 6. Portanto, de acordo com esse dado, é provável que o ataque dos íons OH⁻ ocorra, na verdade, primeiramente no átomo de S (e não no átomo de N) formando assim o nitrosilo complexo Eq. (15), seguido da reação deste nitrosilo com íons OH⁻, gerando como produto final o nitro complexo Eq. (16):

Tabela 6. Cargas de NBO calculadas para os complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$ e $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}(\text{SO}_3)]^+$.

Complexo	Átomo (ligante)	NBO
$trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}]^{3+}$	Ru	0,686
	N (NO)	0,444
	O (NO)	-0,002
	N (isn)	-0,423
$trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})\text{NO}(\text{SO}_3)]^+$	Ru	0,564
	N (NO)	-0,029
	O (NO)	-0,332
	S	2,369
	O (SO ₃)	-0,962/-0,995/-0,999
	N(isn)	-0,414

Fonte: Autoria Própria

4.5. Ensaios fotoquímicos preliminares

Apesar de alguns complexos do tipo $[(\text{L})_5\text{M}(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^n$ já estarem descritos na literatura^{41,44-45}, até o momento, de nosso conhecimento, nenhum resultado foi publicado a respeito da reatividade fotoquímica desses complexos. Esse fato nos motivou a estudar essas reações. Inicialmente verificou-se as alterações no espectro eletrônico do complexo **RuNOSO₃isn** durante a fotólise ($\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$), conforme ilustrado na Figura 25A. Esses resultados foram então comparados àqueles obtidos para a fotólise do complexo **RuNOisn** nas mesmas condições (Figura 25B).

Figura 25. Fotólise de uma solução contendo (A) **RuNOSO₃isn** ($C = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$) e (B) **RuNOisn** ($C = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$). Condições experimentais: tampão fosfato pH 7,4 (Chelex 100), $C = 200 \text{ mM}$, $T = 25^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{irrad}} = 355 \text{ nm}$ 5mJ/pulso, 10pulsos/s.

Fonte: Autoria própria

Durante a fotólise do complexo **RuNOSO₃isn** a banda em 362 nm decai com o tempo de irradiação (Figura 25A), e nas condições do experimento, após aproximadamente 6 min de fotólise uma banda começa a surgir com $\lambda_{\text{max}} = 318$ nm. De forma análoga, uma banda com $\lambda_{\text{max}} = 318$ nm também começa a surgir durante a fotólise do complexo **RuNOisn** (Figura 25B). A partir desse dado, supôs-se que o decaimento da banda em 362 nm e posterior surgimento da banda em 318 nm poderia estar relacionado com a labilização do ligante N(O)SO₃⁻. Essa hipótese foi sugerida com base na literatura, que descreve que o NO é labilizado do complexo **RuNOisn** quando este é irradiado com $\lambda_{\text{irr}} = 310\text{--}370$ nm⁹¹, de acordo com a Eq. (17).

Para confirmar se a labilização do ligante N(O)SO₃ ocorre durante a fotólise do complexo **RuNOSO₃isn**, primeiramente verificou-se se as espécies NO e SO₃^{•-} seriam formadas durante a fotólise desse complexo. Isso foi realizado em função dos dados reportados a respeito da espécie NOSO₃⁻⁴¹, os quais sugerem que esta é instável. Devido a essa instabilidade, é bastante razoável supor que os possíveis produtos formados durante a decomposição do íon NOSO₃⁻ seriam os radicais NO e SO₃^{•-}.

Para verificar se a liberação de NO ocorre durante a fotólise do complexo **RuNOSO₃isn** primeiramente utilizou-se um conhecido captador do radical NO, o PTIO⁹²⁻⁹⁴ (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil 3-óxido). Apesar de o PTIO e também do carboxi-PTIO (sal de potássio de 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil 3-óxido), Figura 26, serem comumente empregados para a detecção de NO⁹²⁻⁹⁶, um experimento controle (fotólise de uma solução aquosa de Na₂SO₃) demonstrou que o radical SO₃^{•-} também reage com o PTIO originando os mesmos sinais que são formados na reação com o NO (Anexo H). Esse fato impossibilitaria a distinção entre as espécies NO e SO₃^{•-} no caso da fotólise do complexo **RuNOSO₃isn**. A segunda opção foi utilizar a oximioglobina (oxi-Mb) que também é comumente empregada para a identificação de NO^{85,97-100}. Entretanto, um experimento controle (fotólise de uma solução aquosa de Na₂SO₃) também mostrou que as alterações no espectro eletrônico da oxi-Mb durante a reação com o SO₃^{•-} são similares àqueles observados para a reação entre NO e oxi-Mb^{85,99} (Anexo I).

Figura 26. Estruturas moleculares do PTIO e do carboxi-PTIO.

Fonte: Autoria própria.

Considerando-se que a fotólise do complexo **RuNOSO₃isn** poderia produzir ambos os radicais NO e SO₃^{•-}, optou-se então pela catalase para a detecção de NO, e pelo captador de radicais DMPO para a identificação de SO₃^{•-}. Diferentemente dos exemplos citados nos parágrafos anteriores (PTIO e oxiMb), no experimento controle utilizando-se a catalase (fotólise de uma solução de Na₂SO₃) não houve variação no espectro eletrônico, possibilitando assim a distinção entre o NO e o SO₃^{•-}. A catalase é uma enzima que atua na decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e que contém grupos heme com átomos de Fe(III). A reação da catalase (Cat^{III}) com o NO é reportada na literatura com uma $K_{eq} = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ⁶³ (Eq. 18):

Inicialmente realizou-se a fotólise do complexo **RuNOisn** na presença de catalase e verificou-se que após o início da fotólise houve o surgimento de bandas em 538 e 575 nm (Figura 27), entre os períodos de irradiação de t= 0–14min. O surgimento dessas bandas está de acordo com a reação descrita na Eq. (18) e com as mudanças observadas no espectro eletrônico para a reação entre a catalase e o NO⁶³. Portanto, é bastante razoável se supor que a fotólise ($\lambda = 355 \text{ nm}$) do complexo **RuNOisn** resultou na liberação de NO, Eq. 17, conforme o esperado com base na literatura^{49,91}.

Figura 27. Fotólise de uma solução contendo catalase ($C=5,3 \times 10^{-6}$ M) e **RuNOisn** ($C=4,8 \times 10^{-4}$ M). Condições experimentais: Tampão fosfato, pH 7,4, $C=200$ mM, $T = 25^\circ\text{C}$; $\lambda = 355$ nm 5mJ/pulso, 10pulsos/s.

Fonte: Autoria própria

A partir desse resultado realizou-se a fotólise do complexo **RuNOSO₃isn** (Figura 28) nas mesmas condições empregadas para o complexo **RuNOisn** (Figura 27). Observou-se que entre os períodos de irradiação $t_{irr} = 0$ a 14 min, as alterações no espectro foram muito pequenas (Figura 28A) em comparação com o complexo **RuNOisn** (compare as Figuras 27 e 28A), sugerindo que muito pouco NO foi liberado do complexo **RuNOSO₃isn** durante esse período de fotólise. Entretanto, em períodos de tempo maiores de fotólise do complexo **RuNOSO₃isn**, $t > 14$ min, observou-se nitidamente o surgimento das bandas em 538 e 575 nm (Figura 28B), mostrando claramente a liberação de NO durante a fotólise desse complexo.

Figura 28. Fotólise de uma solução contendo catalase ($C=5,3 \times 10^{-6}$ M) e **RuNOSO₃isn** ($C=4,8 \times 10^{-4}$ M) fotolisada (A) entre 0 e 14 minutos, e (B) 16 a 45 minutos. Condições experimentais: Tampão fosfato, pH 7,4, $C=200$ mM (Chelex), $T = 25^\circ\text{C}$; $\lambda = 355$ nm 5mJ/pulso, 10pulsos/s.

Fonte: Autoria Própria

Em seguida foram realizados ensaios de fotólise na presença de DMPO (Figura 29). Com base nesses ensaios, concluiu-se que o radical $\text{SO}_3^{\bullet-}$ também se forma quando o complexo **RuNOSO₃isn** é irradiado por $t_{\text{irr}} = 2$ min com $\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm (Figura 29). O espectro simulado para o aduto formado na reação entre $\text{SO}_3^{\bullet-}$ e DMPO está de acordo com o espectro obtido experimentalmente (compare os espectros (a) e (b) na Figura 29). As constantes de acoplamento obtidas do espectro de EPR foram $a_N = 14,44$ G e $a_H = 16,10$ G, e estes valores estão de acordo com os descritos na literatura^{8,62} para o aduto da reação entre $\text{SO}_3^{\bullet-}$ e DMPO. Além desses sinais, outros também foram observados, mas com intensidade relativamente inferior (indicado pelas setas no espectro (a) da Figura 29). Esses sinais de pequena intensidade relativa também foram identificados na amostra utilizada como controle (fotólise de uma amostra contendo apenas DMPO e tampão fosfato, espectro (c) da Figura 29), e portanto, foram atribuídos a um possível subproduto gerado durante a fotólise, ou à fotodecomposição do DMPO. Apesar de presentes, acredita-se que esses sinais não tiveram influência significativa nos demais resultados obtidos.

Figura 29. Espectros de EPR obtidos antes e a após a fotólise de uma solução contendo **RuNOSO₃isn** e o captador de radical DMPO: (a) $2,0 \times 10^{-4}$ M de **RuNOSO₃isn** + 100mM DMPO (500x excesso) em tampão fosfato pH 7,4, C=200mM, $\mu = 0,543$ M; (b) espectro simulado; (c) solução de tampão fosfato + DMPO fotolisada por 10 min; (d) mesma solução que em (a) mas antes da fotólise. Espectros de EPR obtidos à temperatura ambiente. Soluções fotolisadas com laser $\lambda = 355$ nm, 5mJ/pulso, 10 pulsos/s.

Fonte: Autoria própria.

Com o objetivo de melhor compreender os resultados discutidos nos parágrafos anteriores a respeito da identificação dos radicais NO e $\text{SO}_3^{\bullet-}$ durante a fotólise do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$, foram realizados cálculos teóricos (DFT) para o estado excitado triplete (EET) para esse complexo. Os resultado obtidos para o EET foram comparados com aqueles obtidos por DFT para o estado fundamental (EF) do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$:

De acordo com o que foi discutido na seção 4.1.4 para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ no EF, a transição com maior força de oscilador é aquela em 353 nm (Tabela 4, H-2→LUMO, atribuída à TCML $\text{Ru} \rightarrow \text{NOSO}_3$), e que levaria majoritariamente à população de um orbital com caráter $\pi^*\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$. Os cálculos teóricos para o EET para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ mostraram que o orbital HOMO (α) tem contribuição de 77% do ligante $\text{N}(\text{O})\text{SO}_3$ (ANEXO G), e esse orbital é ilustrado na Figura 30, onde também está ilustrado o orbital LUMO para o EF. O orbital HOMO do EET tem caráter antiligante para a ligação N–O e caráter ligante para a ligação N–S (Figura 30). De acordo com os dados de DFT, a população desse orbital resulta nas seguintes modificações observadas para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$, as quais serão discutidas nos parágrafos abaixo.

Figura 30. Ilustração dos orbitais moleculares LUMO (estado fundamental) e HOMO(α) (estado excitado) para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$.

Os cálculos teóricos (estrutura otimizada) realizados para o EET do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ indicaram um aumento de 0,122 Å na distância da ligação Ru–N(O)SO₃ em relação aos resultados obtidos para esse complexo no EF, conforme listado na Tabela 7. Outra alteração significativa ocorreu em relação à distância da ligação N–S do ligante N(O)SO₃, em que houve uma redução de 0,121 Å na distância dessa ligação para o EET em relação ao EF (Tabela 7). Esses dados sugerem que a fotólise (355 nm) do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ leva ao enfraquecimento da ligação Ru–N(O)SO₃ e ao fortalecimento da ligação N–S do ligante N(O)SO₃. Uma outra modificação ocorreu no ângulo da ligação Ru–N(1)–O(1), que para o EET diminuiu em aproximadamente 21° em relação ao EF, enquanto que o ângulo da ligação O(1)–N(1)–S(1) aumentou em apenas 5° (Tabela 7). Esses resultados estão resumidos na Figura 31. Além disso, para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ no EF, o plano formado pela ligação O(1)–N(1)–S(1) é praticamente paralelo ao plano da isonicotinamida (Figura 32A), enquanto que no caso da estrutura otimizada para o EET, houve uma torção no plano O(1)–N(1)–S(1) em relação ao da isonicotinamida (Figura 32B).

Tabela 7. Distâncias e ângulos de ligação para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ no estado fundamental e no estado excitado triplete

Distância da Ligação (Å)			
Ligação	Experimental ^c	Teórico (DFT)	
		Estado fundamental	Estado excitado triplete
Ru–N(1)OSO ₃	1,881(3)	1,949	2,071
N(1)–O(1)	1,242(4)	1,209	1,2644
N(1)–S(1)	1,839(3)	1,944	1,823
S(1)–O(11,12, 13) ^a	1,396–1,433	1,455–1,468	1,4566–1,469
Ru–N(2, 3,4, 5) ^b	2,116–2,142	2,176–2,187	2,167–2,184
Ru–N(6)	2,161(3)	2,228	2,1967
Ângulo da ligação (°)			
Ligação	Experimental	Teórico (DFT)	
		Estado fundamental	Estado excitado triplete
Ru–N(1)–O(1)	125,6 (2)	124,78	103,67
Ru–N(1)–S(1)	124,03(16)	123,27	127,52
O(1)–N(1)–S(1)	110,4(2)	111,86	116,62
N(1)–Ru–N(6)	178,76(11)	177,42	171,857
O(12)–S–O(13)	114,5(6)	114,40–115,74	114,079–115,771

^a Faixa observada para as três ligações S–O; ^b Faixa observada para as quatro ligações Ru–NH₃; ^c valores obtidos por difratometria de raio-X (ver Figura 4)

Figura 31. Distâncias e ângulos de ligação obtidos por cálculos computacionais (DFT) para a estrutura otimizada do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ no estado fundamental e triplete. A lista completa de ângulos e distâncias de ligação está listado na Tabela 7.

Fonte: autoria própria.

Figura 32. Estrutura otimizada (DFT) do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ no estado (A) fundamental e (B) triplete.

Fonte: Autoria própria.

Com base no exposto, é provável que a fotólise (355 nm) do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ favoreça a labilização do ligante N(O)SO₃. E de acordo com a literatura, que descreve que a espécie N(O)SO₃⁻ é instável⁴¹, é provável que após a labilização do ligante N(O)SO₃, a espécie formada em solução gere os radicais NO e SO₃^{•-}. Estes radicais identificados durante a fotólise do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺.

Além desses experimentos, a fotólise dos complexos **RuNOisn** e **RuNOSO₃isn** em diferentes intervalos de tempo, foi acompanhada por RMN de ¹H. Os resultados obtidos para o complexo **RuNOisn** estão apresentados na Figura 33.

Figura 33. Espectros de RMN de ¹H para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ irradiado em diferentes intervalos de tempo: (A) 5 min; (B) 20 min; (C) 40 min; (D) 60 min. Complexos irradiados em tampão fosfato pH 7,4 (200mM), 25°C sob fluxo de argônio. RMN com 50% de D₂O e 50% de tampão com a amostra. C_{Ru} solução irradiada = 20 mM; C_{Ru} RMN = 3,1 mM.

Fonte: autoria própria

Durante os primeiros 5 min de fotólise, apenas os dois dubletos correspondentes ao ligante isonicotinamida (isn) coordenado ao complexo **RuNOisn** foram observados (representados pela letra **Y** na Figura 33A). Após esse período ($t_{irr} > 5$ min), observou-se quatro dubletos, dois correspondentes ao complexo inicial **RuNOisn** (letra **Y**) e dois correspondentes ao ligante isn que foi labilizado da esfera de coordenação (representados pela letra **Z** na Figura 33B, C e D). Nas condições utilizadas neste experimento, no tempo de irradiação de $t_{irr} = 20$ min, ~2% do ligante isn havia sido labilizado do complexo **RuNOisn**, e nos tempos $t_{irr} = 40$ min e 60 min, esse valor cresceu respectivamente para ~5% e ~15% (Figura 33) (esses valores foram obtidos por meio da integração dos sinais de RMN de ^1H , e posterior comparação das áreas relativas).

No caso do complexo **RuNOSO₃isn**, Figura 34, no $t_{irr} = 5$ min já foi possível observar quatro dubletos, dois correspondentes ao ligante isn coordenado ao complexo **RuNOSO₃isn** (representados pela letra **X** na Figura 34), e os outros dois ao ligante isn que foi labilizado da esfera de coordenação (representados pela letra **Z** na Figura 34). Nas condições utilizadas neste experimento, aproximadamente 10%, 19%, 29% e 39% do ligante isn foi labilizado do complexo **RuNOSO₃isn** respectivamente nos tempos de irradiação de $t_{irr} = 5, 20, 40$ e 60 min (Figura 34). Além disso, no tempo de irradiação de 60 min, também foi possível observar dois dubletos com deslocamento químico igual ao observado para o ligante isn coordenado ao nitrosilo complexo **RuNOisn**, representado pela letra **Y** na Figura 34D. Apesar de ainda não totalmente compreendido, este último resultado sugere que provavelmente as espécies formadas em solução durante a fotólise do complexo **RuNOSO₃isn** reagiram e deram origem ao complexo **RuNOisn**.

Comparando-se os dados obtidos para a fotólise dos complexos **RuNOisn** e **RuNOSO₃isn**, é possível concluir que a labilização do ligante isonicotinamida ocorreu de forma mais efetiva no caso do complexo **RuNOSO₃isn** (compare as Figuras 33 e 34, e as % de ligante isn labilizado). Esse resultado está em acordo com os dados apresentados na seção 4.2 a respeito da estabilidade térmica dos complexos **RuNOisn** e **RuNOSO₃isn**. Naquela seção verificou-se que no intervalo de 24h, todo o ligante isonicotinamida havia sido labilizado da esfera de coordenação do complexo **RuNOSO₃isn**, enquanto que no caso do complexo **RuNOisn**, apenas 40% do ligante isonicotinamida havia sido labilizado ($t = 24$ h) e o restante continuava coordenado ao complexo.

Figura 34. Espectros de RMN de ^1H para o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ irradiado em diferentes intervalos de tempo: (A) 5 min; (B) 20 min; (C) 40 min; (D) 60 min. Complexos irradiados em tampão fosfato pH 7,4 (200mM), 25°C sob fluxo de argônio. RMN com 50% de D_2O e 50% de tampão com a amostra. C_{Ru} solução irradiada = 20 mM; C_{Ru} para RMN = 3,1 mM.

Fonte: Autoria própria.

Experimentos de ressonância paramagnética de elétrons (EPR) para as amostras obtidas durante a fotólise ($\lambda_{\text{irrad}} = 355 \text{ nm}$) dos complexos **RuNOisn** e **RuNOSO₃isn** ($C_{\text{Ru}} = 20 \text{ mM}$, tampão fosfato pH 7,4, $C=200 \text{ mM}$) demonstraram que no intervalo de tempo de fotólise de 10 min não foram identificadas espécies paramagnéticas. Em intervalos de tempo de irradiação maiores $t_{\text{irrad}} > 20 \text{ min}$, foi possível observar um sinal paramagnético, provavelmente referente a uma espécie de Ru(III), que ainda está sob investigação.

Nas discussões dos resultados obtidos nos ensaios fotoquímicos, decidiu-se avaliar primeiramente os dados adquiridos nos intervalos iniciais de fotólise ($t = 0 - 20 \text{ min}$). Essa decisão foi tomada para que durante as discussões, apenas as fotólises primárias estivessem

sob consideração, evitando-se assim discussões a respeito de produtos formados por fotólise secundária.

Em resumo, com base nos resultados preliminares apresentados até o momento a respeito da fotólise ($\lambda = 355$ nm) dos complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em tampão fosfato, pH 7,4, foi possível propor a formação das seguintes espécies em solução para o complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺:

- i) NO;
- ii) isn livre (labilizada do complexo);

E no caso da fotólise ($\lambda = 355$ nm) do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺, as seguintes espécies foram identificadas:

- i) SO₃^{•-};
- ii) NO;
- iii) isn livre (labilizada do complexo);

Esses resultados sugerem que o processo que está ocorrendo durante os intervalos iniciais de fotólise dos complexos **RuNOSO₃isn** e **RuNOisn** é a fotosubstituição (dos ligantes NO, isn e provavelmente N(O)SO₃) e não a fotooxidação (Eq. 17) geralmente descrita para nitrosilo complexos de Ru(II)^{91,99,101}.

Nos parágrafos a seguir serão discutidas as principais reações observadas em sistemas de pentaaminas de Ru(II), os quais, de certa forma, se assemelham aos resultados apresentados para a fotólise dos complexos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(NO)]³⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺, e por esse motivo, podem auxiliar na interpretação dos resultados obtidos neste trabalho.

A literatura sugere que no caso das tetra- e pentaaminas de Ru(II), respectivamente, *trans*-[Ru(NH₃)₄(L₁)(L₂)]ⁿ e [Ru(NH₃)₅(L₁)]ⁿ com ligantes L = piridina (py) e piridina substituídas (py-X), as principais reações fotoquímicas observadas são a fotossubstituição e a fotooxidação¹⁰². As pentaaminas de Ru(II) geralmente são caracterizadas por uma intensa banda de TCML¹⁰³ na região visível do espectro. O complexo mais amplamente estudado dessa série de compostos em reações fotoquímicas é a espécie [Ru(NH₃)₅(py)]²⁺^{102,104-106}, que tem uma banda de TCML em 407 nm ($\epsilon \sim 7700$ M⁻¹ cm⁻¹)¹⁰³. A irradiação com luz visível de

uma solução aquosa desse complexo resulta na aquação da amônia e da piridina coordenadas, conforme ilustrado na Figura 35.

Figura 35. Produtos formados pela irradiação na banda de TCML do complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py})]^{2+}$: labilização dos ligantes (a) piridina (py) e (b) amônia.

Fonte: Autoria própria com base nas ref. ^{102,106-107}.

Para esse sistema, ao irradiar-se o complexo com luz visível, ocorre a população de estados excitados de TCML (TCML*), o qual pode ser formalmente descrito como sendo formado por um centro de Ru(III) e por um ligante radical aniônico, ou seja, $[\text{Ru}(\text{III})\text{L}^-]$ (L = N=heterocíclicos, como piridina e isonicotinamida)¹⁰⁶. Entretanto, devido ao fato de as aminas de Ru(III) (d^5 baixo spin) serem relativamente inertes às reações de substituição, foi proposto que seria pouco provável que o estado excitado responsável por essas reações (Figura 35) fosse o de TCML* ^{102,106-107}. Além disso, embora a população do estado TCML* pudesse levar à formação de Ru(III), essa espécie não foi observada como produto no caso da fotólise das pentaaminas de Ru(II) (Figura 35)¹⁰⁶. Por esses motivos propôs-se que o estado excitado de campo ligante (LF*, do inglês *ligand field*) seria na verdade o responsável pelas reações de fotossustituição observadas no caso das aminas de Ru(II)^{102,106-108}.

A partir dessas observações foi então proposto um modelo conhecido como “*tuning*” dos estados excitados (do inglês *tuning-model*), elaborado com base na dependência da posição da banda de MLCT dos complexos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py-X})]^{2+}$ em relação aos substituintes “X” do ligante piridina, e ao solvente^{102,106,108}. Nesse modelo, seria possível variar a energia do estado TCML* sem que houvesse mudança significativa da energia do estado LF* ^{102,106}. Em alguns casos, seria possível obter-se a inversão da ordem energética desses dois estados. De acordo com esse modelo, complexos cujo estado excitado de menor energia (LEES, do inglês *Lower Energy Excited State*) fosse o de TCML*, não ocorreria a reação de substituição^{102,106,108}. Em contrapartida, quando o LEES fosse o de LF*, o complexo seria reativo às reações de substituição^{102,106}.

De acordo com esse modelo, no caso dos complexos ditos reativos, sugeriu-se que a irradiação da banda de TCML levaria à formação de um estado excitado TCML*, e que durante o processo de conversão interna para outro estado de TCML* de menor energia (Figura 36A) também poderia ocorrer uma etapa competitiva de cruzamento intersistemas (relativamente eficiente) para um estado excitado de LF* (Figura 36A)^{102,105-106,109}. A partir deste estado LF* é que aconteceriam então as reações de substituição ou de desativação não-radiativa para o estado fundamental^{102,105-106,109}. No caso dos complexos ditos “não-reativos”, a irradiação da banda de TCML (Figura 36B) seria seguida pela desativação para o estado excitado de menor energia (no caso, MLCT*) em competição com o cruzamento intersistemas para o estado LF*. Neste caso, a energia do LF* é maior que a do MLCT*, Figura 36B, e a reação de substituição não ocorre¹⁰⁶. O reflexo dessas modificações no LEES (Figura 36) foi verificado no rendimento quântico das reações de substituição, que no caso dos complexos ditos “não-reativos” (Figura 36B) apresentaram valores com até três ordens de magnitude menores em comparação aos rendimentos quânticos observados para os complexos “reativos”¹⁰⁶.

Figura 36. Modelo de diagramas de energia utilizados para explicar o comportamento fotoquímico dos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py-X})]^{2+}$ (py-X = piridina ou piridina substituída): complexos (A) reativos, e (B) não-reativos.

Fonte: Autoria própria com base na ref.¹⁰⁶.

No caso das tetraaminas de Ru(II) contendo o ligante nitrosilo ($trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO)]^{3+}$), o espectro eletrônico é bastante diferente do observado para as pentaaminas de Ru(II) com ligantes insaturados, tais como piridina e piridina substituída¹⁰². Nesses nitrosilo complexos apenas bandas com intensidade muito pequena ($\epsilon < 50 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) são observadas na região visível do espectro ($\lambda = 400\text{-}500 \text{ nm}$), bem como outras bandas mais intensas na região de maior energia ($210\text{-}280 \text{ nm}$)^{48-49,102}. De nosso conhecimento, no caso dos nitrosilo complexos de rutênio do tipo $trans-[Ru(NH_3)_4(L)(NO)]^{3+}$ nenhum dado foi publicado à respeito da labilização do ligante L na posição *trans* ao NO, e apenas a labilização de NO e a formação de Ru(III) foi sugerida (de acordo com a Eq. 17)^{49,52,91}. No caso do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(isn)(NO)]^{3+}$, a diferença entre os resultados reportados na literatura^{49,52,91} com os dados obtidos no presente trabalho podem ser decorrentes do pH utilizado nas reações fotoquímicas: na maioria dos resultados publicados^{49,52,91} a fotólise foi realizada em meio ácido, enquanto que no presente trabalho utilizou-se pH 7,4. Isso estaria de acordo com os experimentos de estabilidade do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(isn)(NO)]^{3+}$, apresentados na seção 4.2, nos quais verificou-se que a labilização térmica da isonicotinamida ocorreu apenas para a solução em pH 7,4 ($t = 24 \text{ h}$), e que nas mesmas condições em soluções aquosas com pH's 3,9 e 4,2 não observou-se a labilização da isonicotinamida (no período de $t = 24 \text{ h}$).

Descreve-se que para algumas aminas de Ru(II) possam ocorrer ambas as reações de fotosubstituição e fotooxidação¹¹⁰⁻¹¹¹ ao irradiar-se as bandas de TCML e LF, respectivamente. No caso do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(isn)(N(O)SO_3)](PF_6)$ os cálculos teóricos sugerem que a banda com $\lambda_{\text{max}} = 362 \text{ nm}$ tem contribuições de TCML $Ru \rightarrow N(O)SO_3$ e $Ru \rightarrow isn$, e também $d \rightarrow d$ (discutido na seção 4.1.4). Portanto, é provável que ambos os processos de fotooxidação e fotosubstituição possam ocorrer durante a fotólise do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(isn)(N(O)SO_3)]^+$, de acordo com os produtos identificados (discutidos no início desta seção).

Na Figura 37 estão resumidas as possíveis etapas e os produtos formados durante a fotólise do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(isn)(N(O)SO_3)]^+$. Cabe ressaltar que os ensaios fotoquímicos são ainda preliminares, e que um estudo mais aprofundado ainda está em andamento, e certamente auxiliará na melhor compreensão do mecanismo e dos intermediários formados nessa reação.

Figura 37. Possíveis etapas e produtos formados durante a fotólise ($\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$) do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ em solução aquosa de tampão fosfato pH 7,4. As espécies com contorno pontilhado são aquelas que não foram identificadas por técnicas espectroscópicas, mas que podem ser formadas, e as com linha contínua correspondem às espécies identificadas pelas técnicas espectroscópicas.

Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS

O ataque nucleofílico dos íons sulfito SO_3^{2-} ao nitrosilo complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ resultou na formação de um novo complexo, o nitrosilsulfito $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$. Diferentemente dos demais nitrosilsulfito complexos isolados, o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ é solúvel em água e apresenta boa estabilidade nesse solvente (entre os pH's 5,2 e 7,4). Em soluções mais ácidas (1,0 M CF_3COOH), o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ é convertido no nitrosilo de partida $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$. Por outro lado, a reação do complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{N}(\text{O})\text{SO}_3)]^+$ com íons OH^- leva à formação do nitro complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO}_2)]^+$, analogamente à reação entre o complexo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{isn})(\text{NO})]^{3+}$ e íons OH^- . A fotólise ($\lambda = 355 \text{ nm}$) do complexo

trans-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)]⁺ em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4) resulta na formação dos radicais SO₃^{•-} e NO.

Todas essas informações são úteis para o entendimento da reatividade do fragmento N(O)SO₃⁻, que foi muito pouco estudado até o momento. Além disso, a síntese do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) nos encoraja a isolar e estudar outros complexos do tipo *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(N(O)RS)]ⁿ obtidos a partir da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(NO)]³⁺ e SO₃²⁻ e também com outros nucleófilos de enxofre (RS⁻), principalmente aqueles com interesse biológico, tais como os tióis cisteína e glutathione.

7. REFERÊNCIAS

1. NETA, P.; HUIE, R. E. Free-Radical Chemistry of Sulfite. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, n. p. 209-217, 1985.
2. ALFASSI, Z. B. **S-Centered radicals**. Chichester: John Wiley & Sons, 1999. p.
3. TAKAHAMA, U.; HIROTA, S. Effects of the food additive sulfite on nitrite-dependent nitric oxide production under conditions simulating the mixture of saliva and gastric juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1102-1112, 2012.
4. RANGUELOVA, K.; MASON, R. P. New insights into the detection of sulfur trioxide anion radical by spin trapping: radical trapping versus nucleophilic addition. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 128-134, 2009.
5. PELLETIER, M.; LAVASTRE, V.; GIRARD, D. Activation of human epithelial lung A549 cells by the pollutant sodium sulfite: Enhancement of neutrophil adhesion. **Toxicological Sciences**, v. 69, n. 1, p. 210-216, 2002.
6. REIST, M.; MARSHALL, K. A.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. Toxic effects of sulphite in combination with peroxynitrite on neuronal cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 6, p. 2431-2438, 1998.
7. UTELL, M. J.; MORROW, P. E.; SPEERS, D. M.; DARLING, J.; HYDE, R. W. Airway Responses to Sulfate and Sulfuric-Acid Aerosols in Asthmatics - an Exposure-Response Relationship. **American Review of Respiratory Disease**, v. 128, n. 3, p. 444-450, 1983.
8. ZAMORA, P. L.; VILLAMENA, F. A. Theoretical and Experimental Studies of the Spin Trapping of Inorganic Radicals by 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide (DMPO). 3. Sulfur Dioxide, Sulfite, and Sulfate Radical Anions. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 116, n. 26, p. 7210-7218, 2012.
9. THOMAS, D.; SURDINKERJAN, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 503-&, 1997.
10. COHEN, H. J.; FRIDOVICH, I. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 2, p. 359-366, 1971.
11. GUNNISON, A. F. Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 667-682, 1981.
12. JOHNSON, J. L.; RAJAGOPALAN, K. V. Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase. Isolation and characterization of molybdenum and heme domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 6, p. 2017-2025, 1977.
13. KARAKAS, E.; WILSON, H. L.; GRAF, T. N.; XIANG, S.; JARAMILLO-BUSWUETS, S.; RAJAGOPALAN, K. V.; KISKER, C. Structural insights into sulfite oxidase deficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33506-33515, 2005.
14. FRIDOVICH, I.; HANDLER, P. Xanthine Oxidase .3. Sulfite Oxidation as an Ultra Sensitive Assay. **Journal of Biological Chemistry**, v. 233, n. 6, p. 1578-1580, 1958.
15. FRIDOVICH, I.; HANDLER, P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidations by the initiation of sulfite oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. p. 1836-1840, 1961.

16. SUN, X.; SHI, X.; DALAL, N. S. Xanthine oxidase/hydrogen peroxide generates sulfur trioxide anion radical ($\text{SO}_3^{\cdot-}$) from sulfite (SO_3^{2-}). **Febs Letters**, v. 303, n. 2-3, p. 213-216, 1992.
17. MOTTLEY, C.; MASON, R. P.; CHIGNELL, C. F.; SIVARAJAH, K.; ELING, T. E. The formation of sulfur trioxide radical anion during the prostaglandin hydroperoxidase-catalyzed oxidation of bisulfite (hydrated sulfur dioxide). **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 9, p. 5050-5055, 1982.
18. ARAISO, T.; MIYOSHI, K.; YAMAZAKI, I. Mechanisms of electron transfer from sulfite to horseradish peroxidase-hydroperoxide compounds. **Biochemistry**, v. 15, n. 14, p. 3059-3063, 1976.
19. MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6056-6063, 1969.
20. SHI, X. Generation of $\text{SO}_3^{\cdot-}$ and OH radicals in SO_3^{2-} reactions with inorganic environmental pollutants and its implications to SO_3^{2-} toxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 56, n. 3, p. 155-165, 1994.
21. DAS, T. N.; HUIE, R. E.; NETA, P. Reduction potentials of $\text{SO}_3^{\cdot-}$, $\text{SO}_5^{\cdot-}$, and $\text{S}_4\text{O}_6^{3-}$ radicals in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 18, p. 3581-3588, 1999.
22. ALIPAZAGA, M. V.; MORENO, R. G.; LINARES, E.; MEDEIROS, M. H.; COICHEV, N. DNA damage by sulfite autoxidation catalyzed by cobalt complexes. **Dalton Transactions**, v. n. 41, p. 5636-5644, 2008.
23. ALIPAZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M.; LINARES, E.; MEDEIROS, M. H. G.; COICHEV, N. Oxidative DNA damage induced by autoxidation of microquantities of S(IV) in the presence of Ni(II)-Gly-Gly-His. **Dalton Transactions**, v. n. 23, p. 3738-3744, 2005.
24. MORENO, R. G.; ALIPAZAGA, M. V.; MEDEIROS, M. H.; COICHEV, N. DNA damage induced by sulfite autoxidation catalyzed by copper(II) tetraglycine complexes. **Dalton Transactions**, v. n. 6, p. 1101-1107, 2005.
25. WIETZERBIN, K.; MULLER, J. G.; JAMETON, R. A.; PRATVIEL, G.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B.; BURROWS, C. J. Hydroxylation, epoxidation, and DNA cleavage reactions mediated by the biomimetic Mn-TMPyP/O-2/sulfite oxidation system. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 18, p. 4123-4127, 1999.
26. NETA, P.; HUIE, R. E.; ROSS, A. B. Rate Constants for Reactions of Inorganic Radicals in Aqueous-Solution. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 17, n. 3, p. 1027-1284, 1988.
27. HAYON, E.; TREININ, A.; WILF, J. Electronic Spectra, Photochemistry, and Autoxidation Mechanism of Sulfite-Bisulfite-Pyrosulfite Systems - $\text{SO}_2^{\cdot-}$, $\text{SO}_3^{\cdot-}$, $\text{SO}_4^{\cdot-}$, and $\text{SO}_5^{\cdot-}$ Radicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 1, p. 47-57, 1972.
28. HUIE, R. E.; NETA, P. Chemical Behavior of $\text{So}_3^{\cdot-}$ and $\text{So}_5^{\cdot-}$ Radicals in Aqueous-Solutions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 23, p. 5665-5669, 1984.
29. NETA, P.; HUIE, R. E. One-Electron Redox Reactions Involving Sulfite Ions and Aromatic-Amines. **Journal of Physical Chemistry**, v. 89, n. 9, p. 1783-1787, 1985.

30. GUO, Y.; LOU, X.; FANG, C.; XIAO, D.; WANG, Z.; LIU, J. Novel photo-sulfite system: toward simultaneous transformations of inorganic and organic pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 19, p. 11174-11181, 2013.
31. SARALA, R.; STANBURY, D. M. Oxidations of Sulfite by Hexachloroiridate(IV) and Tris(2,2'-Bipyridine)Osmium(III) - 2 Reinvestigations. **Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 18, p. 3456-3460, 1990.
32. OZAWA, T.; KWAN, T. ESR studies on the reactions of sulphite radical anion, SO_3^- , with olefinic compounds in aqueous solutions. **Polyhedron**, v. 5, n. p. 1531-1536, 1986.
33. LEE, Y. J.; ROCHELLE, G. T. Oxidative degradation of organic acid conjugated with sulfite oxidation in flue gas desulfurization: products, kinetics, and mechanism. **Environmental Science & Technology**, v. 21, n. 3, p. 266-272, 1987.
34. GILBERT, B. C.; SMITH, J. R. L.; TAYLOR, P.; WARD, S.; WHITWOOD, A. C. The interplay of electronic, steric and stereoelectronic effects in hydrogen-atom abstraction reactions of SO_4 -center dot, revealed by EPR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, v. n. 8, p. 1631-1637, 1999.
35. ZHANG, B. T.; ZHANG, Y.; TENG, Y. H.; FAN, M. H. Sulfate Radical and Its Application in Decontamination Technologies. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 16, p. 1756-1800, 2015.
36. LUTZE, H. V.; BIRCHER, S.; RAPP, I.; KERLIN, N.; BAKKOUR, R.; GEISLER, M.; VON SONNTAG, C.; SCHMIDT, T. C. Degradation of Chlorotriazine Pesticides by Sulfate Radicals and the Influence of Organic Matter. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 3, p. 1673-1680, 2015.
37. LIN, Y. T.; LIANG, C. J.; CHEN, J. H. Feasibility study of ultraviolet activated persulfate oxidation of phenol. **Chemosphere**, v. 82, n. 8, p. 1168-1172, 2011.
38. NEPPOLIAN, B.; CELIK, E.; CHOI, H. Photochemical oxidation of arsenic(III) to arsenic(V) using peroxydisulfate ions as an oxidizing agent. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 16, p. 6179-6184, 2008.
39. KENNEDY, R. J.; STOCK, A. M. The Oxidation of Organic Substances by Potassium Peroxymonosulfate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 1901-1906, 1960.
40. BOTTOMLEY, F. Electrophilic Behavior of Coordinated Nitric-Oxide. **Accounts of Chemical Research**, v. 11, n. 4, p. 158-163, 1978.
41. BOTTOMLEY, F.; BROOKS, W. V. F.; PAEZ, D. E.; WHITE, P. S.; MUKAIDA, M. Electrophilic Behavior of Nitrosyls - the Boedeker Reaction, the Reactions of Sulfite with Nitrosyls, and the Crystal and Molecular-Structure of Cis-Bis(2,2'-Bipyridine)Chloro(Nitrosylsulphito)Ruthenium. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, v. n. 11, p. 2465-2472, 1983.
42. BOEDEKER, C. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 117, n. p. 193-195, 1861.
43. SWINEHART, J. H. The nitroprusside ion. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 2, n. p. 385-402, 1967.

44. MOSER, W.; CHALMERS, R. A.; FOGG, A. G. The Boedeker Reaction - I. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 27, n. p. 831-840, 1965.
45. FOGG, A. G.; NORBURY, A. H.; MOSER, W. The Boedeker reaction - IV: caesium sulphitonitroprusside. **Journal of Nuclear Chemistry**, v. 28, n. p. 2753-2755, 1966.
46. ANDRADE, C.; SWINEHART, J. H. The Reactions of Pentacyanonitrosylferrate(III) with Bases. VI. Sulfite. The Boedeker Reaction. **Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 648-650, 1972.
47. WILLIAMS, D. L. H. **Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2004. 268 p.
48. BORGES, S. S.; DAVANZO, C. U.; CASTELLANO, E. E.; Z-SCHPECTOR, J.; SILVA, S. C.; FRANCO, D. W. Ruthenium Nitrosyl Complexes with N-Heterocyclic Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2670-2677, 1998.
49. GOMES, M. G.; DAVANZO, C. U.; SILVA, S. C.; LOPES, L. G. F.; SANTOS, P. S.; FRANCO, D. W. Cis- and trans-nitrosyltetraammineruthenium(II). Spectral and electrochemical properties and reactivity. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, v. n. 4, p. 601-607, 1998.
50. TFOUNI, E.; DORO, F. G.; FIGUEIREDO, L. E.; PEREIRA, J. C. M.; METZKER, G.; FRANCO, D. W. Tailoring NO Donors Metallopharmaceuticals: Ruthenium Nitrosyl Ammines and Aliphatic Tetraazamacrocycles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3643-3657, 2010.
51. TFOUNI, E.; DORO, F. G.; GOMES, A. J.; DA SILVA, R. S.; METZKER, G.; BENINI, P. G. Z.; FRANCO, D. W. Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 3-4, p. 355-371, 2010.
52. TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1-2, p. 57-69, 2003.
53. TFOUNI, E.; TRUZZI, D. R.; TAVARES, A.; GOMES, A. J.; FIGUEIREDO, L. E.; FRANCO, D. W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.
54. TOLEDO, 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**, v. n. 9, p. 1879-1885, 2004.
55. SOUZA, M. L.; ROVEDA JR, A. C.; PEREIRA, J. C. M.; FRANCO, D. W. New perspectives on the reactions of metal nitrosyls with thiolates as nucleophiles. **Coordination Chemistry Reviews**, v. doi:10.1016/j.ccr.2015.03.008, n. p. 2015.
56. PEREIRA, J. C. M.; SOUZA, M. L.; FRANCO, D. W. Nitric oxide and nitroxyl products from the reaction of L-cysteine with *trans*-[RuNO(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 6, p. 1005-1011, 2015.
57. RONCAROLI, F.; RUGGIERO, M. E.; FRANCO, D. W.; ESTIU, G. L.; OLABE, J. A. Kinetic, mechanistic, and DFT study of the electrophilic reactions of nitrosyl complexes with hydroxide. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 22, p. 5760-5769, 2002.

58. ROVEDA, A. C.; PAPA, T. B. R.; CASTELLANO, E. E.; FRANCO, D. W. PAMAM dendrimers functionalized with ruthenium nitrosyl as nitric oxide carriers. **Inorganica Chimica Acta**, v. 409, n. p. 147-155, 2014.
59. ALBERT, A.; SERJEANT, E. P. **The Determination of Ionization Constants**. New York: Chapman and Hall, 1984. p.
60. CLOWER, C.; SOLNTSEV, K. M.; KOWALIK, J.; TOLBERT, L. M.; HUPPERT, D. Photochemistry of "Super" photoacids. 3. Excited-state proton transfer from perfluoroalkylsulfonyl-substituted 2-naphthols(1). **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 13, p. 3114-3122, 2002.
61. MISKOLCZY, Z.; MEGYESI, M.; BICZOK, L.; GORNER, H. Effect of electrolytes, nucleotides and DNA on the fluorescence of flavopereirine natural alkaloid. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 592-600, 2011.
62. BUETTNER, G. R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 259-303, 1987.
63. HOSHINO, M.; OZAWA, K.; SEKI, H.; FORD, P. C. Photochemistry of Nitric-Oxide Adducts of Water-Soluble Iron(III) Porphyrin and Ferrihemoproteins Studied by Nanosecond Laser Photolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 21, p. 9568-9575, 1993.
64. ENRAF-NONIUS. (1997-2000). *COLLECT*, Nonius BV. Delft: The Netherlands
65. OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W.; DENZO, H. K. L. 1997. Macromolecular Crystallography, Part A. In *Methods in Enzymology*, Vol. 276. New York: Academic Press
66. SHELDRICK, G. M. (1997). *SHELXS97*, Program for Crystal Structure Refinement. University of Gottingen, Gottingen, Germany.
67. FARRUGIA, L. J. ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, n. p. 565, 1997.
68. FRISCH, M. J. *et. al.* Gaussian 09; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009. v. n. p.
69. HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review B**, v. 136, n. 3B, p. B864-B871, 1964.
70. KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. 1133-&, 1965.
71. BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.
72. LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.
73. GODBOUT, N.; SALAHUB, D. R.; ANDZELM, J.; WIMMER, E. Optimization of Gaussian-Type Basis-Sets for Local Spin-Density Functional Calculations .1. Boron through Neon, Optimization Technique and Validation. **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie**, v. 70, n. 2, p. 560-571, 1992.

74. SOSA, C.; ANDZELM, J.; ELKIN, B. C.; WIMMER, E.; DOBBS, K. D.; DIXON, D. A. A Local Density Functional-Study of the Structure and Vibrational Frequencies of Molecular Transition-Metal Compounds. **Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 16, p. 6630-6636, 1992.
75. MCLEAN, A. D.; CHANDLER, G. S. Contracted Gaussian-Basis Sets for Molecular Calculations .1. 2nd Row Atoms, Z=11-18. **Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 10, p. 5639-5648, 1980.
76. KRISHNAN, R.; BINKLEY, J. S.; SEEGER, R.; POPLE, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .20. Basis Set for Correlated Wave-Functions. **Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 1, p. 650-654, 1980.
77. CANCES, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **Journal of Chemical Physics**, v. 107, n. 8, p. 3032-3041, 1997.
78. O'BOYLE, N. M.; TENDERHOLT, A. L.; LANGNER, K. M. cclib: A library for package-independent computational chemistry algorithms. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 839-845, 2008.
79. ROVEDA JR., A. C.; PAPA, T. B. R.; CASTELLANO, E. E.; FRANCO, D. W. PAMAM dendrimers functionalized with ruthenium nitrosyl as nitric oxide carriers. **Inorganica Chimica Acta**, v. 409 part A, n. Special Issue, p. 147-155, 2014.
80. KIM, C.; NOVOZHILOVA, I.; GOODMAN, M. S.; BAGLEY, K. A.; COPPENS, P. On the Photochemical Behavior of the trans-[Ru(NH₃)₄(NO)nicotinamide]³⁺ Cation and the Relative Stability of Light-Induced Metastable Isonitrosyl Isomers of Ru Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. p. 5791-5795, 2000.
81. CARLOS, R. M.; CARDOSO, D. R.; CASTELLANO, E. E.; OSTI, R. Z.; CAMARGO, A. J.; MACEDO, L. G.; FRANCO, D. W. Reactivity of radicals generated on irradiation of trans-[Ru(NH₃)₄(NO₂)P(OEt)(3)](PF₆). **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 8, p. 2546-2555, 2004.
82. HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. **Inorganic Chemistry**. San Diego, Academic Press; Berlin, New York, De Gruyter: 2001. 1884 p.
83. COE, B. J.; GLENWRIGHT, S. J. Trans-effects in octahedral transition metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 203, n. p. 5-80, 2000.
84. NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p.
85. ROVEDA JR., A. C.; AGUIAR, H. D.; MIRANDA, K. M.; TADINI, C. C.; FRANCO, D. W. Light-triggered and cysteine-mediated nitric oxide release from a biodegradable starch-based film. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 41, p. 7232-7242, 2014.
86. TOLEDO, J. C.; NETO, B. D. S. L.; FRANCO, D. W. Mutual effects in the chemical properties of the ruthenium metal center and ancillary ligands upon coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 3-4, p. 419-431, 2005.
87. FORD, P. C. Properties and Reactions of Ruthenium(II) Amine Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 75-99, 1970.

88. ISIED, S.; TAUBE, H. Effects of SO₂, HSO₃⁻, and SO₃²⁻ as Auxiliary Ligands on Reactivity of Ammineruthenium(II)-Ligand Bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1545-1551, 1974.
89. RONCAROLI, F.; OLABE, J. A. The reactions of nitrosyl complexes with cysteine. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 4719-4727, 2005.
90. GUZZI, M. E. R. (2002), Estudo da reação entre íons OH⁻ e nitrosilo complexos de tetraaminas de rutênio (II). Dissertação, Universidade de São Paulo, São Carlos.
91. 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(NH₃)(4)L(NO)](3+) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 5, p. 1381-1388, 2004.
92. AKAIKE, T.; YOSHIDA, M.; MIYAMOTO, Y.; SATO, K.; KOHNO, M.; SASAMOTO, K.; MIYAZAKI, K.; UEDA, S.; MAEDA, H. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.NO through a radical reaction. **Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 827-832, 1993.
93. HOGG, N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 122-129, 2010.
94. JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B.; HYDE, J. S. Trapping of nitric oxide by nitronyl nitroxides: an electron spin resonance investigation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 192, n. 2, p. 926-934, 1993.
95. AMANO, F.; NODA, T. Improved detection of nitric oxide radical (NO[.]) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent. **Febs Letters**, v. 368, n. 3, p. 425-428, 1995.
96. VENKATARAMAN, S.; MARTIN, S. M.; BUETTNER, G. R. Electron paramagnetic resonance for quantitation of nitric oxide in aqueous solutions. In: *Methods in Enzymology*. 2002. v. 359, p. 3-18.
97. EICH, R. F.; LI, T. S.; LEMON, D. D.; DOHERTY, D. H.; CURRY, S. R.; AITKEN, J. F.; MATHEWS, A. J.; JOHNSON, K. A.; SMITH, R. D.; PHILLIPS, G. N.; OLSON, J. S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. **Biochemistry**, v. 35, n. 22, p. 6976-6983, 1996.
98. HEROLD, S.; EXNER, M.; NAUSER, T. Kinetic and mechanistic studies of the NO center dot-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. **Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3385-3395, 2001.
99. MERKLE, A. C.; MCQUARTERS, A. B.; LEHNERT, N. Synthesis, spectroscopic analysis and photolabilization of water-soluble ruthenium(III)-nitrosyl complexes. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 26, p. 8047-8059, 2012.
100. TITHERADGE, M. A. **Nitric Oxide Protocols** Totowa: Humana Press, 1998. 324 p.
101. ROSE, M. J.; MASCHARAK, P. K. Photoactive ruthenium nitrosyls: Effects of light and potential application as NO donors. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 18-20, p. 2093-2114, 2008.

102. TFOUNI, E. Photochemical reactions of ammineruthenium(II) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 196, n. p. 281-305, 2000.
103. FORD, P. C.; SUTTON, C. Syntheses of Cis- and Trans-Tetraamminebis(Pyridine)Ruthenium(2) . High Stereospecificity in Ruthenium(2) Substitution Reactions. **Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 1544-&, 1969.
104. FORD, P. C.; STUERMER, D. H.; MCDONALD, D. P. Photochemical Reaction Pathways of Pentaammineruthenium(II) Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 22, p. 6209-&, 1969.
105. MALOUF, G.; FORD, P. C. Photochemical Reaction Pathways of Ruthenium(II) Complexes - Evidence Regarding Reactive Excited State(S) from Metal-to-Ligand Charge-Transfer Excitation of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}^{2+}$ and Related Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 2, p. 601-603, 1974.
106. MALOUF, G.; FORD, P. C. Photochemistry of Ruthenium(II) Ammine Complexes, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{Py-X})^{2+}$ - Variation of Systemic Parameters to Modify Photochemical Reactivities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 22, p. 7213-7220, 1977.
107. CARLOS, R. M.; NEUMANN, M. G.; TFOUNI, E. Energy of the photosubstitutionally reactive excited state of pentaammine(pyridine)ruthenium(II). **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 2229-2234, 1996.
108. WAGENKNECHT, P. S.; FORD, P. C. Metal centered ligand field excited states: Their roles in the design and performance of transition metal based photochemical molecular devices. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 5-6, p. 591-616, 2011.
109. CARLOS, R. M.; TFOUNI, E.; NEUMANN, M. G. O comportamento fotoquímicos dos complexos pentaaminas de rutênio(II) com ligantes π insaturados. **Química Nova**, v. 20, n. p. 270-278, 1997.
110. HINTZE, R. E.; FORD, P. C. Photochemical Reaction Pathways of Ruthenium(II) Complexes - Photoredox and Photosubstitution Reactions of Acetonitrile Complex $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{ch}_3\text{cn}^{2+}$ and of Dinitrogen Complex $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{n}_2^{2+}$. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 10, p. 2664-2671, 1975.
111. MATSUBARA, T.; FORD, P. C. Photochemistry of Ruthenium(II)-Saturated Amine Complexes $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}^{2+}$, and $\text{Ru}(\text{en})_3^{2+}$ in Aqueous-Solution. **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 1747-1752, 1978.

ANEXO A. (A) Função de Boltzman e (B) modelo da curva utilizada para a determinação do pK_a . Os dados foram tratados com o software *Origin 8.5*.

A

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

B

ANEXO B. Dados da estrutura cristalina e refinamento para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)₂](SiF₆)

Fórmula	C ₁₂ H ₅₂ F ₆ N ₁₄ O ₁₈ Ru ₂ S ₂ Si
Peso molecular	1089.02
Temperatura	294(2) K
Comprimento de onda	0.71073 Å
Sistema do Cristal	Monoclinic
Grupo espacial	P 21/c
Dimensões da cela unitária	a = 10.2327(3) Å α= 90°. b = 7.6785(2) Å β= 100.010(2)°. c = 25.6090(8) Å γ= 90°.
Volume	1981.51(10) Å ³
Z	2
Densidade (calculada)	1.825 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	1.009 mm ⁻¹
F(000)	1108
Dimensões do cristal	0.276 x 0.241 x 0.065 mm ³
Faixa de θ para a coleta de dados	2.358 to 25.990°.
Faixa de índices	-9 ≤ h ≤ 12, -9 ≤ k ≤ 8, -27 ≤ l ≤ 31
Reflexões coletadas	9163
Reflexões independentes	3833 [R(int) = 0.0467]
Integralidade à θ = 25.242°	98.6 %
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restrições / parâmetros	3833 / 12 / 303
Goodness-of-fit on F ²	1.087
Índice R final [I>2σ(I)]	R1 = 0.0325, wR2 = 0.0887
Índices R (todos os dados)	R1 = 0.0449, wR2 = 0.0961
Coeficiente de Extinção	n/a
Largest diff. peak and hole	0.692 and -0.812 e.Å ⁻³

Anexo C. Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)

$U(\text{eq})$ é definido como um terço do traço do tensor U_{ij} ortogonalizado.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Ru	9650(1)	5064(1)	1385(1)	20(1)
S	11889(1)	5096(1)	2474(1)	27(1)
O(1)	11674(3)	7431(4)	1754(1)	50(1)
O(2)	4218(3)	2261(4)	-600(1)	41(1)
O(11)	13223(12)	5740(30)	2567(8)	54(4)
O(111)	12480(30)	3540(30)	2321(7)	89(7)
O(12)	11780(20)	3288(14)	2426(4)	52(4)
O(112)	10848(12)	4860(50)	2772(7)	105(9)
O(13)	11047(15)	5860(20)	2795(5)	56(4)
O(113)	12860(20)	6330(20)	2709(5)	56(4)
N(1)	11115(3)	6045(4)	1835(1)	27(1)
N(2)	10721(3)	5313(4)	753(1)	28(1)
N(3)	8858(3)	7610(4)	1248(1)	31(1)
N(4)	8505(3)	4867(4)	2008(1)	32(1)
N(5)	10375(3)	2456(4)	1453(1)	32(1)
N(6)	7959(3)	3991(4)	860(1)	23(1)
N(7)	3575(3)	1204(4)	132(1)	40(1)
C(1)	4426(4)	2012(5)	-117(2)	29(1)
C(2)	5689(3)	2649(4)	226(1)	27(1)
C(3)	6461(3)	3883(5)	31(1)	28(1)
C(4)	7564(3)	4542(5)	357(1)	26(1)
C(5)	7237(4)	2727(4)	1037(1)	29(1)
C(6)	6095(3)	2048(5)	741(2)	29(1)
Si	0	0	0	21(1)
F(1)	-1109(2)	376(3)	397(1)	45(1)
F(2)	576(2)	2055(3)	97(1)	43(1)
F(3)	1085(2)	-679(3)	526(1)	49(1)
O(1W)	3301(4)	375(5)	1270(2)	67(1)
O(2W)	5669(4)	6056(5)	1554(1)	62(1)
O(3W)	3382(4)	4016(5)	1184(2)	68(1)
O(4W)	5426(3)	3518(5)	2830(2)	71(1)

ANEXO D. Distâncias (Å) e ângulos de ligação(°) para o crista do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)₂(SiF₆)

Ru-N(1)	1.881(3)	C(2)-C(3)	1.382(5)
Ru-N(2)	2.116(3)	C(2)-C(6)	1.392(5)
Ru-N(3)	2.122(3)	C(3)-C(4)	1.378(5)
Ru-N(5)	2.132(3)	C(5)-C(6)	1.380(5)
Ru-N(4)	2.142(3)	Si-F(3)#1	1.673(2)
Ru-N(6)	2.161(3)	Si-F(3)	1.673(2)
S-O(12)	1.396(11)	Si-F(1)#1	1.675(2)
S-O(13)	1.417(11)	Si-F(1)	1.675(2)
S-O(11)	1.433(11)	Si-F(2)	1.687(2)
S-N(1)	1.839(3)	Si-F(2)#1	1.687(2)
O(1)-N(1)	1.242(4)	O(1W)-H(11)	0.948(19)
O(2)-C(1)	1.234(4)	O(2W)-H(21)	0.960(19)
O(11)-O(113)	0.719(11)	O(2W)-H(22)	0.929(19)
N(6)-C(5)	1.345(4)	O(3W)-H(31)	0.95(2)
N(6)-C(4)	1.350(4)	O(3W)-H(32)	0.96(2)
N(7)-C(1)	1.319(5)	O(4W)-H(41)	0.95(2)
C(1)-C(2)	1.511(5)	O(4W)-H(42)	0.944(19)
N(1)-Ru-N(2)	88.21(12)	O(1)-N(1)-S	110.4(2)
N(1)-Ru-N(3)	88.49(12)	O(1)-N(1)-Ru	125.6(2)
N(2)-Ru-N(3)	91.35(12)	S-N(1)-Ru	124.03(16)
N(1)-Ru-N(5)	95.60(12)	C(5)-N(6)-C(4)	117.1(3)
N(2)-Ru-N(5)	85.86(12)	C(5)-N(6)-Ru	119.5(2)
N(3)-Ru-N(5)	174.97(11)	C(4)-N(6)-Ru	123.3(2)
N(1)-Ru-N(4)	93.08(12)	O(2)-C(1)-N(7)	122.9(3)
N(2)-Ru-N(4)	177.80(11)	O(2)-C(1)-C(2)	120.9(3)
N(3)-Ru-N(4)	86.91(12)	N(7)-C(1)-C(2)	116.2(3)
N(5)-Ru-N(4)	95.78(12)	C(3)-C(2)-C(6)	118.3(3)
N(1)-Ru-N(6)	178.76(11)	C(3)-C(2)-C(1)	119.8(3)
N(2)-Ru-N(6)	91.33(11)	C(6)-C(2)-C(1)	121.9(3)
N(3)-Ru-N(6)	90.37(11)	C(4)-C(3)-C(2)	119.5(3)
N(5)-Ru-N(6)	85.52(11)	N(6)-C(4)-C(3)	122.8(3)
N(4)-Ru-N(6)	87.35(11)	N(6)-C(5)-C(6)	123.4(3)
O(12)-S-O(13)	114.5(6)	C(5)-C(6)-C(2)	118.7(3)
O(12)-S-O(11)	114.5(6)	F(3)#1-Si-F(1)#1	89.42(13)
O(13)-S-O(11)	114.7(8)	F(3)-Si-F(1)#1	90.58(13)
O(111)-S-O(11)	84.2(7)	F(3)#1-Si-F(1)	90.58(13)
O(112)-S-O(11)	137.1(7)	F(3)-Si-F(1)	89.42(13)
O(113)-S-O(11)	29.1(4)	F(3)#1-Si-F(2)	89.60(12)
O(12)-S-N(1)	107.6(5)	F(3)-Si-F(2)	90.40(12)
O(13)-S-N(1)	98.2(5)	F(1)#1-Si-F(2)	89.67(12)
O(111)-S-N(1)	103.0(7)	F(1)-Si-F(2)	90.33(12)

O(112)-S-N(1)	106.3(5)	F(3)#1-Si-F(2)#1	90.40(12)
O(113)-S-N(1)	105.9(5)	F(3)-Si-F(2)#1	89.60(12)
O(11)-S-N(1)	105.2(5)	F(1)#1-Si-F(2)#1	90.33(12)
O(113)-O(11)-S	75.3(16)	F(1)-Si-F(2)#1	89.67(12)
O(12)-O(111)-S	71.2(13)	H(11)-O(1W)-H(12)	111(4)
O(111)-O(12)-S	74.7(14)	H(21)-O(2W)-H(22)	110(4)
O(13)-O(112)-S	73.2(13)	H(31)-O(3W)-H(32)	103(4)
O(112)-O(13)-S	74.5(17)	H(41)-O(4W)-H(42)	107(4)
O(11)-O(113)-S	75.6(16)		

Transformações de simetria utilizadas para gerar os átomos equivalentes: #1 -x,-y,-z

ANEXO E. Espectros de RMN de ^1H para a isonicotinamida em diferentes pH's (A) tampão fosfato pH 7,4, (B) tampão acetato, pH 5,2, e (C) tampão acetato, pH 3,9. RMN com 50% de D_2O e 50% de tampão com a amostra. Referência: TMSP- d_4 , com $\delta = 0$ ppm.

pH 7,4

pH 5,2

pH 3,9

ANEXO F. Superfície de contorno dos orbitais do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆) listados na Tabela 4. Visão frontal, lateral e superior do complexo. Os números entre parênteses indicam a numeração do orbital.

HOMO (101)	LUMO (102)	L+1 (103)

Cont. Anexo F

H-7 94	H-8 93

ANEXO G. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{NO}]^{3+}$ (a) antes e (b) após a reação com íons sulfito (solução aquosa, 20x de excesso de sulfito).

ANEXO H. Espectros de EPR para uma solução de sulfito de sódio + PTIO, irradiado com $\lambda = 355 \text{ nm}$ por 8 minutos (10 pulsos/s).

ANEXO I. Alterações no espectro eletrônico durante a fotólise de uma solução contendo oxiMb e sulfito de sódio (a) oxiMb (traço em azul) e (b) metMb (traço em vermelho). Condições: 5,0 μM de oxiMb, $2,0 \times 10^{-4}$ M de Na_2SO_3 , em solução de tampão fosfato (pH 7,4, 100 mM); $\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm, 5mJ/pulso, T = 2 °C, espectros adquiridos a cada 2 min de fotólise.

ANEXO J. Composição orbital para o estado tripleto do complexo *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆).

			Contribuição (%)			
	Nº orbital	Orbital	isn	NH3	NOSO ₃	Ru
α	103	LUMO	98	0	0	2
	102	HOMO	2	1	77	20
β	101	LUMO	5	2	32	62
	100	HOMO	4	2	54	40