UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTUDO DE ALGUNS CARBOXILATOS MONO-, BI- E TRINUCLEARES DE
RUTÊNIO: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS QUÍMICOS, INTERAÇÕES COM
BIOMOLÉCULAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOLÓGICAS**

Prof. Dra. Sofia Nikolaou

Análise crítica da obra da candidata Prof. Dra. Sofia Nikolaou, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Livre Docente na área de Química

Ribeirão Preto

2017

DEDICATÓRIA

À minha linda família
Ao Professor Henrique Eisi Toma
Aos meus alunos

AGRADECIMENTOS

Nesse ponto da minha trajetória acadêmica, após cerca de 25 anos de USP (entre graduação, pós-graduação, pós-doutoramento e docência), o risco de fazer uma lista nominal de agradecimentos incompleta é muitíssimo maior do que a possibilidade de cumprir essa tarefa a contento. Por isso, não pretendo me arriscar e proponho um agradecimento geral a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, com meu trabalho e com minha vida. Ainda assim não me furtarei a fazer alguns poucos agradecimentos específicos.

Em primeiro lugar, agradeço ao Igor, meu amor de todos os tempos, de toda a vida. E a meus filhos, Cassiel e Dimitri. Eles sim são a melhor obra que realizei; a única que realmente vale a pena.

Como não poderia deixar de ser, agradeço a meu orientador de doutorado, o Professor Henrique Eisi Toma. Pesquisador brilhante, que me concedeu a honra de seu convívio por um curto período de tempo, mas que, entre muitas outras coisas, me sensibilizou para sempre com a beleza da Química de Coordenação.

Agradeço ao Professor Roberto Santana da Silva, quem me acolheu e me deu suporte durante quase dez anos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

E agradeço enormemente aos meus alunos. Não sei se eles sabem, mas eu aprendo mais com eles do que eles comigo!

Por fim agradeço às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES, sem as quais nada disso seria possível.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
APRESENTAÇÃO DO TEXTO	V
PREÂMBULO – METALO-FÁRMACOS BASEADOS EM COMPLEXOS DE RUTÊNIO.....	IX
CAPÍTULO 1.....	1
1 CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO COM PONTE μ-OXO	1
1.1 CARBOXILATOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO: ASPECTOS GERAIS DE SUA QUÍMICA E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS	1
1.2 O QUE MAIS HÁ PARA SABER SOBRE CLUSTERS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO SIMÉTRICOS?	6
1.2.1 <i>Análise estrutural a partir de dados de difração de raio-X</i>	8
1.2.2 <i>Estrutura eletrônica dos complexos</i>	11
1.2.3 <i>Geometria de equilíbrio dos compostos 1 – 6 obtidas por modelagem molecular</i>	15
1.2.4 <i>Espectroscopia de RMN e estrutura eletrônica</i>	17
1.2.5 <i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	25
1.2.6 <i>Espectroscopia de absorção e voltametria cíclica</i>	28
1.2.7 <i>Considerações parciais</i>	34
1.3 REVISITANDO OS COMPLEXOS ASSIMÉTRICOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO COORDENADOS A UM LIGANTE CO	36
1.3.1 <i>Estrutura de raios X</i>	38
1.3.2 <i>RMN de ^1H</i>	41
1.3.3 <i>Espectroscopia Eletrônica</i>	46
1.3.4 <i>Espectroscopia de infravermelho (IV)</i>	49
1.3.5 <i>Voltametria cíclica</i>	52
1.3.6 <i>Fotoreatividade</i>	54
1.3.7 <i>Considerações Parciais</i>	56
1.4 CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPLEXO TRINUCLEAR DE RUTÊNIO COORDENADO AO ÓXIDO NÍTRICO.....	57
1.4.1 <i>Espectroscopia eletrônica, modelagem molecular e medidas eletroquímicas</i>	59
1.4.2 <i>Espectroscopia de Infra-vermelho</i>	62
1.4.3 <i>^1H-RMN e EPR</i>	64
1.4.4 <i>Fotólise</i>	65
1.4.5 <i>Considerações Parciais</i>	70
1.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ALGUNS COMPLEXOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO E SUAS INTERAÇÕES COM ALBUMINA DO SORO HUMANO	71
1.5.1 <i>Citotoxicidade in vitro contra célula de melanoma do cluster $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{NO}]\text{PF}_6$</i>	71

1.5.2	<i>Interação dos complexos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(L)]PF_6$ no quais $L = NO$ ou H_2O com albumina do soro humano</i>	75
1.5.2.1	Considerações parciais	83
1.5.3	<i>Atividade tripanocida de complexos trinucleares de rutênio simétricos combinados com ligantes azanaftalenos</i>	83
CAPÍTULO 2		88
2 CARBOXILATOS BINUCLEARES DE RUTÊNIO COM PONTE μ-OXO E SUA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIALÉRGICA		
2.1	SÍNTESE DOS COMPLEXOS $[Ru_2O(IBU)_2(PY)_6](PF_6)_2$ (1) E $[Ru_2O(CETO)_2(PY)_6](PF_6)_2$ (2)	91
2.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	92
2.3	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA	96
2.4	POTENCIAL ANTIALÉRGICO	98
2.5	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	101
CAPÍTULO 3		103
3 CARBOXILATOS MONONUCLEARES DE RUTÊNIO		
3.1	BREVE INTRODUÇÃO SOBRE FLUOROQUINOLONAS E COMPLEXOS METÁLICOS COMBINADOS A FÁRMACOS DESSA CLASSE	103
3.2	DOIS COMPOSTOS OBTIDOS PELA COMBINAÇÃO DE RUTÊNIO E A CIPROFLOXACINA	106
3.2.1	<i>Síntese e solubilidade dos compostos $(ciproH_2^+)_3[RuCl_6].3H_2O$ e $[Ru(cipro)_3].4H_2O$</i>	107
3.2.2	<i>Caracterização estrutural por meio de espectrometria de massas ESI - MS e medidas de TG - DTA</i>	109
3.2.3	<i>Caracterização espectroscópica e eletroquímica</i>	113
3.2.4	<i>Dependência do comportamento dos compostos com variação dos valores de pH</i>	116
3.2.5	<i>Avaliação da interação do composto 2 com o ctDNA</i>	117
3.2.6	<i>Considerações parciais</i>	119
3.3	UM COMPLEXO HOMOLÉPTICO DE RUTÊNIO COMBINADO À NORFLOXACINA E SUA INTERAÇÃO COM A ALBUMINA DO SORO HUMANO	120
3.3.1	<i>Considerações parciais</i>	128
CAPÍTULO 4		129
4 OUTROS TRABALHOS		
CAPÍTULO 5		133
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS: LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DA LINHA DE PESQUISA		
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos complexos abordados no Capítulo 1.....	viii
Figura 2. Representação esquemática dos conteúdos apresentados no Capítulo 2.	viii
Figura 3. Representação esquemática dos conteúdos apresentados no capítulo 3.....	ix
Figura 4. Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A e KP1019	xii
Figura 5. Reação de formação do cluster hipotético $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^+$ e estrutura trigonal resolvida do composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$ (qui =quinazolina).....	2
Figura 6. Representação esquemática das três classes de clusters trigonais de rutênio descritos neste capítulo.....	6
Figura 7. Estrutura proposta para os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$, nos quais L = (1) quinazolina (qui), (2) 5-nitroisoquinolina (5-nitroi), (3) 5-bromoisoquinolina (5-bri), (4) isoquinolina (iq), (5) 5-aminoisoquinolina (5-am) e (6) 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolina (thi) e legendas para o ^1H RMN	7
Figura 8. (A) Estrutura resolvida por difração de raio-X de monocristal do cátion $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$ (B) vista lateral; os átomos de hidrogênio foram omitidos para obter maior clareza.	9
Figura 9. Interações de natureza π que definem a estrutura eletrônica dos complexos simétricos com a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$	12
Figura 10. Diagrama simplificado de orbitais moleculares de simetria π da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$	13
Figura 11. Vista frontal e lateral da sobreposição das geometrias obtidas por DFT (azul) e por DRX (vermelho) para o complexo 1.	16
Figura 12. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_3]\text{PF}_6$ obtido a partir de solução 10 mM em acetonitrila deuterada, a 298K	17
Figura 13. Dependência dos valores de $\Delta\delta$ (ppm) dos hidrogênios dos ligantes 5-aminoisoquinolina (2), 5-bromoisoquinolina (3) e 5-nitroisoquinolina (5) com o pKa (A) e σ_p (parâmetro de Hammett) (B) e dependência dos valores de δ dos hidrogênios de todos os ligantes azanftaleno 1-6 com os valores de pKa (C).....	20
Figura 14. Gráficos de densidade de spin para os complexos 1-6 calculados por DFT (PBE0/def2-TZVP): (azul) densidade de spin positiva; (vermelho) densidade de spin negativa	22
Figura 15. Representação dos orbitais de fronteira obtidos a partir de cálculos de DFT (PBE0/def2-TZVP) para o complexo 1.	23
Figura 16. Gráficos para um dos orbitais ligantes Kohn-Sham (em simetria D_{3h} ideal) ($E''(\pi)$) obtidos com DFT utilizando PBE0 / def2-TZVP para os complexos (2), (3) e (5).	24
Figura 17. Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios da metila dos acetatos com o pKa dos ligantes azanftaleno para os complexos 1-6.....	25
Figura 18. Espectro vibracional do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6$, obtido a partir de pastilhas de KBr	26

Figura 19. Dependência da energia de estiramento de $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ no pKa de ligantes de azanaftaleno livres para os complexos 1-6.	27
Figura 20. Espectros de absorção dos complexos 1-6 registrados a partir de soluções de acetonitrila (complexos 1, 2, 4-6) ou diclorometano (complexo 3) 10 μM . Insert: dependência da energia de transição IC com o pKa dos ligantes livres.....	29
Figura 21. (Topo) Voltamograma cíclico do complexo 3, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_3]\text{PF}_6$, [complexo] = 1 mM, [TBABF ₄] = 0,1 M em benzonitrila. (fundo) Dependência dos valores $E_{1/2}$ com o pKa dos ligantes azanaftaleno livres	31
Figura 22. Espectroeletrólise do processo redutivo +1/0 para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_3]\text{PF}_6$ (0,1 M TBAPF ₆ , solução de acetonitrila).	34
Figura 23. Estrutura proposta para os complexos carbonilos trinucleares de rutênio estudados neste trabalho.....	37
Figura 24. Estruturas determinadas por difração de raio-X para os complexos (1, dmpz) (A), (7, dmap) (B) e (8, 4-ampy) (C). Os átomos de hidrogênio e as moléculas de solvatação foram omitidos para maior clareza	39
Figura 25. Cella unitária para o complexo 8 com o esquema de numeração dos átomos. $\text{N}(2)\cdots\text{O}(31)^* = 3.132(5)$ Å, $\text{N}(2)\cdots\text{H}(2\text{A}) \cdots\text{O}(31)^* = 124,8^\circ$; $\text{N}(2)\cdots\text{O}(1)^{**} = 3.255(5)$ Å, $\text{N}(2)\cdots\text{H}(2\text{B}) \cdots\text{O}(1)^{**} = 179,0^\circ$. Operadores de simetria: $*-x + 5/2, -y + 1, z + 1/2$; $** -x + 2, -y + 1, -z + 2$	40
Figura 26. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ obtido a partir de solução $1,0 \times 10^{-2}$ M em acetonitrila deuterada	41
Figura 27. Dependência dos valores de δ (ppm) do grupo CH_3 dos acetatos com o pKa dos ligantes N-heterocíclicos nos complexos 1-8.	44
Figura 28. Dependência da energia das bandas IC (topo) e de transferência de carga cluster-ligante TCCL com o pKa dos ligantes N-heterocíclicos para os complexos 1-8.	47
Figura 29. Espectro de infra-vermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2\text{CO}]$ obtido a partir de pastilha de KBr	49
Figura 30. Dependência dos valores dos estiramentos $\nu(\text{CO})$ and $\nu_{as}(\text{COO})$ com o pKa dos ligantes N-heterocíclicos nos complexos 1-8.	51
Figura 31. (topo) voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(4\text{-ampy})_2]$ (1 mM de complexo, 0,1 M de TBAPF ₆ em acetonitrila, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$); (abaixo) Dependência dos valores de $E_{1/2}$ com os valores de pKa dos ligantes L.	53
Figura 32. Espectros de absorção coletados a cada 5 minutos durante a fotólise do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{dmpz})_2]$ (L = dmpz, $\lambda_{\text{irrad}} = 377 \text{ nm}$) em soluções de acetonitrila (tempo total de irradiação = 80 minutos) (A); Dependência dos valores de rendimento quântico da liberação fotoinduzida de CO (Φ) com o pKa dos ligantes L (B).	55
Figura 33. Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e legenda para atribuição dos espectros de ^1H RMN.....	59
Figura 34. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$, registrado a partir de solução 10^{-3} M em acetonitrila.....	60

Figura 35. Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (5.5×10^{-5} M, pH = 7.4.) em tampão fosfato durante irradiação com comprimento de onda = 532 nm	66
Figura 36. Cronoamperograma correspondentes às fotólises do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ obtidos em solução de tampão fosfato (pH = 7,4)	67
Figura 37. Liberação de NO detectado por NOA a partir do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ em solução 5.89×10^{-5} M em tampão fosfato, pH = 7.4) (A) irradiada em 660 nm; (B) na ausência de luz após reação com solução 45 mM de ácido ascórbico.	68
Figura 38. (A) Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (4-pic = 4-metilpiridina) e seu espectro eletrônico em solução de acetonitrila	72
Figura 39. Efeito citotóxico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ em linhagem de melanoma murino(B16F10) irradiada em $\lambda = 532$ nm e não irradiada; incubação por um período de 3 h com várias concentrações do nitrosilo (resultados obtidos a partir do teste MTT, n = 3).....	74
Figura 40. (A) Liberação de óxido nítrico em tampão fosfato a partir do nitrosilo e adição de ácido ascórbico (medida feita no escuro); (B) Efeito citotóxico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{CH}_3\text{OH})]\text{PF}_6$ em células de melanoma murino B16F10, incubadas com soluções em várias concentrações do cluster por 3h	74
Figura 41. Estrutura dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$	75
Figura 42. Estrutura da HSA.....	76
Figura 43. Acompanhamento espectrofotométrico ($\lambda = 432$ nm) de uma solução em tampão fosfato do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (5.37×10^{-6} M) incubado com HSA (1×10^{-6} M) a 303K.	77
Figura 44. Espectros de fluorescência da HSA na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (A) com 5 minutos de incubação ([supressor] = 0; 2,57; 5,15; 7,70; 10,2; 12,8; 15,4; 17,9; 20,5; 23,1 $\times 10^{-6}$ M); (B) com 120 minutos de incubação ([supressor] = 0; 3,08; 6,16; 9,24; 12,3; 15,4; 18,5 $\times 10^{-6}$ M). Os experimentos foram realizados a 303 K, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, tampão fosfato.....	78
Figura 45. Gráficos de Stern–Volmer para (A) HSA– $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e (B) HSA– $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm.	79
Figura 46. Gráficos de Van't Hoff para os sistemas (A) HSA– $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e (B) HSA– $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$	82
Figura 47. Estrutura dos complexos avaliados para atividade tripanocida.....	85
Figura 48. Atividade tripanocida do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{thiq})_3]\text{PF}_6$ contra as formas tripomastigota e amastigota do T. Cruzi, cepa CL Brener.	87
Figura 49. Representação esquemática do complexo de ferro que compõe o sítio ativo da hemeritina (acima) e complexos modelo (abaixo)	88
Figura 50. Estrutura dos complexos binucleares de fórmula geral $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{carb})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$, no quais carb = ibuprofenato ou cetoprofenato	89

Figura 51. Representação esquemática da via clássica de desgranulação de mastócitos estimulada por alérgeno	90
Figura 52. Espectros ESI MS dos complexos (A) $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ e (B) $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ registrados a partir de soluções metanólicas. Acima é mostrada o perfil de distribuição isotópica teórico.....	93
Figura 53. Padrão de dissociação em fase gasosa do composto $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$...	94
Figura 54. Padrão de dissociação em fase gasosa do composto $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$.	95
Figura 55. Espectros eletrônicos dos complexos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ obtidos a partir de soluções em acetonitrila, $2 \times 10^{-5}\text{M}$	97
Figura 56. Diagrama de orbitais moleculares π para uma unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$	97
Figura 57. Ensaio de inibição da desgranulação de mastócitos RBL estimulados por antígeno, avaliada pela dosagem da β -hexosaminidase liberada na presença de (A) $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (2) e cetoprofeno e (B) $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (1) e ibuprofeno. Em ambos os casos o fumarato de cetotifeno foi utilizado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SD de três ensaios independentes.	99
Figura 58. Ensaios de viabilidade celular dos mastócitos RBL e de inibição da atividade da β -hexosaminidase na presença do complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ ANOVA seguida do teste de Dunnett's indicam significância estatística de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, em comparação com ensaio controle (células não tratadas com complexo).....	101
Figura 59. Relação estrutura – atividade da quinolonas	104
Figura 60. Estruturas da norfloxacin e da ciprofloxacina	105
Figura 61. Estrutura proposta para os complexos $(\text{ciproH}_2^+)_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$ (1) e (B) $[\text{Ru}(\text{cipro})_3].4\text{H}_2\text{O}$ (2).....	107
Figura 62. Expansão dos picos observados no espectro ESI MS/MS do composto $(\text{ciproH}^+)_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$ (1), obtido a partir de solução metanólica (fragmentação do íon m/z 994.6); ênfase na concordância da distribuição isotópica teórica e observada experimentalmente	110
Figura 63. Expansão dos picos observados no espectro ESI MS do composto $[\text{Ru}(\text{cipro})_3].4\text{H}_2\text{O}$ (2), obtido a partir de solução metanólica, com ênfase na distribuição isotópica do rutênio. (a) $[2.\text{H}^+ - 4\text{H}_2\text{O}]^+$ e (b) $[2.2\text{H}^+ - 4\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	110
Figura 64. Curvas TG e DTA obtidas para os compostos (a) $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_3]_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$ (b) $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3)_3].4\text{H}_2\text{O}$ e (c) ciprofloxacina, sob atmosfera de $\text{N}_{2(g)}$, rampa de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$	111
Figura 65. Voltamogramas cíclicos dos complexos (a) $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_3]_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$ e (b) $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3)_3].4\text{H}_2\text{O}$, em solução $1 \times 10^{-3}\text{M}$ em $0,1\text{M}$ TBAPF ₆ , DMSO.....	115
Figura 66. Espectros eletrônicos do composto (a) $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_3]_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$ e (b) $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3)_3].4\text{H}_2\text{O}$ em solução $5,0 \times 10^{-6}\text{M}$ de HCl, pH 1,5; tampão PBS, pH 7,4 e solução de NaOH, pH 8,0.....	116
Figura 67. Variação de pH com o tempo observada para os complexos $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3)_3].4\text{H}_2\text{O}$ ($8.0 \times 10^{-6}\text{M}$) e $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_3]_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$ ($2.5 \times 10^{-4}\text{M}$) em solução de HCl, pH = 1,5; 37°C	117

Figura 68. Variação dos espectros UV-vis de (A) $[\text{Ru}(\text{cipro})_3].4\text{H}_2\text{O}$ ($2,29 \times 10^{-5}$ M) com a adição de quantidades crescentes de ctDNA (de $4,9 \times 10^{-5}$ a $4,9 \times 10^{-4}$ M) em tampão fosfato (0,15 M cloreto de sódio e 0,015 M citrato de sódio, pH 7,0). (B) variação de absorbância em 353 nm com adição de ctDNA (C) e duplo recíproco do gráfico de Benesi-Hildebrand	118
Figura 69. Estrutura proposta para o complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$	120
Figura 70. Íon molecular observado para o composto $[\text{Ru}(\text{nor})_3].\text{H}^+$ no espectro ESI MS registrado a partir de mistura 1 H_2O : 1 CH_3CN , superposto com a distribuição isotópica calculada.....	121
Figura 71. Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ obtido a partir de pastilhas de KBr.....	122
Figura 72. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$, em água ($7,5 \times 10^{-6}$ M).	123
Figura 73. (A) Espectros de fluorescência da HSA na presença de concentrações crescentes de $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$, obtidos após períodos de 5 minutos de incubação. (B) Gráficos de Stern–Volmer para o sistema HSA– $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ em diferentes temperaturas, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm	124
Figura 74. Variação nos valores de tempo de vida de fluorescência da HSA com adição de quantidades crescentes de $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ a 310K, em tampão fosfato	127

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos sobre carboxilatos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo encontrados na literatura até maio de 2017 envolvendo algum aspecto biológico	4
Tabela 2. Valores selecionados de comprimentos de ligação e ângulos do cátion $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$	10
Tabela 3. Valores de distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para as geometrias de equilíbrio dos complexos 1-6, obtidos com DFT usando PBE0/def2-TZVP. Os átomos foram numerados de acordo com a estrutura de raios-X. Os números entre parênteses são desvios padrão dos valores médios.	16
Tabela 4. Deslocamentos químicos de ^1H RMN observados para os complexos 1-6. Os dados foram obtidos a partir de soluções 10 mM em CD_3CN a 298 K.....	18
Tabela 5. Dados obtidos a partir dos espectros eletrônicos de absorção na região do UV-visível e dos voltamogramas cíclicos (solução de benzonitrila, 0,1 M TBABF ₄) para os complexos 1-6 (1 mM).....	29
Tabela 6. Alguns valores de distâncias de ligação e ângulos observados para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmpz})_2(\text{CO})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1. H_2O), $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{dmap})_2(\text{CO})]\cdot\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ (7. $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$) e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-ampy})_2(\text{CO})]$ (8).....	40
Tabela 7. Valores de deslocamento químico $\delta(\text{ppm})$ e de integração dos sinais de ^1H observados nos espectros de RMN dos complexos 1-8, registrados em soluções de CD_3CN a 298 K	42
Tabela 8. Dados espectroscópicos coletados para os complexos de 1-8.....	46
Tabela 9. Valores de $E_{1/2}$ observados para os processos redox dos complexos 1-8	54
Tabela 10. Dados de espectroscopia eletrônica (solução de acetonitrila) e de voltametria cíclica (1 mM em acetonitrila 0,1 M TBAPF ₆) obtidos a partir de soluções em acetonitrila para os complexos 1 - 4.....	59
Tabela 11. Valores de $\nu(\text{NO})$ para complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$ e valores de pKa dos ligantes L.....	63
Tabela 12. Dados obtidos a partir de espectros de ^1H RMN para os compostos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{L}]\text{PF}_6$ (L = NO e H_2O , 1 e 2 respectivamente), coletados em soluções aproximadamente 10^{-2} M em acetonitrila deuterada.....	64
Tabela 13. Valores de rendimento quântico e quantidade de $\text{NO}_{(\text{g})}$ liberado (M) a partir do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{NO}]$ em solução tampão fosfato (pH = 7,4) em diferentes comprimentos de onda de irradiação.....	68
Tabela 14. Constantes de Stern-Volmer obtidas para os sistemas HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$	79
Tabela 15. Valores de constante de ligação (K_b) e estequiometria da interação para os sistemas HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas	80
Tabela 16. Parâmetros termodinâmicos para os sistemas HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$	82

Tabela 17. Atividade tripanocida (IC_{50}), citotoxicidade (DL_{50}) e índice de seletividade (IS) dos ligantes azanaftalenos e dos complexos trinucleares de rutênio	85
Tabela 18. Fragmentos observados em fase gasosa para os complexos (1) e (2) nos espectros ESI MS/MS.....	93
Tabela 19. Atribuição tentativa dos principais picos observados nos espectros de infravermelho dos compostos $[Ru(cipro)_3].4H_2O$; ciprofloxacina livre (na forma de cloridrato) e $[cipro]_3[RuCl_6].3H_2O$, obtidos a partir de pastilhas de KBr	114
Tabela 20. Constantes de Stern-Volmer para o sistema HSA- $[Ru(nor)_3]$ em diferentes temperaturas.....	124
Tabela 21. Constantes de ligação K_b e estequiometria da interação do sistema HSA- $[Ru(nor)_3]$ em diferentes temperaturas	125
Tabela 22. Parâmetros termodinâmicos para o sistema HSA- $[Ru(nor)_3]$	126
Tabela 23. Trabalhos publicados após minha contratação na Universidade de São Paulo que não serão explorados nos demais capítulos deste texto	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AN – acetonitrila

BSA – do inglês “bovine serum albumin”

BZN – benzonidazol

Carb - carboxilato

Ceto - cetoprofenato

Cipro - ciprofloxacinato

COSY – do inglês “correlation spectroscopy”, referente a espectros de ressonância magnética nuclear de correlação ^1H - ^1H

CYP450 – conjunto de enzimas do citocromo-P450

DFT – do inglês Density Functional Theory

DL₅₀ – dose letal. Concentração de um composto químico necessária para diminuir em 50% a viabilidade de um determinado tipo de célula ou organismo, normalmente saudável.

DMSO - dimetilsulfóxido

ct-DNA – do inglês “calf-thymos desoxiribonucleic acid”; DNA de timo de bezerro

DNA – do inglês “desoxiribonucleic acid”

DNP-BSA – do inglês “dinitrophenyl-bovine serum albumin”

DRX – difração de raio-X de monocristal

EPH – eletrodo padrão de hidrogênio

EPR – do inglês “electron paramagnetic spectroscopy, referente à espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

ESI-MS – do inglês “electron spray ionization mass spectrometry”

ESI-Q-TOF MS - do inglês “electron spray ionization – quadrupolo – time of light -mass spectrometry”

FAINES – anti-inflamatórios não esteroidais

FcεRI – receptores de IgE na superfície de mastócitos

HSA – do inglês “human serum albumin”

HSTf – do inglês “huma serum tranferrin”

Ibu - ibuprofenato

IC – transição intra-cluster

IC₅₀ – do inglês “inhibitory concentration” ou concentração inibitória. Refere-se à concentração mínima de uma determinada molécula necessária para diminuir em 50% uma determinada população (que pode ser de parasitas, células doentes, bactérias, etc)

IgE – um tipo de imunoglobulina

IL – transição intra-ligante ou transição π - π^*

IS – índice de seletividade. É a relação entre as grandezas DL_{50} e IC_{50} .

IV – região do infra-vermelho do espectro eletromagnético

MUG - 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamida

NOA – do inglês “nitric oxide analyser”

Nor - norfloxacinato

OM – orbitais moleculares

RBL - células de leucemia basofílica de rato (DNP-BSA),

RMN – ressonância magnética nuclear

sh - ombro, do inglês “shoulder”

TBABF₄ – tetrafluoroborato de tetrabutilamônio

TBAPF₆ – hexafluorofosfato de tetrabutilamônio

TCCL – transição de transferência de carga cluster - ligante

TG – análise termogravimétrica

UV – região do ultra-violeta do espectro eletromagnético

δ_{ip} – dobra no plano

δ_{oop} – dobra fora do plano

ε – coeficiente de absortividade molar

λ_{max} - comprimento de onda de absorção máxima

ν - estiramento

η - rendimento

RESUMO

Este texto tem por finalidade apresentar de forma resumida e crítica a obra acadêmica da Prof.^a Sofia Nikolaou, candidata ao título de Livre Docente pela Universidade de São Paulo. Para tanto, algumas de suas publicações serão apresentadas não em ordem cronológica, mas segundo um agrupamento referente a diferentes frentes de trabalho dentro de dois grandes temas: a química de coordenação de carboxilatos de rutênio e a investigação de propriedades de interesse biológico. Este último tema abrange estudos de interação dos complexos com moléculas de relevância biológica como albumina do soro humano (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA) e potenciais atividades biológicas como citotoxicidade frente a algumas linhagens de células cancerígenas, atividade antialérgica e atividade tripanocida. Serão apresentados, predominantemente, dados relativos a: (a) complexos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$ nos quais L = série de ligantes azanaftalenos como a 5-bromoisoquinolina, 5-nitroisolquinolina, 5-aminoisoquinolina, isoquinolina e quinazolina ou $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{L}')^n]$ nos quais L = série de ligantes piridínicos como a pirazina, piridina, 2,6-dimetilpiridina, 4-tercbutilpiridina, 4-acetilpiridina (4-acpy), 4-metilpiridina, 3-metilpiridina, etc; L' = moléculas funcionais como CO e NO e n = 0 ou +1; (b) complexos binucleares de rutênio com ponte μ -oxo de fórmula geral $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{carb})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$, nos quais carb = ibuprofenato ou cetoprofenato e py = piridina; (c) complexos mononucleares homolépticos de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{carb})_3]$, nos quais carb = norfloxacinato ou ciprofloxacinato. Por fim, serão apenas comentados outros trabalhos publicados pela docente que, embora foquem a química de coordenação do rutênio, não tratam necessariamente de carboxilatos ou de aspectos biológicos.

Palavras chave: rutênio; carboxilatos; atividade biológica.

ABSTRACT

This text aims to present a critical analysis of the academic work of Prof. Sofia Nikolaou during her years of teaching and researching at University of São Paulo. Therefore, her academic publications will be discussed not in chronological order, but according to a grouping related to different working fronts within two major themes: the coordination chemistry of ruthenium carboxylates and the investigation of properties of biological interest. The latter theme covers studies of the interaction of complexes with molecules of biological relevance such as human serum albumin (HSA) and deoxyribonucleic acid (DNA) and potential biological activities such as cytotoxicity against some cancer cell lines, antiallergic activity and trypanocidal activity. Data will be predominantly presented on: (a) oxo-bridge trinuclear ruthenium complexes of general formula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$ in which L = a series of azanaphthalene ligands such as 5-bromoisquinoline, 5-nitroisquinoline, 5-aminoisquinoline, isoquinoline and quinazoline; or $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{L}')]\text{PF}_6$ where L = a series of pyridinic ligands such as pyrazine, pyridine, 2,6-dimethylpyridine, 4-tercbutylpyridine, 4-acetylpyridine, 4-methylpyridine, 3-methylpyridine, etc; L' = functional molecules such as CO and NO and n = 0 or +1; (b) oxo-bridged binuclear ruthenium complexes of the general formula $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{carb})_2(\text{py})](\text{PF}_6)_2$, in which carb = ibuprofenate or ketoprofenate and py = pyridine; (c) ruthenium homoleptic mononuclear complexes of the general formula $[\text{Ru}(\text{carb})_3]$, in which carb = norfloxacinates or ciprofloxacinates. Finally, other published works will be commented. These works, although focusing on the ruthenium coordination chemistry, do not necessarily deal with carboxylates or biological aspects.

Keywords: ruthenium; carboxylates; biological activity.

APRESENTAÇÃO DO TEXTO

Este texto tem por finalidade apresentar de maneira resumida e crítica o trabalho de pesquisa realizado por mim durante cerca de 12 anos, dada minha contratação como docente na Universidade de São Paulo em março de 2005. Ao longo deste período de tempo, atuei durante nove anos e meio como docente no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e, desde agosto de 2014, atuo como docente no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

O fio condutor de minha pesquisa sempre foi a investigação da química de complexos de rutênio. Portanto, meu trabalho se insere na área de Química de Coordenação. Mais especificamente focando a química de coordenação de complexos em solução, com o objetivo explícito de contribuir para a manutenção de uma linha de pesquisa focada em uma área clássica da Química Inorgânica. Nesse contexto, o compromisso de meus trabalhos tem sido o de gerar conhecimento básico. Básico não no sentido de “simples” ou “superficial”. Mas sim no sentido de investigar propriedades físico-químicas elementares, de modo a construir um arcabouço de informações relevantes sobre o comportamento dos complexos em estudo e, eventualmente, instrumentalizar outros a aplicar esse conhecimento no desenvolvimento de produtos e processos. Desse modo deixo claro que o grupo liderado por mim não aspira desenvolver pesquisa aplicada, mas sim gerar conhecimento aplicável.

O segundo objetivo de minha pesquisa se relaciona, naturalmente, com o compromisso de formação dos alunos. E aqui reitero a intenção de manter um grupo e uma linha formativa focada na área de química de coordenação.

Posto isto, também é necessário contextualizar brevemente o trabalho em termos temporais e circunstanciais. Minha linha de pesquisa focada na química de rutênio tem origem em meu doutorado. Naquela época (fim dos anos 1990 e início dos anos 2000), havia ocorrido o “boom” da Química Supramolecular devido ao Prêmio Nobel de Jean Marie Lehn em 1987 e a publicação da primeira edição de sua obra “Supramolecular Chemistry”, em 1995. Influenciada por este fato, pelo ambiente do laboratório em que desenvolvi minha Iniciação Científica, pelo meu orientador (Henrique Eisi Toma) e pelo belíssimo trabalho de Vincenzo Balzani, tive toda minha formação em Química de Coordenação no contexto da Química Supramolecular de complexos de rutênio.

Com o avançar do tempo, essa vertente tendeu paulatinamente ao desenvolvimento de sistemas voltados à nanotecnologia. No entanto, fui contratada em um departamento que, embora de Física e Química, se encontra em uma Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no qual não havia muito espaço para o desenvolvimento de sistemas nanométricos baseados exclusivamente em compostos inorgânicos visando aplicações tecnológicas. Além disso, fui alocada em um laboratório de pesquisa no qual já se investigava a química de complexos de rutênio, contudo direcionado ao desenvolvimento de metalo-fármacos. Essa circunstância foi então determinante para que eu redirecionasse minha linha de pesquisa de modo a contemplar minha formação (química de coordenação de compostos de rutênio) e de me alinhar com a estrutura disponível e o ambiente da unidade na qual iria atuar.

O trabalho desenvolvido após minha contratação na Universidade de São Paulo versa sobre a química de coordenação de carboxilatos de rutênio e a investigação de propriedades de interesse biológico. Este último tema abrange estudos de interação dos complexos com moléculas de relevância biológica como albumina do soro humano (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA) e potenciais atividades biológicas como citotoxicidade frente a algumas linhagens de células cancerígenas, atividade antialérgica e atividade tripanocida.

Este texto se organiza em capítulos que abrangem alguns dos trabalhos publicados ao longo de meus anos de docência, em diferentes níveis de detalhamento. Cada capítulo remete a um certo número de artigos cujos arquivos dos textos integrais estão sendo entregues juntamente a este volume. Cada capítulo contém uma pequena introdução que não tem a pretensão de apresentar uma revisão bibliográfica completa e exaustiva. Tem apenas a função de contextualizar brevemente os conteúdos que serão discutidos. Também não será apresentado, em nenhum caso, o detalhamento dos procedimentos experimentais (salvo informações rigorosamente importantes para o aspecto discutido). Essas condições podem ser consultadas nos textos originais de cada artigo. Ainda sobre a forma, fiz uma opção deliberada por manter alguns termos abreviados segundo o correspondente em inglês. Por exemplo, ácido desoxirribonucleico será abreviado aqui como DNA e não ADN. Essa escolha tem por objetivo facilitar a identificação de alguns termos abreviados segundo a abreviatura mais coloquialmente utilizada. Espero atingir este objetivo (todas as abreviaturas podem ser consultadas na lista da página *i*).

Na sequência deste item, apresento um preâmbulo sobre a investigação da potencialidade de desenvolver metalo-fármacos a partir de complexos de rutênio. O

capítulo 1 trata dos complexos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$ nos quais L = série de ligantes azanaftalenos como a 5-bromoisoquinolina, 5-nitroisolquinolina, 5-aminoisoquinolina, isoquinolina e quinazolina ou $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{L}')^n]$ nos quais L = série de ligantes piridínicos como a pirazina, 4-cianopiridina, 2,6-dimetilpiridina, 4-tercbutilpiridina, 4-acetilpiridina (4-acpy), 4-metilpiridina, 3-metilpiridina, etc; L' = moléculas funcionais como CO e NO e n = 0 ou +1. Este capítulo constitui, sem sombra de dúvida, o coração deste volume. Seja por que estes sistemas são em si mais promissores ou por que neles tenho mais experiência, a pesquisa sobre tais complexos é a que mais avançou, gerando os resultados mais densos e mais consistentes. Este capítulo trata, portanto, da síntese e caracterização de uma extensa série de complexos, subdividida em três grupos: simétricos, carbonilos e nitrosilos. As principais técnicas empregadas na caracterização têm sido difratometria de raio -X de monocristal (em alguns casos), espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear em solução, espectroscopia de absorção e emissão na região do UV-visível, espectroscopia na região do infra-vermelho e voltametria cíclica. Serão discutidos em maior profundidade os comportamentos dos complexos em termos de seus grupos, em função de resultados obtidos a partir de correlação sistemática do comportamento espectroscópico e eletroquímico dos mesmos com propriedades dos ligantes e da estrutura do centro metálico. Serão apresentados também alguns resultados de atividade biológica, tais como ensaios *in vitro* de atividade tripanocida e atividade anti-câncer.

O capítulo 2 trata dos resultados obtidos para dois compostos binucleares de rutênio com ponte μ -oxo, de fórmula geral $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{carb})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$, nos quais carb = ibuprofenato ou cetoprofenato e py = piridina. Neste caso, além da caracterização química dos complexos, será apresentado um resultado inusitado e bastante interessante de atividade antialérgica para o composto de cetoprofeno.

O capítulo 3 discutirá resultados obtidos para dois carboxilatos mononucleares homolépticos de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{carb})_3]$, nos quais carb = norfloxacinato ou ciprofloxacinato, suas caracterizações e suas interações com a HSA e com ct-DNA ("calf-thymus" DNA).

As figuras das páginas *viii* e *ix* trazem de maneira esquemática um resumo do conteúdo apresentado nestes três capítulos, que são os mais importantes deste volume. O capítulo 4 traz apenas comentários gerais sobre outros trabalhos publicados no período, mas que não tratam de carboxilatos de rutênio ou não tratam de análises de interesse

biológico. Por fim o capítulo 5 apresenta meus comentários finais, levando-se em consideração as limitações e as perspectivas futuras de minha linha de pesquisa.

Figura 1. Representação esquemática dos complexos abordados no Capítulo 1

Fonte: a autora

Figura 2. Representação esquemática dos conteúdos apresentados no Capítulo 2.

Interação com biomoléculas alvo:

- interação com HSA (Stern-volmer)
- interação com CYP450 enzymes (*in vitro* metabolism)
- interação com ct-DNA (Benesi-Hildebrand)
- atividade anti-alérgica (desgranulação de mastócitos)

Fonte: a autora

Figura 3. Representação esquemática dos conteúdos apresentados no capítulo 3**Complexos de rutênio mononucleares combinados com antibióticos da família das fluoroquinolonas** **Caracterização**

- UV-Vis e luminescência
- IR
- NMR
- ESI MS
- TG
- Voltametria cíclica e de pulso diferencial

Interação com biomoléculas alvo:

- interação com HSA (Stern-volmer)
- interação com *ct*-DNA (Benesi-Hildebrand)

Fonte: a autora

Preâmbulo – metalo-fármacos baseados em complexos de rutênio

Há muito tempo é conhecido o importante papel dos metais em estruturas e processos biológicos, principalmente em proteínas (enzimas), que desempenham funções tão variadas quanto o transporte de oxigênio no sangue, feito pelo centro ferro-heme da hemoglobina, transferências multieletrônicas na respiração e fotoinduzidas na fotossíntese. Os metais ocorrem também na composição de nutrientes essenciais como as vitaminas; para citar apenas um exemplo, a vitamina B12 contém um íon de Co em sua estrutura.¹ Apesar desse fato, existe uma visão disseminada de que os metais (em especial os chamados “metais pesados”, categoria na qual se enquadram os metais de transição) são tóxicos. E de fato o são em determinadas circunstâncias. Porém, relatos de cerca de 5000 anos atrás remetem ao uso medicinal dos metais.² Portanto, existe um grande apelo para o uso de metais na formulação de medicamentos em função do grande potencial dos cátions metálicos, como espécies deficientes em elétrons, interagirem com biomoléculas como proteínas, enzimas e o próprio DNA e desse modo interferirem em processos metabólicos das mais diversas naturezas.^{2,3}

No caso particular do rutênio, existe uma série de abordagens que vão desde estudos sobre sua ação fungicida, passando por sua atividade anti-inflamatória, antibiótica,

anticarcinogênica, até seu uso indireto como fotosensibilizador em terapia fotodinâmica, seja a partir de complexos com ligantes polipiridínicos hidrofóbicos (bons intercaladores em DNA) ou a partir de complexos liberadores de NO.^{4, 5} Obviamente, existe uma relação direta entre estrutura e função dos complexos, e uma estratégia possível utilizada no “design” dos candidatos a fármacos consiste na coordenação de biomoléculas, como as da família das catecolaminas (dopamina, por exemplo), a um centro metálico.⁶

De importância histórica, podemos citar o metalo-fármaco chamado “vermelho de rutênio”. Este fármaco consiste no complexo polinuclear de valência mista $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$. Sua afinidade por polissacarídeos (componentes presentes em biomembranas) permite sua utilização em exames cintilográficos e, portanto, a visualização de tumores. Além disso, por se ligar preferencialmente a uma série de proteínas carregadoras de cálcio, interfere em processos metabólicos mediados por este íon. Um dos exemplos mais conhecidos trata da interferência no processo de entrada de Ca^{2+} na mitocôndria. No entanto, sabe-se que o agente ativo no processo é uma impureza do vermelho de rutênio comercial, o chamado Ru360, $[\text{X}(\text{NH}_3)_4\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{X}]^{3+}$, $\text{X} = \text{Cl}^-$ ou OH^- .⁴

Complexos de rutênio têm sido utilizados também como sensibilizadores em terapia fotodinâmica (TFD), que envolve o uso de luz para matar células tumorais.⁷ De modo geral, para ser útil em TFD um composto deve conter sítios de interação hidrofóbica para que possa ser incorporado a biomembranas⁸ e ao DNA;⁹ deve apresentar um estado fundamental estável em meio fisiológico e deve, idealmente, absorver entre cerca de 600 nm a 800 nm (a chamada janela terapêutica), radiação com boa penetração em organismos vivos.¹⁰

A morte celular pode ser induzida por alguns mecanismos em TFD; no primeiro deles deve ocorrer absorção de luz pelo fotosensibilizador que, por decaimento não-radiativo, gera calor e promove a ruptura de membranas celulares. Ou ainda, por reações de transferência de elétrons fotoinduzida direta entre a droga e o DNA, comprometendo o funcionamento celular. E finalmente, o complexo age de maneira indireta, sensibilizando a geração das chamadas *espécies reativas de oxigênio* ou *espécies reativas de óxido nítrico*, que são as espécies ativas causadoras de danos ao DNA. Neste caso, os complexos de rutênio polipiridina $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$ (L geralmente é um ligante polipiridínico bidentado e hidrofóbico), são bastante empregados pois apresentam bandas de absorção na região do visível que geram, por cruzamento intersistemas, um estado excitado de transferência de carga triplete (³MLCT), com tempo de vida relativamente longo. Este, por sua vez, é capaz

de gerar $^1\text{O}_2$ por uma reação de transferência de energia fotoinduzida e induzir a morte celular.

No entanto, o evento que realmente despertou o interesse no desenvolvimento de fármacos a partir de compostos metálicos foi a descoberta, feita por Rosenberg em 1965,¹¹ da atividade antitumoral da chamada “cis-platina” (*cis*-diaminodicloro- Pt^{II}). Sua atividade anticarcinogênica é bem estabelecida para câncer de testículo, ovário, cabeça, pulmão, estômago e esôfago e sua citotoxicidade é função da sua capacidade de ligar-se ao DNA. O complexo passa por reações de aquação das duas posições originalmente ocupadas pelos ligantes cloro e, posteriormente, liga-se covalentemente a uma fita do DNA. Uma vez ligada, a cisplatina causa uma distorção na estrutura de hélice dupla da molécula de DNA, comprometendo sua transcrição e replicação, interferindo portanto no desenvolvimento das células tumorais.^{3a, b, 12} Porém a cisplatina, bem como outras duas drogas análogas em uso clínico (carboplatina e oxaliplatina) apresentam alta toxicidade sistêmica, levando a tratamentos extremamente debilitantes devido a efeitos colaterais indesejados (toxicidade renal, náuseas severas, diminuição da produção de medula óssea, entre outros), além de serem inativas (por resistência intrínseca ou adquirida) contra vários tipos de células tumorais e, principalmente, não apresentam efeito em fase metastática.¹³

Em função de limitações como as exemplificadas acima, há uma busca acentuada por alternativas de fármacos baseados em complexos de coordenação ou organometálicos, com algum interesse naqueles que combinam um centro metálico com fármacos orgânicos com atividade farmacológica já explorada. A importância desta estratégia foi reconhecida a muito tempo na literatura, pois ela tem proporcionado melhoras no que diz respeito aos efeitos colaterais e à resistência associada a certas drogas com arcabouço exclusivamente orgânico.^{13, 14}

Em se tratando de rutênio, os análogos à cis-platina seriam os complexos denominados NAMI-A e KP1019 (Figura 4) e seus congêneros. Os primeiros artigos sobre a atividade anticâncer desses complexos datam da década de noventa do século passado, significando que pesquisas com esse foco começaram alguns anos antes. Ou seja: a investigação da aplicação de complexos de rutênio como quimioterápicos para câncer tem aproximadamente 35 anos de ocorrência sistemática e pode ser considerada, portanto, como nova. Os próximos três parágrafos mostram alguns aspectos relacionados a este tema predominantemente baseados em dois trabalhos de revisão do início dos anos 2000ⁱ que,

ⁱ Deve-se considerar também as referências citadas nesses dois trabalhos de revisão.

portanto, refletem a mentalidade vigente nos anos 90 do século passado. Este trecho foi feito desta forma a fim de, em um segundo momento, permitir ressaltar as virtudes e problemas que a literatura vem carregando quando o assunto é metalo-fármacos de rutênio.

Figura 4. Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A e KP1019

Fonte: adaptado da referência 15.

Admitia-se que complexos cujo centro metálico é o rutênio possuíam boa aplicação clínica, principalmente por ser baixa a toxicidade do metal.¹⁶ Isto se deveria, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste íon metálico com as do íon ferro. O organismo conseguiria proteger-se dos efeitos causados pelo excesso de ferro através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina.¹⁷ Acreditava-se que o mecanismo de defesa contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo.¹⁶ Essa “crença” se estabeleceu após a publicação de estudos da interação da HSTf (transferrina sérica humana) com cloreto de rutênio marcado (¹⁰³RuCl₃).¹⁸ Acreditava-se também que a existência ou não de toxicidadeⁱⁱ associada ao metal poderia estar relacionada aos seus estados de oxidação acessíveis em meio fisiológico (II, III e IV). Esses estados seriam acessíveis possivelmente em decorrência da ação de agentes redutores como o ácido ascórbico ou de enzimas como a citocromo oxidase.¹⁶

Além da semelhança com o ferro, a presumida baixa toxicidade em função de resultados de citotoxicidade *in vitro* e da possível ocorrência de uma química redox relevante *in vivo*,¹⁹ a busca por complexos ativos de rutênio considerava que sua atividade deveria estar relacionada com os mecanismos de atuação da cis-platina. Portanto, aspectos

ⁱⁱ De maneira bem geral, o termo citotoxicidade refere-se à toxicidade observada *in vitro* para uma cultura específica de células ou microorganismo. Toxicidade refere-se ao quão tóxico um composto é a um organismo complexo *in vivo*.

da cinética de aquação de complexos de rutênio em meio aquoso e pH fisiológico sempre foram pontos críticos no planejamento de candidatos a metalo-fármacos baseados em rutênio.²⁰

Com estas premissas em mente, iniciou-se a investigação das propriedades biológicas dos complexos NAMI-A, KP1019 e seus análogos. Ambos apresentam atividade em relação a tumores em fase de metástase, sendo baixa sua toxicidade sistêmica em doses farmacologicamente ativas.^{13, 21}

A partir deste ponto e, apesar da vasta literatura disponível sobre o tema na forma dos artigos originais e de uma série de trabalhos de revisão mais recentes,²² minha análise está relacionada ao conteúdo do artigo de revisão da referência 20 e, especificamente, a um trabalho de 2017 de Enzo Alessio.²³ A escolha se baseia não só no fato de haver um alinhamento de ideias, mas também no fato deste pesquisador estar envolvido no desenvolvimento da química e investigação das propriedades biológicas do NAMI-A desde o início, sendo um dos patrocinadores dos testes clínicos do mesmo. É útil informar que a única coisa em comum entre este complexo e os compostos investigados em meu grupo de pesquisa é o estado de oxidação do íon rutênio, ou seja, Ru(III). No entanto, tratar dos complexos NAMI-A e KP1019 é inescapável a qualquer tentativa de falar sobre metalo-fármacos baseados em rutênio, uma vez que estes compostos são os únicos dois que chegaram à fase de testes clínicos (Fase I para o KP1019 e Fases I e II para o NAMI-A). Sendo assim, a referência 23, bem como as referências nela citadas, servem como base para o resto deste texto introdutório.

É uma máxima da química que elementos pertencentes a um mesmo grupo (ou família, para os mais velhos) na Tabela Periódica têm propriedades afins. Com base nessa “verdade”, generalizou-se a hipótese de que, sendo o ferro um metal essencial e sendo o rutênio um metal do mesmo grupo, então a aparente baixa toxicidade de compostos de rutênio derivaria do fato de que o rutênio usaria o mesmo “maquinário biológico” que o ferro e seria, em última análise, metabolizado e excretado pelas mesmas vias. É curioso como uma afirmação dessa ordem é sistematicamente repetida pelos mais diversos autores (incluindo-me nesse grupo). É explicação recorrente nas salas de aula de ensino médio e superior que, de modo geral, os metais “pesados” *são tóxicos* justamente por substituírem metais essenciais em seus sítios biológicos (geralmente metalo-proteínas).

O ferro, sendo um metal do primeiro período de transição, apresenta o fenômeno chamado nos livros texto de “equilíbrio de spin”. Sendo assim, a distribuição eletrônica dos íons Fe(II) e Fe(III) é altamente dependente dos ligantes presentes em sua esfera de

coordenação e daí decorre o fato de que seu raio é variável, não apenas em função da variação de ρ / carga nuclear efetiva, mas também em função dos efeitos eletrônicos de estabilização relativa das distribuições de spin alto e spin baixo. Já o rutênio predomina na condição de distribuição eletrônica de spin baixo tendo, portanto, um valor praticamente fixo de raio para cada estado de oxidação. O fato de ser maior o torna um ácido mais mole do que o ferro, o que tem implicações importantes na sua reatividade.

Além disso propagou-se a ideia de que a acessibilidade a vários estados de oxidação é uma propriedade importante e necessária para a atividade biológica do rutênio. Bem, em virtualmente todos os casos estudados, valores de potencial para os processos redox Ru(IV) / Ru(III) / Ru(II) foram determinados mediante reações de eletrodo, em soluções orgânicas ou aquosas de pH fisiológico, na ausência ou não de moléculas de interesse biológico como a albumina. Ou ainda são verificadas as reações em solução de complexos com agentes redutores como o ácido ascórbico e a glutatona, ou oxidantes como o peróxido de hidrogênio. Infelizmente, por mais que seja conveniente, assumir que as propriedades redox observadas dessa forma possam ter paralelo com a química redox que eventualmente venha a ocorrer *in vivo* é, no mínimo, temerário. A única situação na qual valores de potenciais redox observados em tais condições podem manter um alinhamento com a química redox *in vivo* seria para casos onde os complexos sejam inertes.ⁱⁱⁱ

Uma dificuldade intrínseca de se correlacionar resultados químicos e *in vitro* com o que esperar *in vivo* para complexos como o NAMI-A deriva do fato de que *in vivo* ainda não se tem conhecimento, nem tampouco controle, das estruturas que efetivamente estão presentes. Não se sabe quais os potenciais redox das espécies efetivamente ativas. Isso ocorre em função de dois fatores: a labilidade dos complexos de rutênio (naturalmente relacionada à sua esfera de coordenação) e sua tendência de se ligar a proteínas séricas. Alguns poucos estudos de raio-X já mostraram que alguns exemplos inertes em solução perdem seus ligantes e interagem com a albumina como íons nus, coordenando-se preferencialmente a resíduos de histidina, no caso do rutênio(III). Portanto, as propriedades de inércia / labilidade dos compostos de rutênio observadas em solução aparentemente não são reproduzidas na presença de proteínas séricas.

Então, seria mais razoável dizer que não é tão importante avaliar compostos cujos potenciais redox em solução ocorrem em valores acessíveis em meio aquoso de pH 7,4.

ⁱⁱⁱ Assumindo ainda que a inércia química observada em solução se manteria diante dos mais variados tipos de proteínas.

Mais importante seria avaliar compostos cujos potenciais redox possam ser *modulados* em uma *faixa de potenciais* acessíveis em meio biológico.

Já a questão da labilidade / inércia dos compostos de rutênio nos remete às comparações com os mecanismos de ação da cis-platina. O primeiro comentário que gostaria de fazer diz respeito à procura inicial por complexos de rutênio que apresentassem taxas de hidrólise comparáveis às dos compostos de platina nas mesmas condições. Diante do que foi exposto no parágrafo acima, é mais realista fazer correlações entre a química em solução de complexos inertes (como por exemplo o composto que apresenta atividade tripanocida que será tratado no Capítulo 1 deste texto), do que de compostos lábeis como a própria cis-platina.

A contraposição da labilidade / inércia dos compostos de rutênio com a platina é algo que também costuma ser invocado nos artigos. O Ru(III) costuma ser considerado nesses textos como sendo mais inerte que a Pt(II). Em princípio, não é. Se levarmos em conta que a energia de estabilização de campo cristalino é o principal fator a ser considerado e deixarmos de lado as diferenças oriundas da geometria dos complexos de rutênio e platina, podemos verificar isso a partir da posição relativa dos dois elementos na tabela periódica e nos valer de argumentos simples da química de coordenação, como a variação periódica de Dq (parâmetro de desdobramento de campo cristalino) e os efeitos eletrônicos de estabilização daí originados. Normalmente essa generalização se presta a balizar a hipótese de que para um metalo-fármaco ser ativo ele precisaria passar pelo que se chama de “ativação por redução”. Ou seja: um composto de Ru(III) seria ativo apenas após ser reduzido. A redução o tornaria mais lábil e mais apto a interagir com bioalvos. Novamente há um viés conceitual, pois, o íon Ru(II) de configuração d^6 seria ainda mais inerte (considerando as energias de estabilização de campo ligante) do que o íon Ru(III) d^5 . Fazendo uma digressão, essa linha argumentativa é conveniente pois leva a uma terceira generalização: a de que o complexo obrigatoriamente precisa passar por essa via redutiva, já que o ambiente dos tumores é redutor (devido à hipóxia). A via redutiva oferece hipoteticamente um meio de controle da atividade: compostos de Ru(III) são inertes e inativos até atingirem o tumor, onde seriam reduzidos e passariam a expressar sua atividade. Ou seja: criou-se uma linha argumentativa que habita o imaginário das pessoas envolvidas na área e que embute uma série de problemas conceituais. Mas que, confortavelmente, se presta a estabelecer como certo e linear que compostos de Ru(III) precisam ser inertes, para serem ativados por redução apenas quando chegarem ao seu bioalvo, o tumor.

Em primeiro lugar hoje, em 2017, parece haver consenso de que os tumores primários (sólidos) não são os alvos preferenciais dos complexos de rutênio. Fato é que existe uma variedade de exemplos na literatura de complexos de Ru(III) e Ru(II) que são mais ou menos inertes em diferentes condições (especialmente no que diz respeito à presença ou não de uma proteína como a HSA no meio reacional). Essa frase ocorre aqui apenas para dizer o óbvio: não é de todo realista tentar racionalizar o comportamento de complexos com esfera de coordenação mista com argumentos exclusivamente baseados na teoria cinética original de Taube. A linha de análise é correta, no entanto há que se estudar caso a caso. Os argumentos sobre labilidade e inércia apresentados acima são válidos para os chamados “complexos de Werner”, que são complexos octaédricos homolépticos com ligantes “simples” como a água, a amônia ou os haletos. Além disso, a racionalização (reitero, correta) do comportamento cinético de um íon metálico a partir da estabilização relativa dos reagentes e produtos por energia de estabilização de campo ligante é apresentada nos livros textos para reações de substituição de água coordenadas (ou seja, de solvente), o que não tem paralelo com os complexos NAMI-A, KP1019 e outros estudados como candidatos a fármacos.

O que se sabe é que a reação de hidrólise da cis-platina é importante para sua atividade, uma vez que é o complexo aquo que se liga ao DNA. A reação de interesse (aquação) ocorre em um intervalo de poucas horas nas concentrações de íons Cl^- presentes no meio celular (4 – 20 mM), intervalo compatível com os processos de divisão celular. Já os complexos de Ru(III) da família do NAMI-A e KP1019 sofrem reação de substituição de íons cloreto mesmo nas concentrações mais altas desse ânion encontradas no meio extracelular (~150 mM), o que responderia em parte por sua grande afinidade por proteínas séricas. Hoje já foi descrito, no entanto, que mais de 90% da dose de cis-platina administrada por via intravenosa é desativada por ligação com proteínas séricas. Ou seja: as taxas de hidrólise desses complexos não são dependentes apenas da concentração de Cl^- no meio. A reatividade é modificada na presença de proteínas séricas.

O conhecimento sobre os mecanismos de ação da cis-platina e seus análogos é muitíssimo maior do que o conhecimento acumulado para os compostos de rutênio. Já está bem estabelecido que a cis-platina atua preferencialmente em tumores e mais, atua diretamente no DNA. Portanto é pré-requisito para sua atuação que o complexo seja internalizado pelas células. No caso do rutênio, a grande verdade é que os mecanismos de suas ações biológicas não estão seguramente descritos. Contudo, no que diz respeito a câncer, a maioria dos compostos de rutênio não atua diretamente em tumores primários.

Ao contrário, têm atividade relevante em fase de metástase. Aparentemente esse comportamento pode ser explicado em função de dois fatores já investigados: a internalização (ou uptake celular) é baixa no caso dos complexos de rutênio e os mesmos apresentam alta afinidade por proteínas séricas. Até o momento a melhor hipótese para explicar a atividade anti-metastática dos complexos de rutênio seria sua capacidade de se ligar ao colágeno na matriz extracelular e às proteínas do tipo da actina, na superfície celular, de modo a interferir na mobilidade de células cancerígenas invasivas. Esses fatos mostram que o DNA não necessariamente deva ser um alvo pretendido quando se idealiza a estrutura química de um candidato a metalo-fármaco.

No entanto, verifica-se que o aumento global da aromaticidade do complexo (obtido pela escolha de ligantes orgânicos aromáticos) aumenta sim a interação dos mesmos com biomoléculas. E isso tem como consequência maiores valores de “uptake” celular, possivelmente relacionada a um aumento na interação dos complexos com estruturas da membrana celular. É necessário então desmistificar a ideia de que a presença de ligantes orgânicos aromáticos, que sirvam como âncora para a interação dos complexos com biomoléculas, implica necessariamente em ganho nas propriedades de um metalo-fármaco. Tem sido demonstrado que, embora geralmente implique em aumento de citotoxicidade, o aumento na aromaticidade se traduz, de modo geral, em aumento de lipofilicidade. Isso aumenta os tempos de retenção dos complexos no organismo e pode aumentar também sua toxicidade geral.

Daqui deriva outro ponto que precisa ser levantado: o que buscamos quando idealizamos um candidato a metalo-fármaco? Geralmente buscamos planejar aspectos estruturais que garantam alguma citotoxicidade em concentrações seguras. Ora, o NAMI-A foi investigado justamente por sua citotoxicidade ser baixa, pois ele atua em processos que levam à morte celular sem apresentar alta citotoxicidade *in vitro*.^{iv} Portanto, o fato de que altos valores de citotoxicidade não precisam ser necessariamente um objetivo a ser alcançado no desenho de candidatos a metalo-fármacos de rutênio, e do conhecimento de que sua internalização é baixa, confere relevância aos ensaios de interação dos complexos de rutênio com proteínas séricas. Naturalmente esses aspectos devem ser investigados caso a caso, mas para os propósitos deste texto, a generalização é válida.

^{iv} A dicotomia citotoxicidade vs toxicidade é evidente no caso do NAMI-A: como será discutido no texto, os testes clínicos foram descontinuados após a conclusão da fase II pois, apesar da baixa citotoxicidade nos testes *in vitro* e *in vivo* em fase pré-clínica, o composto mostrou-se tóxico nas condições de realização dos testes em humanos.

O NAMI-A é o melhor exemplo disso. Nos testes clínicos de fase II, apresentou toxicidade tão alta aos pacientes que o composto foi, finalmente, descartado. Ao contrário, o complexo KP1019, que apresenta citotoxicidade *in vitro* em geral superior à observada para o NAMI-A, apresentou-se menos tóxico em humanos nos testes clínicos de fase I.

Será que o NAMI-A é de fato ruim? Alessio pondera que, novamente, caiu-se na armadilha do paralelismo “obrigatório” com a cis-platina. De modo bem simplificado, os testes clínicos foram realizados segundo protocolos que levaram em consideração a atuação dos fármacos à base de platina. Estes atuam no DNA e, como já dito, os complexos de rutênio têm como principal alvo biológico proteínas séricas e sua internalização nas células costuma ser baixa. No entanto, é óbvio que essas interações podem ser moduladas, principalmente em função da concentração do fármaco. Foi demonstrado que a internalização de compostos de rutênio aumenta em concentrações altas (> que 100 μ M) devido à maior taxa de ligação à apo-HSTf (a apo-HSTf é a forma livre de ferro da HSTf).^v Tumores, por serem muito vascularizados, precisam de um aporte alto de ferro. Portanto, há um aumento de receptores de HSTf em sua superfície. Desse modo, o aporte do complexo de rutênio seria maior no tumor se fosse administrado em quantidades altas. Os testes, grosso modo, seguiram os protocolos de administração dos fármacos à base de platina e utilizou-se concentrações tão altas quanto 600 μ M m⁻². Foram deixados em segundo plano o conhecimento de que os mecanismos de ação dos complexos de rutênio são diferentes e que as atividades conhecidas ocorrem em faixas de concentração muito mais baixas...

A HSTf é uma proteína com uma função específica, ela é responsável pela internalização do ferro nas células. Experimentos *in vitro* mostraram que, quando se incubava células com HSTf previamente carregada com KP1019, sua internalização diminui em comparação com a incubação com o complexo em solução. Esse fato sugere que, embora a ligação da HSTf com o complexo de rutênio ocorra, é possível que o aduto formado não tenha a conformação correta para interagir com os receptores celulares. Esse ponto ganha força mediante a observação de que a internalização do KP1019 aumenta quando se utiliza uma HSTf pré-carregada com rutênio e ferro, respectivamente nas proporções 1:1:0,3. Por fim, apesar da capacidade da HSTf se ligar a alguns complexos de rutênio em determinadas condições e de ter sido verificada a internalização nas células, por hora nada

^v A transferrina é uma proteína que apresenta seletividade ao ferro quando este está em excesso em relação a outros metais e quando há também excesso de albumina, que se ligará preferencialmente a esses outros metais. Ou seja: a transferrina é seletiva a ferro *nas condições fisiológicas*. No entanto ela é capaz de se ligar a vários outros metais, especialmente se a concentração dos mesmos for alta.

se sabe sobre a capacidade dos adutos HSTf-Ru e HSTf-Ru-Fe liberarem rutênio nas mesmas condições fisiológicas da liberação do ferro (redução em meio ácido à Fe(II) com consequente diminuição de afinidade pela proteína).

Além dos fatos discutidos acima, outro aspecto inescapável é a grande diferença de concentração plasmática entre a HSA (da ordem de 600 μM) e da HSTf (varia entre 20 a 30 μM). *In vivo*, é muito mais provável a ocorrência de ligações inespecíficas entre complexos de rutênio com a HSA. A HSA parece não ter nenhum papel específico além de transportar e armazenar os compostos, mantendo sua concentração plasmática constante.

Diante deste cenário (especificidade para ferro nas condições fisiológicas e atuação dos compostos de rutênio no meio extracelular), gostaria de opinar que talvez não seja tão importante estudar as interações de complexos de rutênio com a HSTf. Em outras palavras, talvez não seja rigorosamente necessário buscar complexos cujo alvo seja o DNA uma vez que qualquer atuação nesse sentido depende da internalização do complexo de rutênio na célula (assumindo que a principal via de internalização seria medida pela HSTf). Reitero a relevância (já mencionada neste texto) da realização do estudo das interações dos complexos com a HSA. A avaliação das interações fracas que se estabelecem entre complexo e a HSA é extremamente relevante, pois estas interações dirigem a posterior formação de adutos covalentemente ligados, normalmente com resíduos de histidina (cujo grupo ligante para o rutênio é um imidazol). Recentemente foi levantada a possibilidade de que são os adutos HSA-Ru que seriam responsáveis pela atividade observada para o NAMI-A e o KP1019 *in vivo*.^{vi} Não será de uma hora para outra que a comunidade abandonará a ideia de que os compostos precisam ser internalizados e, portanto, de que é necessário continuar investigando a HSTf. No entanto, se isso ocorrer, as mesmas questões sobre como o aduto de rutênio seria liberado para realizar suas funções serão centrais. Do ponto de vista estritamente químico, as ligações Ru(III) / Ru(II) com a histidina são estáveis e pouco lábeis.

A última questão que gostaria de levantar diz respeito a quando o metalo-fármaco atua como a droga em si, ou quando ele atua como uma pró-droga. A definição de um complexo como metalo-fármaco passa pela ideia implícita de que é a estrutura originalmente administrada que tem a atividade biológica. A pró-droga seria o composto

^{vi} Existe um mecanismo chamado de permeabilidade / retenção a partir do qual a HSA se acumula em tecidos cancerígenos. O acúmulo ocorre devido à alta vascularização desses tecidos. No entanto essa vascularização é defeituosa, por assim dizer, e gera vazamentos que, por sua vez, não contam com nenhum mecanismo de reparo no tecido doente.

químico que, após sua administração, sofreria algum grau de transformação e os novos produtos gerados *in vivo* é que seriam efetivamente ativos.

No caso dos complexos de coordenação e particularmente no caso dos compostos de rutênio, o leitor menos familiarizado com a área costuma encarar o complexo como um mero “carregador” de ativos orgânicos (os ligantes). E que, na melhor das hipóteses, sofrerá reações de substituição (aquação, por exemplo) *in vitro* ou *in vivo*, liberando o ativo orgânico. De modo geral não se tem considerado o outro lado da história, o fato de que em reações de substituição em meio biológico a espécie de interesse pode não ser aquela que foi liberada do composto, mas sim a nova espécie metálica. Há sugestões na literatura de que, em última análise, as ações biológicas observadas para os complexos da família do NAMI-A (e KP1019) teriam origem na simples perturbação das vias metabólicas do Fe(III). Essas perturbações ocorreriam após a perda dos ligantes e a substituição do íon de ferro pelo íon de rutênio nu em metalo-proteínas. Essa é a única linha argumentativa que passa pela ideia de biomimetismo preconizada na bioinorgânica: as eventuais semelhanças entre o ferro e o rutênio, por serem metais do mesmo grupo, permitiriam a substituição em sítios biológicos de ferro, conferindo sim toxicidade aos compostos de rutênio.

Então, os três tipos “básicos” de complexos podem ser considerados como candidatos a metalo-fármacos: a) compostos inerte (fármaco); b) compostos que liberam grupos funcionais específicos, como o óxido nítrico, mediante estímulos controlados (pró-droga) ou c) complexos lábeis como o NAMI-A, que assumem outra composição *in vivo* pela perda seus ligantes (pró-droga; neste caso a espécie ativa não seria os ligantes liberados e sim o aduto metálico formado).

A conclusão (superficial) que a análise apresentada pode sugerir a um leitor desavisado é a de que, então, não haveria sentido no desenvolvimento de enormes quantidades de artigos acadêmicos focando estudos em solução e *in vitro* de complexos candidatos a fármacos. Nada poderia ser mais equivocado! A ideia aqui é trazer à tona a dificuldade de tratar dados obtidos em solução e *in vitro* como **preditivos** do comportamento *in vivo*. O comportamento *in vivo* pode ser muitíssimo imprevisível, especialmente por que não temos controle de todas as variáveis envolvidas. Essa é, de fato, a única limitação. No entanto, é o comportamento estabelecido a partir de estudos acadêmicos que permite a obtenção reprodutível de um material em quantidades e pureza adequadas. É o que desperta interesse a partir de alguma propriedade distintiva. E mais: não haveria rigorosamente nenhuma chance de se realizar experimentos *in vivo*, seja em protocolos animais ou em humanos, sem o acúmulo de um grande número de dados

coletados *in vitro* que permitam **inferir** sobre a atividade e toxicidade de um candidato a fármaco. A pesquisa acadêmica é inescapável.

Do ponto de vista desta química (e de outros!), após mais de trinta anos de investigações focando a atividade biológica de complexos de rutênio, simplesmente não será mais o bastante (se é que será sequer possível) justificar estudos dessa natureza a partir de generalizações sobre o comportamento do rutênio e paralelismos com o ferro e a platina. É preciso sim levantar dados de exemplos, tal qual o NAMI-A, para os quais alguma atividade relevante tenha sido demonstrada.^{20, 23} É preciso não abandonar pesquisas de cunho básico, que focam alvos clássicos como o DNA,^{24a} mas fazê-las com um olhar mais arejado, mais crítico.^{24b} É mandatório investigar outros aspectos, como o metabolismo e as possíveis interações cruzadas dos candidatos a fármacos com outros compostos químicos.^{vii} E, por fim, é preciso não se intimidar diante de uma estrutura que não apresente nenhum aspecto facilmente reconhecível como promissor no planejamento de um fármaco. Os resultados apresentados neste texto, especificamente aqueles que tratam da atividade biológica de carboxilatos trinucleares de rutênio, são prova disso.

^{vii} Nosso grupo já tem em andamento, na forma de trabalho de colaboração com o grupo do Prof. Anderson R. M. de Oliveira, da FFCLRP, um estudo do metabolismo *in vitro* e dos perfis de biotransformação do composto que apresenta atividade tripanocida apresentado no capítulo 1 deste texto.

Capítulo 1

1 Carboxilatos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo

1.1 Carboxilatos trinucleares de rutênio: aspectos gerais de sua química e aplicações biológicas

O estudo dos carboxilatos trinucleares de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^n$ (L = ligantes H_2O ou N-heterociclo e n varia de -1 até $+2$), constitui uma linha de pesquisa já bastante consolidada na literatura, que ganhou ímpeto no começo da década de 70 com o trabalho de Spencer e Wilkinson,²⁵ e destaque com o trabalho clássico de Meyer²⁶, que explorou pela primeira vez as propriedades redox de valência mista destes carboxilatos.

Na verdade, carboxilatos $[\text{M}_3\text{O}]$ são conhecidos desde a década de trinta²⁷ para uma variedade de metais de transição. Sua formação constitui um exemplo de reação de auto-organização na qual se faz reagir um sal do metal de transição de interesse, um carboxilato RCOO^- e o ácido carboxílico correspondente em solução etanólica (Figura 5). Esses complexos se arranjam espontaneamente segundo uma estrutura trigonal, ligados em ponte pelo átomo central de oxigênio e pelos grupos carboxilatos. Isso tem sido observado mesmo quando se varia o grupamento R do carboxilato ou os metais de transição envolvidos.^{25, 28, 29, 30} No caso do rutênio, embora não haja estudos mecanísticos sobre a formação do complexo trinuclear, a participação do intermediário binuclear $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{RCOO})_2]$ foi sugerida,^{31,32} o que explicaria a observação de clusters mistos do tipo $[\text{MRu}_2\text{O}(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^n$, mas não do tipo $[\text{RuM}_2(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^n$ ^{33, viii}

Já na década de 70 do século passado, resultados de difração de raio-X³⁴ demonstraram que a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ é planar, com o íon de oxigênio ocupando o centro e os íons Ru ocupando os vértices de um triângulo. Quando o complexo é isolado com três ligantes L do tipo fosfinas, N-heterocíclicos ou moléculas de solvente e os íons rutênio encontram-se no estado de oxidação $+3$, a carga global é $+1$, e a literatura assume que o complexo apresenta estrutura de triângulo equilátero (Figura 5).^{28, 35} Complexos onde um dos ligantes é fortemente π -receptor como uma molécula de CO ou um isocianeto tendem a

^{viii} Há algum tempo atrás, foi reportada a caracterização estrutural de um cluster trinuclear contendo três metais diferentes, a saber Cr , Fe e Ni (A. B. Blake, E. Sinn, A. Yavari, K. S. Murray, B. Moubaraki, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1998, 45).

ser formados apenas quando um dos centros metálicos apresenta estado de oxidação +2, o que reduz a carga formal do complexo para 0. Esses fatos levam a distorções na estrutura, que passa a ser melhor descrita como um triângulo isósceles.^{36, 37}

Figura 5. Reação de formação do cluster hipotético $[Ru_3O(RCOO)_6(L)_3]^+$ e estrutura trigonal resolvida do composto $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^+$ (*qui* =quinazolina)

Fonte: a autora

Esses complexos têm encontrado aplicação em diferentes áreas, tendo sido utilizados como unidades de montagem em sistemas supramoleculares dendriméricos, em nanoestruturas para a funcionalização da superfície de eletrodos, como sondas para reações de transferência de elétrons em estado fundamental e também em processos fotoinduzidos, no desenvolvimento de sensores colorimétricos, e na construção de estruturas estendidas e filmes poliméricos, só para mencionar alguns exemplos.³⁸

Essa versatilidade de comportamentos deriva das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas dos complexos trinucleares que resultam da forte interação eletrônica entre os três íons Ru promovida pela ponte μ -oxo e, segundo o que é aceito na literatura, interação promovida em menor extensão pelas pontes de acetato. Estas interações têm sido explicadas em termos do diagrama qualitativo de orbitais moleculares, primeiramente desenvolvido por Cotton,³⁴ e discutido em maiores detalhes por Meyer.²⁶ Aspectos relacionados à estrutura eletrônica destes complexos serão bastante discutidos adiante neste texto. Neste momento cabe apenas enfatizar que a mistura orbital promovida pelas pontes μ -oxo e μ -acetato e a presença ou não de deslocalização eletrônica são questões centrais a serem avaliadas na investigação das propriedades desta classe de complexos.

Um dos aspectos mais relevantes que tornam esses compostos dignos de interesse diz respeito a seu comportamento eletroquímico. A unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ pode apresentar de quatro a cinco pares de ondas reversíveis em uma faixa de potencial entre $-1,5\text{ V}$ até $+2,5\text{ V}$ (*vs* EPH). Dessas, três processos são acessíveis em meio aquoso. Essas ondas correspondem aos processos monoelétrônicos $\text{Ru}^{\text{II}, \text{II}, \text{II}} / \text{Ru}^{\text{II}, \text{II}, \text{III}} / \text{Ru}^{\text{II}, \text{III}, \text{III}} / \text{Ru}^{\text{III}, \text{III}, \text{III}} / \text{Ru}^{\text{III}, \text{III}, \text{IV}} / \text{Ru}^{\text{III}, \text{IV}, \text{IV}}$ e são separadas por cerca de 1 V , o que reflete a grande interação eletrônica entre os centros metálicos.^{39, 40} A descrição da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ localizada, ou seja $\text{Ru}^{\text{III}, \text{III}, \text{III}}$, é utilizada apenas para esclarecer quais são os processos redox monoelétrônicos associados a cada onda voltamétrica. Esta unidade é melhor descrita como um sistema com alta deslocalização eletrônica, cuja carga formal pode variar de -2 até $+3$. A descrição da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ como um sistema localizado só é válida para clusters assimétricos que contenham um ligante fortemente π -receptor como o CO, como será discutido adiante.

De interesse para o uso destes complexos como espécies biologicamente ativas é o fato de que os potenciais dos processos redox da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são fortemente influenciados pela natureza doadora ou receptora do ligante terminal L, conforme fica claro pela dependência dos valores de $E_{1/2}$ com o pK_a de L.⁴¹ Além disso, a solubilidade desses compostos também pode ser modulada pela variação dos ligantes periféricos L. Por fim, é importante ressaltar que tais compostos são bastante estáveis no escuro, o que nos dá um mecanismo de controle, como fotoindução ou estímulo redox, de algumas propriedades de interesse, como a liberação induzida e controlada de moléculas tais como NO e CO.

De posse dessas informações, pode-se iniciar a apresentação da atual linha de pesquisa da autora. Para além dos trabalhos brevemente descritos acima, até o momento há pouquíssimos relatos de estudos a respeito da potencial aplicação como metalo-fármacos e interação com alvos de relevância biológica destes carboxilatos. Até maio de 2017 encontram-se na literatura apenas 7 trabalhos que tratam desses aspectos (Tabela 1), dos quais quatro são deste grupo de pesquisa. Esse fato, além dos resultados que serão apresentados neste texto, mostra o protagonismo do grupo dessa área.

Naturalmente, a tentativa de utilizar tais complexos em aplicações biológicas implica no aproveitamento de espécies já descritas e, principalmente, no planejamento de espécies com propriedades específicas. Esse planejamento, por sua vez, requer um entendimento profundo do comportamento químico dos complexos em questão. Sendo assim, o grupo tem procurado contribuir com trabalhos de natureza estritamente química,

que envolvem predominantemente síntese e caracterização de novas espécies, além de trabalhos que apresentem estudos de interação com bio-alvos. Realizamos ainda testes de alguma atividade biológica relevante que são, em sua totalidade, desenvolvidos como trabalhos de colaboração.

Tabela 1. Trabalhos sobre carboxilatos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo encontrados na literatura até maio de 2017 envolvendo algum aspecto biológico

P. Lay <i>et al.</i> , <i>Metallomics</i> , 2009. ²⁰	Ausência de toxicidade do complexo modelo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]^+$
P. Lay <i>et al.</i> , <i>Angewandte Chemie</i> , 2010 ⁴²	Complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]^+$ foi utilizado como modelo em estudos de interação com a BSA (albumina do soro bovino)
Tauchman <i>et al.</i> , <i>Inorganica Chimica Acta</i> , 2014 ⁴³	Clusters com ligantes imidazólicos, atividade contra câncer de pulmão, linhagem A549
S. Nikolaou <i>et al.</i> , <i>Journal of Inorganic Biochemistry</i> , 2014 ⁴⁴	Clusters contendo NO, atividade contra melanoma, linhagem B16F10
S. Nikolaou <i>et al.</i> , <i>Inorganica Chimica Acta</i> , 2015 ⁴⁵	Clusters contendo NO, atividade vasodilatadora
S. Nikolaou <i>et al.</i> , <i>Journal of Luminescence</i> , 2016 ⁴⁶	Clusters contendo NO, interação com HSA
S. Nikolaou <i>et al.</i> , <i>Journal of xxx</i> , 2017 ⁴⁷	Clusters simétrico combinados com ligantes azanftalenos, atividade tripanocida

No contexto dos trabalhos de cunho químico e, levando-se em consideração que os complexos trinucleares já são estudados há muitos anos, a questão que se colocou foi a seguinte: o que mais há para se saber a respeito de unidades monoméricas de clusters de rutênio?^{ix} Da qual deriva a segunda questão central do trabalho: há aspectos relevantes que ainda não compreendemos? Na tentativa de responder a essas perguntas, verifiquei que a literatura, embora rica, apresenta certos conteúdos de maneira dispersa. Sendo mais objetiva: embora haja bons trabalhos de revisão, percebi que não havia um trabalho sobre clusters simétricos (aqueles nos quais o três ligantes periféricos são iguais) que apresentasse de maneira sistemática a dependência das propriedades fundamentais com a variação dos ligantes. Há alguns poucos trabalhos que apresentam dados de caracterização de uma ou duas espécies isoladamente, ou trabalhos que apresentam a sistematização de

^{ix} Para esta última frase cabem duas explicações. Com relação ao uso do termo cluster: a palavra cluster, que pode ser traduzida como agregado, no contexto da química inorgânica é utilizada para se referir a compostos que contenham ligação metal-metal direta, que NÃO é o caso dos compostos aqui investigados. No entanto essa terminologia foi adotada (e aceita) na literatura para se referir aos carboxilatos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo em função da grande mistura orbital entre os três íons de rutênio em função da ponte oxo. Sobre o termo “unidades monoméricas”: a nuclearidade dos compostos diz respeito ao número de íons metálicos que constituem cada íon complexo. Por sua vez, cada um desses complexos se constituem em um *monômero* que pode ser combinado com mais unidades de complexo através de ligantes de ponte como, por exemplo, a pirazina. Esse encadeamento de unidades gera dímeros, trímeros e oligômeros de ordem maior, cuja nuclearidade passa de trinuclear para hexanuclear, e assim por diante.

apenas uma propriedade em função de modificações estruturais (como variação de potenciais redox⁴¹ ou variação de algum sinal de RMN⁴⁸)

Além da questão da variação dos ligantes terminais, há também a questão da alteração nos estados de oxidação dos íons de rutênio. Percebi que, embora seja conhecido e estabelecido na literatura o fato de que clusters simétricos em geral apresentem deslocalização eletrônica e que clusters assimétricos com abaixamento de carga formal de +1 para 0 e coordenação de ligantes fortemente receptores apresentem localização de valência, ninguém até aqui havia se preocupado em verificar como as propriedades fundamentais desses compostos respondem a essa diferença colocando a análise dos dois grupos (localizado e deslocalizado) em perspectiva.

Por fim, para fechar a problemática, há ainda os clusters combinados com óxido nítrico. Há ainda poucos trabalhos sobre essas espécies na literatura, sendo alguns do meu grupo. E ainda não há nenhum trabalho que traga um resultado de difração de raio-X de monocristal. Portanto, a geometria desses compostos pode apenas ser inferida por comparação. O que podemos dizer até o momento é que as espécies de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2\text{NO}]\text{PF}_6$, que formalmente tem carga +1 com três íons Ru(III) e o ligante NO neutro, aparentemente apresentam um comportamento intermediário entre as espécies deslocalizada e a de valência-mista (localizada). Além disso, dados de fotoliberação de NO publicados recentemente pelo grupo não podem ser totalmente explicados pelo diagrama de níveis de energia originalmente proposto para esses nitrosilos.⁴⁵

A Figura 6 abaixo resume a problemática exposta acima. Nos próximos dois itens deste capítulo serão descritos os estudos sistemáticos de uma série de complexos simétricos e uma série de complexos de CO. Os resultados parciais obtidos até o momento para a *comparação* de vários clusters de NO ainda não são totalmente conclusivos e, por isso, ainda não foram publicados.

Figura 6. Representação esquemática das três classes de clusters trigonais de rutênio descritos neste capítulo

Estudo comparativo de mudança de ligantes

Fonte: a autora

1.2 O que mais há para saber sobre clusters trinucleares de rutênio simétricos?

Abordaremos aqui os resultados obtidos a partir da investigação da série de complexos trinucleares de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$, nos quais L = (1) quinazolina (qui), (2) 5-nitroisoquinolina (5-nitroi), (3) 5-bromoisoquinolina (5-bri), (4) isoquinolina (iq), (5) 5-aminoisoquinolina (5-amiq) e (6) 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolina (thiq), Figura 7 (arquivos CAP1_aMS.pdf e CAP1_aSI.pdf).³⁵

A síntese de todos os complexos seguiu o procedimento descrito na literatura, com pequenas adaptações quando necessário.²⁶ Faz-se a reação entre o cluster precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]\text{CH}_3\text{COO}$ com seis vezes de excesso do respectivo ligante, em soluções de metanol, com agitação por 72 horas à temperatura ambiente. Ao término da reação adiciona-se NH_4PF_6 para a troca do contra-íon. Em todos os casos houve a necessidade de purificação dos compostos por cromatografia de adsorção em coluna. Após purificação, obteve-se valores típicos de rendimento, excelentes valores de análise elementar e excelente concordância entre os valores observado e calculado para a massa do

íon molecular obtidos por espectrometria de massas ESI-MS. Tais dados estão apresentados abaixo, de forma resumida.

Figura 7. Estrutura proposta para os complexos de fórmula geral $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_3]PF_6$, nos quais $L =$ (1) quinazolina (qui), (2) 5-nitroisoquinolina (5-nitroi), (3) 5-bromoisoquinolina (5-briq), (4) isoquinolina (iq), (5) 5-aminoisoquinolina (5-amiq) e (6) 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolina (thiq) e legendas para o 1H RMN

Fonte: adaptado da referência 35.

$[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]PF_6$ (1). O produto da reação foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de alumina neutra e a fração de interesse foi eluída com acetonitrila. Rendimento: 19%. Valores de análise elementar calculados para $C_{36}H_{36}O_{13}F_6N_6PRu_3$ (experimental): C, 35,77 (35,10), H, 3,00 (3,07), N, 6,95 (6,79). ESI-Q-TOF MS $[1-PF_6]^+$ (experimental): m/z 1065,9 (1065,9).

$[Ru_3O(CH_3COO)_6(5\text{-nitro})_3]PF_6$ (2). O produto da reação foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de alumina neutra e a fração de interesse foi eluída com acetonitrila. Rendimento: 38%. Valores de análise elementar calculados para $C_{39}H_{36}O_{19}F_6N_6PRu_3$ (experimental): C, 34,93 (34,95), H, 2,71 (2,83), N, 6,27 (6,19). ESI-Q-TOF MS $[2 - PF_6]^+$ (experimental): m/z 1197,9 (1196,9).

$[Ru_3O(CH_3COO)_6(5\text{-briq})_3]PF_6 \cdot CH_3OH$ (3). O produto da reação foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de alumina neutra e a fração de interesse foi eluída com mistura 9:1 acetonitrila : diclorometano (v:v). Rendimento: 20%. Valores de análise

elementar calculados para $C_{39}H_{36}O_{13}F_6N_3PBr_3Ru_3 \cdot CH_3OH$ (experimental): C, 32.57 (32.64), H, 2.73 (2.90), N, 2.85 (2.63). ESI-Q-TOF MS [**3** – CH_3OH – PF_6]⁺ (experimental): m/z 1296.7 (1296.6).

[Ru₃O(CH₃COO)₆(iq)₃]PF₆ (4). O produto da reação foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de alumina neutra e a fração de interesse foi eluída com acetonitrila. Rendimento: 54%. Valores de análise elementar calculados para $C_{39}H_{39}O_{13}F_6N_3PRu_3$ (experimental): C, 38.74 (37.58), H, 3.25 (3.13), N, 3.48 (3.50). ESI-Q-TOF MS [**4** – PF_6]⁺ (experimental): m/z 1062.9 (1062.9).

[Ru₃O(CH₃COO)₆(5-amiq)₃]PF₆·CH₂Cl₂ (5). O produto da reação foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de alumina neutra e a fração de interesse foi eluída com mistura 9:1 acetonitrila : diclorometano (v:v). Rendimento: 31%. Valores de análise elementar calculados para $C_{39}H_{42}O_{13}F_6N_6PRu_3 \cdot CH_2Cl_2$ (experimental): C, 35.96 (35.50), H, 3.32 (3.36), N, 6.29 (6.26). ESI-Q-TOF MS [**5** – CH_2Cl_2 – PF_6]⁺ (experimental): m/z 1107.9 (1107.9).

[Ru₃O(CH₃COO)₆(thiq)₃]PF₆ (6). O produto da reação foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de alumina neutra e a fração de interesse foi eluída com mistura 9:1 acetonitrila : diclorometano (v:v). Rendimento: 29%. Valores de análise elementar calculados para $C_{39}H_{51}O_{13}F_6N_3PRu_3$ (**1**) (experimental): C, 38.45 (37.58), H, 4.22 (4.06), N, 3.45 (3.42). ESI-Q-TOF MS [**6**– PF_6]⁺ (experimental): m/z 1075.0 (1074.9).

1.2.1 Análise estrutural a partir de dados de difração de raio-X

Os dados de caracterização estrutural por difração de raio-X aqui discutidos foram coletados em trabalho de colaboração com o Prof. Victor M. Deflon, do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Os complexos **1-6** cristalizam facilmente. Contudo, apenas o complexo **1** produziu cristais adequados para análise de difração de raios-X, mostrando moléculas de CH_2Cl_2 desordenadas na estrutura cristalina. O complexo **1** cristalizou em um grupo espacial Cc monoclinico e a disposição dos centros de rutênio mostra uma forma triangular. A Figura 8 traz a estrutura do cátion $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^+$ e a Tabela 2 resume os comprimentos de ligação e ângulos de ligação envolvidos na unidade $[Ru_3O]$ (dados adicionais estão disponíveis como Informações Complementares do trabalho, arquivo CAP1_aSI.pdf).

Figura 8. (A) *Estrutura resolvida por difração de raio-X de monocristal do cátion $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^+$ (B) vista lateral; os átomos de hidrogênio foram omitidos para obter maior clareza.*

Fonte: adaptado da referência 35.

Tabela 2. Valores selecionados de comprimentos de ligação e ângulos do cátion $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^+$

Comprimentos de ligação (Å)		Ângulos de ligação (°)	
O(13)-Ru(1)	1.923(4)	Ru(3)-O(13)-Ru(1)	120.2(2)
O(13)-Ru(2)	1.941(4)	Ru(3)-O(13)-Ru(2)	119.9(2)
O(13)-Ru(3)	1.912(4)	Ru(1)-O(13)-Ru(2)	119.8(2)
N(11)-Ru(1)	2.112(6)	Ru(1)-Ru(2)-Ru(3)	59.71(1)
N(21)-Ru(2)	2.109(5)	Ru(2)-Ru(3)-Ru(1)	60.25(2)
N(31)-Ru(3)	2.106(6)	Ru(3)-Ru(1)-Ru(2)	60.03(1)

Os dados de difração de raios-X do complexo **1** concordam com dados coletados para outros complexos simétricos descritos na literatura:²⁸ os comprimentos de ligação Ru- O_{central} de aproximadamente 1,9Å e os ângulos Ru-Ru-Ru em torno de 60° confirmaram a forma triangular do núcleo $[Ru_3O]^+$. O fato das ligações Ru-N (2,1Å) serem mais longas do que as ligações Ru-O reflete a influência-*trans* associada ao oxigênio central. A estrutura resolvida indicou que o nitrogênio menos estericamente impedido é o átomo de nitrogênio coordenado ao íon Ru(III), eliminando a possibilidade de isomeria de ligação. Neste ponto, merece destaque o fato de que as *três* distâncias de ligação Ru- O_{central} não são de fato iguais, sendo uma delas mais longa (Tabela 2). Esse fato é relevante em nossa discussão pois, embora compostos análogos que tiveram sua estrutura resolvida por difração de raio-X apresentem exatamente o mesmo aspecto estrutural,^{29a, 49} a literatura tem tratado os complexos simétricos como tendo simetria D_{3h} e, portanto, tendo geometria de triângulo equilátero. Uma análise cuidadosa do caso estudado aqui e dos dois exemplos da literatura mostram que, embora a geometria sem dúvida alguma seja triangular, o grupo de ponto que melhor descreve os complexos é C_{2v} . Esse fato tem consequências importantes nas análises espectroscópicas que se seguirão.

Contudo, a característica notável desta estrutura é o alto nível de co-planaridade entre os três ligantes quinazolina e a unidade $[Ru_3O]$, conforme destacado na Figura 2 (B). O desvio dos átomos no plano formado pela unidade $[Ru_3O]$ é de 0,0001Å. Os planos calculados para os ligantes quinazolina coordenados por N(11), N(21) e N(31) formam ângulos de 1,83, 3,76 e 11,00° com o plano da unidade metálica e mostram desvios de 0,0084, 0,0204 e 0,0082Å, respectivamente. Na ausência de outros efeitos direcionando a estrutura do cátion, efeitos eletrônicos possivelmente prevaleceram.

Foi descrito na literatura que o ligante azanaftaleno isoquinolina foi capaz de deslocalizar densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ (reduzida) para a periferia do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_2(\text{CO})]$ através de π -conjugação.⁵⁰ No nosso caso, o centro $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ (oxidado) já se comporta como uma unidade deslocalizada em comparação com a classe dos carbonilos do exemplo citado acima. Além disso, idealmente sob o grupo de ponto D_{3h} , a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ tem os orbitais moleculares a_2'' e e'' , que têm simetria adequada para interagir com os orbitais do ligante azanaftaleno orientados paralelamente ao plano do centro $[\text{Ru}_3\text{O}]$ (vide o item de espectroscopia eletrônica a seguir).²⁶

Considerando os pontos acima, o complexo **1** parece ser um caso extremo em que as características tanto do centro metálico quanto do ligante azanaftaleno contribuem para a deslocalização eletrônica forte através de um sistema π -conjugado misto e estendido, produzindo um fragmento quase totalmente planar $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{qui})_3]$ e tornando a conformação representada na Figura 2 a mais favorável. Isto contrasta com o análogo de piridina $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_3]^+$, no qual o ligante aromático menor tende a deslocalizar menos a densidade eletrônica do centro metálico, de modo que o composto apresenta duas moléculas de piridina paralelas e uma perpendicular em relação ao núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}]$.⁵⁰

1.2.2 Estrutura eletrônica dos complexos

Não será possível avançar a discussão sem apresentar o diagrama de orbitais moleculares desenvolvido originalmente para complexos simétricos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$, idealmente sob grupo de ponto D_{3h} . Como dito anteriormente, este diagrama foi gerado primeiramente por Cotton³⁴ e tem sido utilizado a mais de quarenta anos sem modificações.

Na construção deste diagrama de orbitais moleculares considera-se a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ como sendo planar, definindo o plano σ_{xy} . O oxigênio central $\text{O}_{\text{central}}$ é considerado como tendo hibridização sp^2 a fim de explicar as três ligações no plano, formando ângulos Ru-O-Ru de aproximadamente 120° . Essa hibridização deixa o orbital p_z livre para sofrer interações com os orbitais $d\pi$ dos três íons de rutênio conforme a Figura 9. A disposição espacial dos átomos envolvidos nessas ligações leva à necessidade do uso de coordenadas locais para a visualização das interações.

Figura 9. Interações de natureza π que definem a estrutura eletrônica dos complexos simétricos com a unidade $[Ru_3O]$

Fonte: a autora

As interações $d_{y'z'} - p_z$ no plano perpendicular à unidade $[Ru_3O]$ geram dois orbitais a_2'' , um ligante com caráter de oxigênio e um anti-ligante com caráter metálico, além de dois orbitais degenerados não-ligantes e'' . A combinação linear dos orbitais $d_{x'z'}$ no plano da unidade $[Ru_3O]$ gera dois orbitais degenerados ligantes e' e um orbital anti-ligante a_2' . Por fim, a combinação dos orbitais $d_{x'^2-y'^2}$ origina dois orbitais degenerados e' e um a_1' , todos não ligantes. O conjunto de considerações acima origina o diagrama representado na Figura 10. A ordenação tentativa dos orbitais em termos de energia foi feita com base na regras de seleção e no espectro eletrônico desta classe de complexos.

Figura 10. Diagrama simplificado de orbitais moleculares de simetria π da unidade $[Ru_3O]$

Fonte: a autora

Embora os orbitais atômicos $d_{x'^2-y'^2}$ tenham simetria e energia adequada para se combinarem com orbitais dos átomos de oxigênio dos acetatos em ponte, essa interação foi negligenciada por ser considerada fraca em comparação com as interações metal-metal e com a ponte μ -oxo.

Este diagrama tem por finalidade explicar as transições eletrônicas de baixa energia observadas para essa classe de compostos que são chamadas de transições INTRA-CLUSTER ou, simplesmente, IC. Essas transições são compreendidas em uma banda larga, que ocorre ao redor de 700 nm para uma variedade muito grande de complexos simétricos com carga formal +1. Ganhou esse nome por envolver elétrons que ocupam esses orbitais com caráter essencialmente metálico, não envolvendo mistura com orbitais dos ligantes L nem dos ligantes acetato. Um dos aspectos experimentais que levou essas

transições a serem consideradas de caráter essencialmente metálico é o fato da pouca variação observada em seu máximo de absorção mesmo quando se varia os ligantes L ou as pontes carboxilato.²⁸

Esse diagrama foi abraçado pela comunidade que investiga esses complexos e tem sido assim até hoje, pois suas características permitem explicar de maneira extremamente satisfatória vários aspectos das propriedades dos clusters trinucleares de rutênio. Especialmente suas propriedades magnéticas, seus espectros de RMN e o seu perfil voltamétrico.

Considerando-se uma unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ de carga formal +1, ela é composta por três íons Ru(III) e um íon O^{2-} (ponte oxo) que contribuem, respectivamente, com 5 e 2 elétrons cada um, totalizando 17 elétrons a serem distribuídos. Apesar de cada íon Ru(III) ter configuração d^5 , em situação de spin baixo a distribuição eletrônica no diagrama da Figura 10 deixa apenas um elétron desemparelhado no orbital a_2' .

A ocorrência de apenas 1 elétron desemparelhado foi confirmada já há muito tempo através de medidas de suscetibilidade magnética e EPR.²⁸ De modo geral esse fato foi entendido como oriundo da grande deslocalização eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ promovida pela mistura orbital devido às interações diretas entre os íons rutênio e através da ponte μ -oxo. De fato, a ocorrência de apenas um elétron desemparelhado e a alta deslocalização eletrônica permite que os espectros de RMN ocorram com boa resolução e em uma faixa razoável de frequências, tipicamente entre -2 e 10 ppm no caso de ^1H RMN e entre -10 e 200 ppm no caso de ^{13}C RMN. Além disso, os complexos apresentam um perfil voltamétrico característico de complexos de classe III (totalmente deslocalizados) na classificação de Robin-Day.⁵¹

A princípio, o uso do diagrama pode ser facilmente estendido na interpretação das características dos complexos chamados de assimétricos, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{L})_2(\text{L}')^n]$, nos quais um dos ligantes periféricos é diferente dos demais e a simetria do complexo como um todo cai para C_{2v} . Por abaixamento de simetria, os orbitais e'' e e' se desdobram gerando os orbitais $a_2 + b_1$ e $a_1 + b_2$, respectivamente. Pode-se também incluir as interações com ligantes N-heterocíclicos (normalmente piridinas para esses complexos) para explicar a ocorrência das bandas de transferência de carga. Quando o anel piridínico encontra-se paralelo à unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, seus orbitais π^* podem interagir com os orbitais a_2'' e e'' . Quando o anel piridínico encontra-se perpendicular à unidade metálica, a interação pode ocorrer com os orbitais a_2' e e' . Essas bandas, denominadas TCCL

(transferência de carga cluster ligante), ocorrem tipicamente como ombros entre 300 e 400 nm para complexos de carga formal +1.

No entanto, apesar de todo o sucesso desse diagrama simplificado em explicar uma série de características, ele apresenta também uma série de problemas. Em primeiro lugar ele não atende à simetria real dos complexos que, na melhor das hipóteses seria D_{3h} distorcida (tendendo a C_{2v}), como visto nos dados de raio-X apresentados no item anterior e em dados de literatura.^{29a, 49} Embora a comunidade tenha conhecimento desses dados, o sistema tem sido sistematicamente discutido como altamente deslocalizado em simetria D_{3h} . Há um trabalho de cerca de 20 anos atrás que, com base em dados de infra-vermelho, sugeriu que o sistema poderia ser melhor descrito como um sistema com acoplamento antiferromagnético fraco e que o abaixamento de simetria teria origem na frustração de spin do elétron desemparelhado.⁵² Mais recentemente verificamos em meu grupo de pesquisa que este diagrama não explica a dependência de fotoliberação do NO com o comprimento de onda de irradiação; e não explica de maneira satisfatória a dependência das propriedades dos complexos quando analisados em séries com variação de ligantes periféricos, especialmente se não levarmos em consideração a participação das pontes de acetato como propagadoras dos efeitos eletrônicos mútuos da unidade metálica e dos ligantes periféricos L. Os dados apresentados nos próximos itens deste capítulo aprofundarão essa discussão.

1.2.3 Geometria de equilíbrio dos compostos 1 – 6 obtidas por modelagem molecular

Como apenas o complexo **1** produziu um cristal adequado para análise por difração de raio-X de monocristal (DRX), foram realizados cálculos de DFT para comparar as estruturas de todos os complexos da série. Os cálculos foram integralmente realizados pelo Prof. André L. B. Formiga, do Instituto de Química da UNICAMP, em trabalho de colaboração. A comparação entre as estruturas teórica e experimental do complexo **1** revela que as principais diferenças estão relacionadas com a orientação dos grupos metila dos acetatos (Figura 11).

Os valores apresentados na Tabela 3 mostram que o resultado do cálculo reproduz satisfatoriamente as distâncias de ligação e ângulos mais importantes e, mesmo que se tenha escolhido uma simetria inicial D_{3h} para a realização da otimização da estrutura, as geometrias de equilíbrio são mais próximas de uma simetria C_{2v} , com uma distância de ligação Ru-O_{oxo} mais longa, como observado na estrutura cristalina do complexo **1**.

Figura 11. Vista frontal e lateral da sobreposição das geometrias obtidas por DFT (azul) e por DRX (vermelho) para o complexo 1.

Fonte: adaptado da referência 35.

Tabela 3. Valores de distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para as geometrias de equilíbrio dos complexos 1-6, obtidos com DFT usando PBE0/def2-TZVP. Os átomos foram numerados de acordo com a estrutura de raios-X. Os números entre parênteses são desvios padrão dos valores médios.

Complexo	1	2	3	4	5	6
<i>Distâncias</i>						
O(13)-Ru(1)	1.977	1.993	1.979	1.974	1.929	1.972
O(13)-Ru(2)	1.915	1.909	1.919	1.922	1.986	1.926
O(13)-Ru(3)	1.907	1.917	1.908	1.912	1.916	1.912
Ru(1)-Ru(2)	3.367	3.373	3.368	3.369	3.392	3.365
Ru(1)-Ru(3)	3.358	3.372	3.364	3.362	3.344	3.355
Ru(2)-Ru(3)	3.319	3.334	3.325	3.329	3.363	3.342
Ru(1)-N(11)	2.097	2.098	2.095	2.102	2.119	2.106
Ru(2)-N(21)	2.109	2.114	2.112	2.110	2.104	2.115
Ru(3)-N(31)	2.110	2.124	2.114	2.114	2.126	2.114
média Ru-OAc	2.034	2.032	2.035	2.036	2.035	2.036
	(0.015)	(0.013)	(0.015)	(0.015)	(0.012)	(0.014)
O(13)-Ru ₃ plano	0.001	0.011	0.005	0.001	0.009	0.003
<i>ângulos</i>						
Ru(1)-O(13)-Ru(2)	119.8	119.6	119.6	119.7	120.1	119.4
Ru(1)-O(13)-Ru(3)	119.7	119.1	119.9	119.8	120.9	119.5
Ru(2)-O(13)-Ru(3)	120.6	121.2	120.6	120.5	119.0	121.1
Ru(1)-Ru(2)-Ru(3)	60.3	60.3	60.4	60.3	59.3	60.0
Ru(2)-Ru(1)-Ru(3)	59.2	59.3	59.2	59.3	59.9	59.6
Ru(1)-Ru(3)-Ru(2)	60.6	60.4	60.5	60.5	60.8	60.3

Essa distância maior é superestimada pelo cálculo em 0,03 Å, mas as outras duas distâncias de ligação Ru-O_{oxo} são reproduzidas dentro do erro experimental. A planaridade da unidade [Ru₃O] é verificada para a estrutura do equilíbrio, com o átomo de oxigênio central apenas ligeiramente fora do plano formado pelos átomos metálicos.

Outro ponto de destaque é que, tanto quanto observado experimentalmente na estrutura de raio-X do complexo **1**, na geometria de equilíbrio os três ligantes periféricos apresentam alto grau de co-planaridade com a unidade [Ru₃O]. A comparação da estrutura dos seis complexos da série (Tabela 3, e Figura S2 e Tabelas S1 – S6 do arquivo CAP1_aSI.pdf) não mostra nenhuma tendência especial: as estruturas de equilíbrio dos compostos são muito semelhantes entre si.

1.2.4 Espectroscopia de RMN e estrutura eletrônica

Considerando os clusters simétricos nos quais os três ligantes periféricos L são iguais, a unidade [Ru₃O]¹⁺ tem sido descrita como um centro metálico deslocalizado devido à grande mistura orbital observada para os três íons de rutênio e o oxigênio central.^{28,26} Nesse contexto, embora cada um dos íons Ru³⁺ (d⁵) seja paramagnético, a unidade [Ru₃O]¹⁺ contém apenas um elétron desemparelhado em sua estrutura. A intensa deslocalização eletrônica da unidade metálica atenua o efeito da anisotropia paramagnética deste um elétron, tornando possível a atribuição dos espectros de RMN para esta classe de compostos.^{28,48,53} Um espectro típico de um cluster trigonal de rutênio paramagnético é apresentado na Figura 12.

Figura 12. Espectro de ¹H RMN do complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(iq)₃]PF₆ obtido a partir de solução 10 mM em acetonitrila deuterada, a 298K

Fonte: adaptado da referência 35.

A Tabela 4 apresenta os valores de deslocamento químico observados para os sinais de ^1H dos complexos **1-6**. As atribuições foram baseadas nos espectros de correlação ^1H - ^1H (Figuras S11 - S16, arquivo CAP1_aSI.pdf), e nos espectros dos ligantes livres⁵⁴ e complexos análogos.^{28, 53a}

Existem três grupos principais de sinais a analisar: os sinais devidos aos hidrogênios dos grupos metila dos acetatos; os sinais devido aos hidrogênios α , α' e β do anel N-heterocíclico do ligante azanaftaleno diretamente ligado ao centro metálico; e os sinais devido aos hidrogênios γ , δ , ϵ e ζ do segundo anel do ligante azanaftaleno, estes últimos mais distantes da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$. Em comparação com os ligantes livres, os sinais devidos aos hidrogênios CH_3 deslocam-se para campo mais baixo. Os sinais devidos aos hidrogênios α , α' e β são fortemente deslocados para campo mais alto. E por fim, os sinais devidos aos hidrogênios γ , δ , ϵ e ζ são menos afetados e tenderam, no caso dos complexos **1-6**, a sofrer deslocamentos para campo mais alto (Tabela 4 e Tabela S2, arquivo CAP_aSI.pdf). O mesmo padrão emerge mesmo para o complexo **6**, onde o segundo anel do ligante thiq não é aromático. Estas observações concordam com o padrão bem estabelecido de deslocamentos químicos para esta classe de compostos, que são ditados principalmente pela anisotropia paramagnética da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$, transmitida pelos mecanismos de contato de Fermi e por pseudo-contato.^{53b}

Tabela 4. Deslocamentos químicos de ^1H RMN observados para os complexos 1-6. Os dados foram obtidos a partir de soluções 10 mM em CD_3CN a 298 K.

δ (ppm)						
Hydrogen	1 , qui	2 , 5-nitro	3 , 5-briq*	4 , iq	5 , 5-amino	6 , thiq
CH_3	5.43 (18H ^a , s) ^b	5.33 (18H, s)	4.79 (18H, s)	4.81 (18H, s)	4.63 (18H, s)	4.35 (18H, s)
α	3.07 (3H, s)	0.85 (3H, s)	0.97 (6H, s)	0.72 (6H, s)	0.61 (3H, s)	0.12 (3H, s)
α'	1.55 (3H, s)	1.24 (3H, s)	$\alpha'=\alpha$	$\alpha'=\alpha$	0.31 (3H, s)	-0.16 (3H, s)
β	-	6.54 (3H, s)	6.32 (3H, s)	6.26 (3H, s)	6.23 (3H, s)	5.89 (3H, s)
γ	7.29 (6H, d)	-	-	7.25 (3H, d)	-	1.46 (6H, q)
δ	$\delta = \gamma$	7.60 (3H, d)	7.41 (3H, d)	7.39 (6H, q)	6.32 (6H, dd)	3.93 (6H, t)
ϵ	7.39 (3H, d)	7.41 (3H, t)	7.28 (3H, t)	$\epsilon = \delta$	7.17 (3H, t)	1.39 (6H, t)
ζ	7.81 (3H, q)	8.42 (3H, d)	7.79 (3H, d)	7.57 (3H, d)	$\zeta = \delta$	1.74 (6H, t)
NH_2	-	-	-	-	4.45 (6H, s)	-
pK_a						
	3.66	3.85	4.85	5.17	6.15	7.00

*O espectro do composto **3** foi obtido a partir de solução em acetona- d_6 . ^a entre parênteses encontram-se os valores de integral do respectivo sinal; ^b s = singlete; d = dubleto; t = tripleto; q = quarteto.

Dado que o perfil dos espectros de ^1H RMN dos complexos **1-6** é consistente com a estrutura proposta, analisamos dois conjuntos diferentes de informações com o objetivo de verificar o acoplamento eletrônico e a influência mútua entre os ligantes periféricos e o centro metálico. Mais especificamente, analisamos como os valores de $\Delta\delta$ de alguns hidrogênios dos ligantes e os valores de δ dos hidrogênios CH_3 dos grupos metila variam em função dos parâmetros dos ligantes pK_a e σ_p (Hammett).⁵⁵

A magnitude dos valores de $\Delta\delta$, definido aqui como a diferença entre os valores de δ de hidrogênios do ligante azanaftaleno nas espécies livre (espécie diamagnética) e coordenada, permitiu avaliar como a anisotropia paramagnética da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ propagou-se através do mecanismo de contato de Fermi, especialmente para o segundo anel do ligante azanaftaleno, para o qual a interação dipolar (pseudo-contato) deve ser pouco importante pois diminui com o aumento da distância ao centro paramagnético (valores de δ e $\Delta\delta$ para os ligantes azanaftalenos podem ser encontrados na Tabela S13, arquivo CAP1_aSI.pdf). A Figura 13 ilustra a dependência dos valores de $\Delta\delta$ com o parâmetro pK_a e σ_p dos ligantes.

Para verificar então a magnitude da propagação da anisotropia paramagnética, optamos por examinar os complexos **2**, **3** e **5**, nos quais os ligantes são iso-estruturais, apresentando um substituinte na posição γ . Como esperado, os valores de δ dos hidrogênios α e α' do anel N-heterocíclico do ligante azanaftaleno diretamente ligado ao centro metálico sofrem os maiores deslocamentos, resultando em valores de $\Delta\delta$ elevados (Tabela S13, arquivo CAP1_aSI.pdf). Para os hidrogênios δ , ϵ e ζ no segundo anel azanaftalênico, a magnitude do deslocamento em seus sinais deriva da propagação da anisotropia paramagnética através do mecanismo de contato de Fermi (assumindo que o mecanismo de pseudo contato não influencia esses prótons) e esta propagação deve estar relacionada ao grau de deslocalização eletrônica do centro metálico para a periferia dos complexos. Em termos dos ligantes, sua capacidade para deslocalizar a densidade eletrônica através do seu sistema π -conjugado deve depender dos grupos substituintes e, em última análise, da acidez dos ligantes de azanaftaleno.

Figura 13. Dependência dos valores de $\Delta\delta$ (ppm) dos hidrogênios dos ligantes 5-aminoisoquinolina (2), 5-bromoisoquinolina (3) e 5-nitroisoquinolina (5) com o pK_a (A) e σ_p (parâmetro de Hammett) (B) e dependência dos valores de δ dos hidrogênios de todos os ligantes azanaftalenos 1-6 com os valores de pK_a (C).

Fonte: adaptado da referência 35.

De acordo com a Figura 13 (à esquerda), os hidrogênios δ e ϵ no complexo **2** apresentam os maiores valores de $\Delta\delta$ porque este complexo contém o ligante 5-nitroisoquinolina, o mais ácido entre os ligantes avaliados. Alternativamente, os hidrogênios δ e ϵ no complexo **5**, que contém o ligante básico 5-aminoisoquinolina, apresentam os valores mais baixos de $\Delta\delta$. A mesma análise pode ser feita do ponto de vista do parâmetro de Hammett: quanto mais positivo for o valor de σ_p , mais retirador de densidade eletrônica é o substituinte no ligante. Novamente, o complexo **2** apresenta os valores mais elevados de $\Delta\delta$, uma vez que contém o substituinte NO_2 . O hidrogênio ζ no segundo anel azanaftaleno não segue esta tendência por estar mais sujeito aos efeitos indutivos do substituinte na posição -para. Estes dados mostram que os núcleos de hidrogênio na periferia dos complexos estão mais sujeitos a sofrer deslocamentos devido à anisotropia paramagnética da unidade $[Ru_3O]^{1+}$ propagada por mecanismo de contato de Fermi quando os ligantes são mais ácidos, ou seja, quando os ligantes possuem substituintes que removem densidade eletrônica e são capazes de estender a deslocalização eletrônica através de seu sistema π -conjugado.

Do ponto de vista dos cálculos de DFT, a análise da estrutura eletrônica de todos os complexos corroborou a ideia de uma unidade $[Ru_3O]^{1+}$ eletronicamente deslocalizada com forte influência do sistema de conjugação- π de ligantes periféricos. As curvas de densidade de spin (Figura 14) revelam um forte acoplamento antiferromagnético no núcleo $[Ru_3O]^{1+}$, confirmando ser correta a atribuição de três íons Ru^{3+} (d^5) que originam um estado fundamental dubleto para a molécula. Esse resultado só foi obtido a partir do uso da

estratégia de abaixamento de simetria de D_{3h} para C_{2v} . As diferenças de energia entre os estados de alto spin (três elétrons desemparelhados) e baixo spin (um elétron desemparelhado em função do acoplamento antiferromagnético) são da ordem de 1000cm^{-1} para todos os complexos. Além disso, embora a densidade de spin esteja localizada principalmente no centro $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$, pode-se verificar que tanto o acetato como os ligantes periféricos têm pequenas contribuições para a densidade de spin global, o que significa que a densidade do elétron desemparelhado é parcialmente deslocalizada sobre ambos os tipos de ligantes. De fato, a análise das sobreposições entre os dois conjuntos de orbitais (spin positivo e spin negativo) mostra que os orbitais magnéticos de todos os complexos são o α -HOMO-1, α -HOMO, β -HOMO e β -LUMO (Figura 15 para o complexo **1**; para os demais complexos verificar figuras S5 a S9 no arquivo CAP1_aSI.pdf). A figura mostra que esses orbitais são deslocalizados, especialmente α -HOMO-1 e α e β -LUMOs e o grau de deslocalização é alto, englobando ambos os anéis dos ligantes periféricos.

Uma análise mais detalhada da estrutura eletrônica de todos os complexos mostra que os orbitais mais importantes envolvidos nas ligações do núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ tem importantes contribuições dos ligantes periféricos (as composições dos orbitais podem ser encontradas nas Tabelas S7-S12 do arquivo CAP1_aSI.pdf) e, em todos os casos, revelam que, para os orbitais ocupados (HOMOs), existe uma forte mistura de contribuições com caráter de Ru e L, especialmente para os orbitais do sistema π . Se tomarmos como exemplo um dos orbitais ligantes e'' do cluster (atribuído tentativamente sob simetria ideal D_{3h}) para os complexos **2**, **3** e **5**, a composição do orbital confirma os dados experimentais descritos acima que mostram que a deslocalização eletrônica é maior para o composto **2**, que contém o substituinte NO_2 no ligante, e menor para **5** que contém o grupo amino, originado a tendência para $\Delta\delta$ observada na Figura 13. Estes orbitais estão representados na Figura 16. Os cálculos confirmam ainda que o grau de mistura entre os orbitais π do núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ e dos ligantes periféricos diminui de **2** para **5**, sendo a contribuição de L para esses orbitais de 66,7, 10,3 e 8,6%, respectivamente (Tabelas S8, S9 e S11, arquivo CAP1_aSI.pdf).

Figura 14. Gráficos de densidade de spin para os complexos 1-6 calculados por DFT (PBE0/def2-TZVP): (azul) densidade de spin positiva; (vermelho) densidade de spin negativa

Fonte: adaptado da referência 35.

Figura 15. Representação dos orbitais de fronteira obtidos a partir de cálculos de DFT (PBE0/def2-TZVP) para o complexo 1.

Fonte: adaptado da referência 35.

Figura 16. Gráficos para um dos orbitais ligantes Kohn-Sham (em simetria D_{3h} ideal) ($E''(\pi)$) obtidos com DFT utilizando PBE0 / def2-TZVP para os complexos (2), (3) e (5).

Fonte: adaptado da referência 35.

Outra evidência de acoplamento eletrônico entre os ligantes auxiliares e a unidade metálica foi a variação regular dos valores de δ com o pKa dos ligantes (Figura 13, à direita). Os hidrogênios α e α' da quinazolina não seguiram a tendência regular porque estão sujeitos ao efeito indutivo do segundo N-heteroátomo do ligante. Além disso, os hidrogênios γ , δ , ϵ e ζ do ligante thiq se deslocam drasticamente para campo mais alto porque estão localizados em um anel saturado e não em um anel aromático. Para os outros núcleos, a tendência geral de deslocamentos para campo mais alto à medida que o pKa dos ligantes aumenta mostra que, embora esses ligantes doem densidade eletrônica através do arcabouço de ligações σ , o aumento da densidade eletrônica do núcleo metálico é parcialmente deslocalizado para os ligantes, elevando sua própria densidade eletrônica e deslocando ligeiramente os valores de δ de seus núcleos de hidrogênio para valores mais elevados. Portanto, além do efeito da anisotropia paramagnética, os hidrogênios nos ligantes são bastante sensíveis à densidade de carga do núcleo metálico e não apenas aos efeitos indutivos dos grupos substituintes. O acoplamento eletrônico entre $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ e os ligantes, em última análise, dita a densidade de carga global, levando a um sistema π -conjugado estendido sobre todo o complexo.

A dependência dos valores de δ dos hidrogênios das metilas dos grupos acetato com o pKa dos ligantes azanaftaleno (Figura 17) mostrou, por sua vez, ser uma excelente sonda para investigar como os ligantes periféricos afetam o esqueleto metálico. Os acetatos estão diretamente ligados aos íons Ru^{3+} , e a densidade eletrônica desses íons é diretamente modulada pela basicidade dos ligantes L. O aumento da densidade eletrônica dos íons

metálicos por σ -doação blindam os grupos metila, diminuindo os valores de seus deslocamentos químicos. Essa tendência tem sido relatada na literatura:^{37, 48} quanto menor o pKa, maiores são os valores de deslocamentos químicos do hidrogênio CH₃. Outra observação interessante diz respeito à semelhança entre os deslocamentos químicos dos sinais das metilas no complexo de isoquinolina (complexo **4**, pKa 5.17) e do análogo piridina (pKa 5.28) [Ru₃O(CH₃COO)₆(py)₃]¹⁺: 4,81 e 4,82 ppm, respectivamente.⁴⁸ O fato de que a basicidade dos ligantes dita a variação nos deslocamentos químicos dos prótons CH₃ mostra que o comportamento da unidade [Ru₃O]¹⁺ é predominantemente ditado pela doação σ de densidade eletrônica dos ligantes azanaftalenos. Enquanto o comportamento dos ligantes é predominantemente influenciado pelo acoplamento eletrônico com o centro metálico através de um π -sistema estendido. Esta tendência também foi observada na investigação do comportamento voltamétrico dos complexos **1-6** (vide infra).

Figura 17. Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios da metila dos acetatos com o pKa dos ligantes azanaftaleno para os complexos 1-6.

Fonte: adaptado da referência 35.

1.2.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de IV dos complexos **1-6** e as atribuições das principais bandas observadas estão disponíveis no material original do respectivo manuscrito³⁵ (Figura S18 e Tabela S14 do arquivo CAP1_aSI.pdf); a Figura 18 apresenta o espectro do complexo **1** como representativo da série. Essas bandas foram atribuídas por comparação com dados de literatura^{28, 26, 43, 56} e com espectros de IV de uma série de unidades trinucleares [M₃O]ⁿ descritas anteriormente.³⁴ Uma vez que o esqueleto dos complexos **1-6** é o mesmo, seus

espectros vibracionais são bastante semelhantes, mesmo no caso dos complexos **2** (5-nitro), **3** (5-briq) e **5** (5-amino), que exibem substituintes na posição 5 do ligante azanaftaleno. As principais bandas atribuídas à vibrações dos ligantes são $\nu(\text{CH})$ em cerca de 3000 cm^{-1} , $\nu(\text{C}=\text{C})$ acima de 1600 cm^{-1} , $\delta_{\text{ip}}(=\text{CH})$ e $\delta_{\text{oop}}(=\text{CH})$ acima de 1400 cm^{-1} .

Figura 18. Espectro vibracional do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6$, obtido a partir de pastilhas de KBr

Fonte: adaptado da referência 35.

Em relação ao esqueleto central $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]$, as bandas de estiramento simétrico e antissimétrico ν_s e $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ do acetato ocorrem em torno de 1427 cm^{-1} e 1625 cm^{-1} , respectivamente. A regularidade dos valores de $\nu_s(\text{COO}^-)$ é notável, enquanto os valores de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ variam consistentemente com a variação de pK_a dos ligantes periféricos (Figura 19).

De fato, $\nu_s(\text{COO}^-)$ quase não varia na série, sendo que a pequena variação está dentro do erro da medida (4 cm^{-1}). Presumivelmente, os valores de $\nu_s(\text{COO}^-)$ não dependem dos efeitos indutivos dos ligantes porque este modo normal de vibração se comporta como uma espécie de simetria A_1 , derivado de orbitais s .^{56b} Estes orbitais do acetato não participam do arcabouço de ligações π do complexo, que de fato transmite a influência dos ligantes periféricos. Por outro lado, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ se comporta como uma espécie de simetria B_1 , isto é, se origina em orbitais p sob simetria σ . Estes orbitais participaram ativamente na coordenação dos acetatos com a unidade metálica, estando então sujeitos a variações na densidade eletrônica do núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Este comportamento

foi recentemente explorado para o caso dos clusters menos simétricos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$ (L = ligante piridínico) que serão discutidos no item 1.3 deste capítulo.³⁷ Verificou-se que, no caso dos carbonilos, a doação de densidade eletrônica para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ por meio de ligantes mais básicos aumenta a magnitude da retrodoação com o ligante CO. Este evento fortalece a ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CO}$, diminuindo a densidade eletrônica dos centros metálicos. O comportamento "push-pull"^x pode ser verificado a partir da variação dos valores de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, que aumentam com o aumento de pKa dos ligantes: ligantes mais básicos, apesar de doarem densidade eletrônica via σ , acabam por promover uma diminuição da densidade de carga na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Como consequência, as ligações $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CH}_3\text{COO}$ se tornam mais fracas e as ligações no próprio grupo COO^- se fortalecem.

Figura 19. Dependência da energia de estiramento de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ no pKa de ligantes de azanaftaleno livres para os complexos 1-6.

Fonte: adaptado da referência 35.

Curiosamente, no caso da série de complexos simétricos **1-6**, a variação na energia da banda $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ é discreta mas consistente, diminuindo com o aumento da basicidade dos ligantes periféricos. Aqui, a ausência de um efeito tal como a retrodoação com o ligante CO para compensar a doação pelos ligantes básicos efetivamente aumenta a densidade eletrônica na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Esse fato fortalece a ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CH}_3\text{COO}$,

^x O termo "push-pull" é muito utilizado na literatura para descrever complexos de rutênio e ferro nos quais ocorre retrodoação. Este termo se refere aos efeitos indutivos dos demais ligantes presentes em um complexo e não ao ligante envolvido na retrodoação. Especificamente, se refere ao efeito de **reforçar** a retrodoação ao invés de compensá-la.

enfraquecendo finalmente as ligações nos ligantes de acetato. A única exceção foi o complexo **1**, cujo valor de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ não seguiu esta tendência. Ainda não temos uma explicação definitiva para essa observação, no entanto recentemente demonstramos que as ligações de hidrogênio intermoleculares no sólido de $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-ampy})_2(\text{CO})]$ envolvendo átomos de oxigênio do acetato foram responsáveis pela redução na energia da vibração $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$.³⁷

1.2.6 Espectroscopia de absorção e voltametria cíclica

Os espectros eletrônicos dos complexos **1-6** são consistentes com os espectros observados para a classe dos compostos simétricos apresentando a unidade oxidada $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, sob simetria ideal D_{3h} .^{28, 41} Na Figura 20 (Tabela 5) é possível observar para todos os complexos a banda larga em torno de 700 nm, atribuída à transição intra-cluster (IC) e uma região de bandas sobrepostas entre 200 nm a 400 nm, que compreende as transições intra-ligante (IL) ou $\pi\text{-}\pi^*$, centradas nos ligantes de azanaftaleno, e as bandas de transferência de carga cluster - ligante (TCCL)). A Figura 20 também mostra a dependência da energia da transição IC com a basicidade dos ligantes azanaftaleno.

Nesta série de compostos, é difícil atribuir com segurança as bandas de transferência de carga pois as bandas $\pi\text{-}\pi^*$ dos ligantes de azanaftaleno encontram-se na mesma região de energia. No entanto, pode-se fazer a seguinte análise: as bandas TCCL devem depender fortemente da natureza dos ligantes, uma vez que envolvem os orbitais $d\pi$ do metal e π^* do ligante. Além disso, os ligantes mais básicos devem aumentar a densidade eletrônica nos níveis metálicos através de σ -doação. Isto foi confirmado pelos cálculos de DFT, em que as energias dos orbitais HOMO se mostraram dependentes do pKa dos ligantes, ainda que estes orbitais tenham caráter predominantemente metálico (Tabela 5). Mesmo que nos nossos cálculos de DFT a simetria D_{3h} não tenha sido reproduzida como compatível com a estrutura de menor energia, o orbital α -LUMO pode ser tentativamente atribuído ao orbital a_2'' previsto para todos os complexos (Figuras S4-S9 do arquivo CAP1_aSI.pdf) com uma contribuição importante do orbital pz da ponte oxo. No entanto, os orbitais HOMO não podem ser atribuídos ao orbital a_2' gerado por CLOA (Figura 10), como sugerido por Cotton em 1972.³⁴

Figura 20. Espectros de absorção dos complexos 1-6 registrados a partir de soluções de acetonitrila (complexos 1, 2, 4-6) ou diclorometano (complexo 3) 10 μ M. Insert: dependência da energia de transição IC com o pKa dos ligantes livres.

Fonte: adaptado da referência 35.

Tabela 5. Dados obtidos a partir dos espectros eletrônicos de absorção na região do UV-visível e dos voltamogramas cíclicos (solução de benzonitrila, 0,1 M TBABF₄) para os complexos 1-6 (1 mM).

	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm); (log ϵ , cm mol ⁻¹ L)					
	(1) qui	(2) 5-nitro	(3) 5-briq ^a	(4) iq	(5) 5-amino	(6) thiq
IL^b	226 (5.08) 264 (4.41)	217 (5.08) 324 (4.42)	230 (5.02) 279 (4.44)	220 (5.21)	206 (4.98) 251 (4.77)	240 (4.33) 283 (4.31)
IL e TCCL^d	350 sh ^c	286 (4.37)	321 (4.20) 361 (4.08)	265 (4.53) 309 (4.30) 345 sh	319 (4.49)	340 sh
IC^e	701 (3.84)	700 (3.88)	697 (3.84)	698 (3.83)	696 (3.86)	693 (3.82)
E_{1/2} (V vs. EPH^f)						
-2/-1	-1.43	^g			^g	
-1/0	-0.91		-0.98	-1.10	-1.13	-1.33
0/+1	0.32	0.30	0.26	0.21	0.16	0.09
+1/+2	1.32	1.28	1.25	1.23		1.24
Energia dos orbitais (a.u.)						
β-LUMO	-0.195	-0.198	-0.190	-0.186	-0.179	-0.181
β-HOMO	-0.294	-0.299	-0.291	-0.286	-0.281	-0.282
pK_a						
	3.66	3.85	4.85	5.17	6.15	7.00

^a Os espectros de absorção foram registrados a partir de soluções de acetonitrila. Apenas no caso do complexo 3 utilizou-se diclorometano ^bIL = transição intra-ligante. ^csh = ombro. ^dTCCL = transição de transferência de carga cluster - ligante. ^eIC = transição intra-cluster. ^fEPH = eletrodo padrão de hidrogênio; os voltamogramas foram registrados a partir de soluções 0,1M de tetrafluoroborato de tetrabutilamônio. ^g no caso dos compostos **2** e **5**, observou-se reações químicas acopladas e/ou processos de eletropolimerização na superfície do eletrodo. Estas observações serão oportunamente investigadas.

Isso pode ser explicado em parte pela suposição original de que a interação com os orbitais dos carboxilatos pode ser negligenciada, resultando em um HOMO com natureza anti-ligante centrado nos metais. Contudo, este não é o caso, uma vez que os resultados de DFT mostram que os orbitais dos carboxilatos contribuem para todos os orbitais moleculares com caráter de metal (Tabelas S12-S17, arquivo CAP1_aSI.pdf). Essa mistura certamente responde pela sensibilidade observada nos valores dos modos normais de vibração dos acetatos com a variação dos ligantes periféricos.

Um resultado experimental importante que corrobora a discussão anterior é a aparente contradição que se origina da interpretação das chamadas bandas IC. Com base no diagrama de orbitais moleculares da Figura 10, essas transições envolvem predominantemente os orbitais $d\pi$ e sua componente de menor energia deve se originar no mesmo HOMO das transições TCCL. Espera-se então que a energia da transição do IC diminua como consequência da σ -doação. No entanto, à medida que a basicidade dos ligantes azanaftaleno aumenta, a energia da banda IC também aumenta, com uma variação discreta, mas consistente da ordem de 165 cm^{-1} (cerca de 8 nm, Figura 20).

Obviamente, a doação de densidade eletrônica via σ a partir dos ligantes azanaftaleno desestabiliza em maior extensão os orbitais d_z^2 dos íons rutênio, que estão envolvidos no arcabouço de ligações σ com os ligantes periféricos e não contribuem para o sistema orbital π . No entanto, todos os orbitais com contribuição na direção z devem ser afetados. Portanto, assumindo o esquema previamente proposto em 1972 e, levando em consideração os resultados de DFT no qual as transições eletrônicas podem ser atribuídas entre os orbitais do conjunto alfa, a tendência observada para a banda IC demonstra que a desestabilização do orbital anti-ligante a_2'' (α -LUMO) decorrente da σ -doação é ligeiramente maior do que a perturbação nos orbitais ocupados, aumentando a energia da transição IC. Essas observações foram corroboradas pelos resultados eletroquímicos que são apresentados a seguir.

A voltametria cíclica é uma técnica importante para estudar o comportamento eletroquímico dos complexos trinucleares de rutênio. Tipicamente, os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}]^n$ simétricos com ligantes N-heterocíclicos^{28, 41} apresentam quatro pares de ondas reversíveis dentro da janela de trabalho de solventes orgânicos comuns, tais como acetonitrila, atribuídos aos processos redox $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{II}} / \text{Ru}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{IV}}\text{Ru}^{\text{III}}\text{Ru}^{\text{III}}$. Além disso, os valores de $E_{1/2}$ destes processos variam de acordo com as propriedades π -aceitadoras e σ -dadoras dos ligantes periféricos.⁴¹ A Figura 21 apresenta os voltamogramas

cíclicos do complexo **3** como um exemplo representativo da série, bem como a dependência dos valores $E_{1/2}$ (Tabela 5) com a basicidade dos ligantes auxiliares.

Figura 21. (Topo) Voltamograma cíclico do complexo 3, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-briq)_3]PF_6$, $[complexo] = 1\text{ mM}$, $[TBABF_4] = 0,1\text{ M}$ em benzonitrila. (fundo) Dependência dos valores $E_{1/2}$ com o pK_a dos ligantes azanaftaleno livres

Fonte: adaptado da referência 35.

Usualmente, os voltamograma de complexos totalmente simétricos com carga formal +1 são analisados considerando que há uma separação regular entre as ondas voltamétricas atribuídas aos processos -1/0, 0/+1 e +1/+2. Isso resultaria da intensa deslocalização eletrônica da unidade $[Ru_3O]^n$, o que concorda qualitativamente com um

composto classe III na classificação Robin-Day.^{51, 57} Isto não é estritamente observado no caso dos análogos de CO e NO. No caso dos carbonilos, a separação entre os processos -1/0 e 0/+1 é maior do que a separação entre os processos 0/+1 e +1/+2. Esse fato mostra que os complexos reduzidos com carga formal zero são as espécies mais estáveis, como resultado da localização da valência e do efeito de retro-doação entre o ligante CO e o íon Ru(II). Para os clusters de NO, a separação entre os processos 0/+1 e +1/+2 é maior do que a separação entre os processos -1/0 e 0/+1. Isto mostra que a espécie +1 é a mais estável, presumivelmente porque a principal interação que mantém a integridade da ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]^+-\text{NO}^0$ é o emparelhamento dos seus elétrons desemparelhados individuais.

Considerando os dados apresentados na Tabela 5 e na Figura 21, os valores $E_{1/2}$ diminuem progressivamente para os complexos **1** - **6** à medida que a basicidade dos ligantes azanaftaleno aumenta. Além disso, a separação entre os processos -1/0, 0/+1 e +1/+2 não é tão regular, sendo praticamente constante em 1 V para as ondas +1/+2 e 0/+1 e variando de 1,23 a 1,42 V para as ondas 0/+1 e -1/0.

De modo geral, verifica-se que quanto maior a basicidade do ligante, mais fácil é a oxidação do centro metálico: os ligantes periféricos doam densidade eletrônica ao núcleo metálico e compensam o estado de oxidação mais elevado. Por outro lado, os ligantes ácidos estabilizam as espécies mais reduzidas. Portanto, o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6$, que tem o ligante mais π -receptor da série, foi o único complexo a alcançar o processo redox -2/-1 na janela de trabalho da benzonitrila.

A comparação destes resultados com as energias dos orbitais de fronteira obtidos na modelagem e a variação observada nos valores da banda IC (Tabela 5) revela que os cálculos DFT reproduzem a tendência experimental. Levando em consideração o teorema de Koopmans e a composição relativa dos níveis de energia (Tabelas S12 – S17, arquivo CAP1_aSI.pdf), as energias dos orbitais β -HOMO e β -LUMO podem ser usadas para obter estimativas aproximadas dos potenciais de ionização e afinidades eletrônicas de todos os complexos. À medida que a basicidade aumenta, a energia β -HOMO aumenta, o que significa que a energia de ionização é menor e, consequentemente, o potencial de oxidação cai. Mesmo que as energias de orbitais LUMO não sejam boas estimativas para afinidades eletrônicas, a mesma tendência geral é observada para elas. As energias dos orbitais β -LUMO aumentam com o pKa dos ligantes, isto é, as afinidades eletrônicas diminuem com uma diminuição concomitante nos potenciais de redução. Vale ressaltar que, embora as energias orbitais sejam diferentes, as diferenças de energia entre β -HOMO e β -LUMO são

essencialmente as mesmas (0.100 ± 0.001 ao), reproduzindo o comportamento experimental em que a separação de pico para os processos $+1/+2$ e $0/+1$ é constante, independentemente da natureza do ligante. Considerando agora o par $0/-1$, o orbital que recebe o elétron nesta redução provavelmente é o α -LUMO, o LUMO espectroscópico envolvido na transição IC. Neste caso, a separação entre as ondas voltamétricas em relação ao par $0/+1$ aumenta, corroborando o aumento da energia de transição do IC já discutido acima.

Além do fato de que os valores $E_{1/2}$ dos complexos **1-6** e análogos piridínicos dependem do pKa de ligantes de maneira muito similar,⁴¹ os valores $E_{1/2}$ do complexo **4** (isoquinolina, Tabela 5) assemelham-se notavelmente aos valores de $E_{1/2}$ do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{py})_3]\text{PF}_6$ (-1,08; 0,19 e 1,21 V vs EPH para os processos $-1/0$, $0/+1$ e $+1/+2$, respectivamente).⁴¹ Os valores de pKa de isoquinolina e da piridina são 5,17 e 5,28, respectivamente. Por conseguinte, estes ligantes exibem basicidade semelhante. A diferença fundamental entre estes ligantes é a maior capacidade do ligante azanaftaleno para deslocalizar a densidade eletrônica através do seu sistema π -conjugado em comparação com a piridina. Nossos resultados demonstram que a σ -doação influencia estritamente os valores de $E_{1/2}$ e que a capacidade dos ligantes periféricos de deslocalizar a densidade eletrônica para a periferia do complexo pouco afeta esses valores.

Para obter mais informações sobre os ligantes azanaftaleno poderem ou não deslocalizar a densidade eletrônica para a periferia dos complexos, a Figura 22 ilustra o monitoramento espectrofotométrico do processo de redução $+1/0$ para o complexo **4**, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_3]\text{PF}_6$. O complexo **4** foi selecionado porque a ausência de um substituinte na estrutura da isoquinolina torna este ligante sensível exclusivamente aos efeitos indutivos da unidade metálica.

As mudanças observadas na Figura 22 são típicas do processo de redução $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+/0}$ dos clusters: a adição de um elétron nos orbitais $d\pi$ aumenta a repulsão inter-eletrônica, produzindo deslocamentos batocrômicos nas bandas TCCL e IC.

No processo de redução $0/-1$, o orbital que seria ocupado é o orbital a_2'' , que tem simetria e orientação corretas para interagir com os orbitais π^* dos ligantes. Portanto, a ocupação desse orbital em processos de redução poderia acarretar variações no máximo de absorção da transição IL (ou $\pi-\pi^*$). No entanto, nossa proposta aqui foi verificar se ocorre alguma perturbação nessa banda em função da capacidade dos ligantes azanaftaleno para deslocalizar a densidade eletrônica a partir do núcleo metálico através de seu sistema

orbital π -conjugado *sem* que ocorra a ocupação orbital direta em um processo de redução 0/-1. Nesse sentido, é conhecido que os processos de redução +1/0 da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ não alteram a banda IL (ou π - π^*) dos ligantes periféricos para uma variedade de análogos piridínicos relatados anteriormente.^{58,59} Porém, no caso do complexo **4**, a redução $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$ deslocou esta banda para o azul. A perturbação da transição π - π^* do ligante isoquinolina é outra evidência espectroscópica do acoplamento eletrônico entre o ligante periférico e o núcleo metálico: o incremento na densidade eletrônica do orbital deslocalizado no ligante aumenta sua energia devido à repulsão inter-eletrônica, deslocando a transição π - π^* para comprimentos de onda mais baixos.

Figura 22. Espectroeletróquímica do processo redutivo +1/0 para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_3]\text{PF}_6$ (0,1 M TBAPF₆, solução de acetonitrila).

Fonte: adaptado da referência 35.

1.2.7 Considerações parciais

Neste item foram apresentadas a síntese e caracterização de seis novos compostos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$, em que $\text{L} =$ (**1**) quinazolina (qui), (**2**) 5-nitroisoquinolina (5-nitroi), (**3**) 5-bromoisoquinolina (5-bri), (**4**) isoquinolina (iq), (**5**) 5-aminoisoquinolina (5-amiq) e (**6**) 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolina (thiq). A estrutura do complexo **1** foi determinada por cristalografia de raios-X e revelou o alto grau de coplanaridade entre o núcleo metálico $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e os três ligantes de quinazolina, que são planares e conjugados. Os dados demonstram que um efeito eletrônico direciona essa conformação preferencial sobre outras possibilidades. Este efeito foi confirmado pelos

resultados de DFT e implica no alto grau de deslocalização da densidade de elétrons para a periferia do complexo através de um sistema- π estendido envolvendo os ligantes e a unidade metálica. Todos os demais dados espectroscópicos e eletroquímicos disponíveis corroboraram esta conclusão.

Tanto quanto no caso de complexos com ligantes piridínicos, demonstrou-se que as diferentes propriedades abordadas neste trabalho correlacionam-se com a basicidade dos ligantes azanaftalenos, como se verifica através das correlações observadas dos dados espectroscópicos e eletroquímicos com os valores de pKa dos ligantes não coordenados. Para racionalizar estas correlações, invocamos a descrição deslocalizada para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ com base em cálculos de DFT de alto nível, levando em consideração a natureza antiferromagnética do sistema. Estes resultados indicaram que o diagrama de orbital molecular clássico está parcialmente incorreto para descrever as características eletrônicas do sistema. Verificou-se que a simetria dos complexos não é D_{3h} e que não se pode negligenciar a mistura orbital entre os centros metálicos e as pontes de acetato. Essa mistura é importante na propagação dos efeitos eletrônicos na estrutura do complexo como um todo.

Os dados de ^1H RMN mostram que os ligantes azanaftaleno com substituintes retiradores de densidade eletrônica são capazes de estender a deslocalização eletrônica através do seu sistema π -conjugado, originando valores de $\Delta\delta$ superiores nesses casos quando se compara os ligantes livres (espécies diamagnéticas) com os ligantes coordenados ao centro metálico paramagnético. Além disso, a dependência dos valores de δ com o pKa dos ligantes demonstrou que a deslocalização- π influencia a densidade eletrônica na periferia dos complexos, enquanto que a doação σ dos ligantes dita a densidade eletrônica sobre o núcleo metálico. As tendências observadas para os dados de espectroscopia eletrônica, vibracional e dados eletroquímicos observados em nossa série confirmam esse comportamento.

Em suma, a σ -doação a partir dos ligantes mais básicos aumenta a densidade eletrônica da unidade metálica. No entanto, parte desta densidade de carga é deslocalizada para a periferia da molécula através de um sistema π -conjugado envolvendo a molécula inteira. Esse fato aumenta a densidade eletrônica nos ligantes periféricos, conforme verificado pelos resultados espectroscópicos, eletroquímicos e teóricos mostrados aqui.

1.3 Revisitando os complexos assimétricos trinucleares de rutênio coordenados a um ligante CO

Uma vez conhecida toda a problemática apresentada no item anterior deste texto sobre a estrutura eletrônica dos clusters simétricos e como essa estrutura é determinante de suas propriedades, nos voltamos à investigação dos clusters menos simétricos, com carga formal 0, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2\text{CO}]$. Novamente, esses compostos são conhecidos na literatura de longa data e sabe-se que suas propriedades são determinadas por influência dos ligantes, como é esperado para compostos de coordenação. Porém, nossa proposta foi a apresentação de dados de caracterização de uma série relativamente grande de compostos que nos permitisse a sistematização de suas propriedades em termos da basicidade ou acidez dos ligantes L e da retrodoação com ligante CO. Além disso, outro aspecto instigante é o excelente contraponto que esta série de complexos nos permite fazer em relação à série apresentada anteriormente. No caso dos carbonilos, os complexos têm simetria de fato mais baixa (C_{2v}) e estes compostos apresentam também uma carga formal mais baixa, contendo um elétron a mais do que os compostos anteriores. Esse um elétron a mais faz com que a espécie seja diamagnética e, mais interessante, é o que permite a coordenação do ligante CO. Uma vez coordenado, o CO promove o que se denomina como “localização da valência”, e os complexos trinucleares carbonilos NÃO são descritos como espécies eletronicamente deslocalizadas.

Posto isto, neste item do texto serão apresentados os dados relativos à série de complexos carbonilos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$, nos quais L = 2,6-dimetilpirazina (dmpz) (1), isonicotinamida (adpy) (2), 4-acetilpiridina (acpy) (3), 3-metilpiridina (3-pic) (4), 4-metilpiridina (4-pic) (5), 4-tert-butilpiridina (4-tbpy) (6), 4-(dimetil)aminopiridina (dmap) (7), e 4-aminopiridina (ampy) (8), Figura 23. Os resultados aqui discutidos correspondem à publicação que consta nos arquivos CAP1_bMS.pdf e CAP1_bSM.pdf.

A síntese de todos os complexos seguiu o procedimento descrito na literatura, com pequenas adaptações quando necessário.²⁶ Esta síntese envolve a reação do precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2(\text{CO})]$ com excesso de ligante (de 2,5 a 3,5), em solução de metanol desaerada por intervalos de tempo que variam de 6 a 10 horas, em temperatura ambiente. Em todos os casos houve a necessidade de purificação dos compostos por cromatografia de adsorção em coluna. Após purificação, obteve-se valores típicos de rendimento e excelentes valores de análise elementar. Tais dados estão apresentados

abaixo de forma resumida. Os complexos **4** e **5** são aqueles descritos nas referências 60 e 45.

Figura 23. Estrutura proposta para os complexos carbonilos trinucleares de rutênio estudados neste trabalho

Fonte: Adaptado da referência 37.

[Ru₃O(CH₃COO)₆(dmpz)₂(CO)].H₂O (1.H₂O). O produto da reação foi purificado em coluna de adsorção de sílica gel, em uma mistura de CH₃OH/CH₃CN/C₂H₄Cl₂ (1/2/8, v/v) como fase móvel. Rendimento 39%. Análise elementar: Calcd: C, 31.9; H, 3.9; N 5.9. Encontrado: C, 31.6; H, 3.9; N, 5.8.

[Ru₃O(CH₃COO)₆(adpy)₂(CO)].CH₃OH (2.CH₃OH). O produto da reação foi purificado em coluna de adsorção de sílica gel, em uma mistura de CH₂Cl₂/CH₃CN (1/1, v/v) como fase móvel. Rendimento: 53%. Análise elementar: Calcd: C, 31.8; H, 3.5; N, 5.7. Encontrado: C, 32.1; H, 3.9; N 5.7.

[Ru₃O(CH₃COO)₆(acpy)₂(CO)] (3). O produto da reação foi purificado em coluna de adsorção de sílica gel, em uma mistura de CH₂Cl₂/CH₃CN (7/3, v/v) como fase móvel. Rendimento: 55%. Análise elementar: Calcd: C, 32.5; H, 3.5; N, 3.0. Encontrado: C, 32.1; H, 3.4; N, 2.9.

[Ru₃O(CH₃COO)₆(tbpv)₂(CO)].H₂O (6.H₂O). O produto da reação foi purificado em coluna de adsorção de sílica gel, em uma mistura de CH₂Cl₂/CH₃CN (9/1, v/v) como fase móvel. Rendimento: 70%. Análise elementar: Calcd: C, 37.5; H, 4.7; N, 2.8. Encontrado: C, 37.1; H, 4.5; N 2.8.

[Ru₃O(CH₃COO)₆(dmap)₂(CO)].C₂H₄Cl₂ (7.C₂H₄Cl₂). Esse complexo foi isolado por filtração após resfriamento do meio reacional e ocorrência de precipitado. Rendimento: 76%. Análise elementar: Calcd: C, 33.3; H, 4.0; N 5.4. Encontrado: C, 33.5; H, 4.1; N, 5.7.

[Ru₃O(CH₃COO)₆(4-ampy)₂(CO)].(8). O produto da reação foi purificado em coluna de adsorção de sílica gel, em uma mistura de CH₃CN/CH₂Cl₂ (3/7, v/v) como fase móvel. Rendimento: 68%. Análise elementar: Calcd: C, 30.9; H, 3.4; N, 6.3. Encontrado: C, 30.9; H, 3.7; N, 6.1.

1.3.1 Estrutura de raios X

Os experimentos de difração de raio-X permitiram determinar a estrutura dos complexos **1**.H₂O, **7**.C₂H₄Cl₂ e **8**. A Figura 24 mostra as estruturas moleculares dos complexos acima mencionados e a Tabela 6 lista uma seleção de distâncias e ângulos de ligação (detalhes sobre os dados cristalográficos podem ser encontrados no arquivo CAP1_bSI.pdf). Pode-se observar que os ângulos de ligação Ru-O-Ru variaram entre 119,1° a 121,7° para os três complexos, fato compatível com a hibridização sp² para o átomo de central de oxigênio. As distâncias entre esse átomo de oxigênio e os átomos de rutênio diferem nos três complexos, sendo em torno de 2,06 Å para Ru(1), mas de cerca de 1,90 Å para Ru(2) e Ru(2a), em **1** e **8**, e Ru(3) em **7**. Estas características estruturais evidenciam a forte influência *trans* do ligante CO, que enfraquece a ligação Ru-O do átomo Ru(1) diretamente ligado ao CO. As distâncias de ligação Ru-Ru envolvendo o átomo Ru(1) são de cerca de 3,42 Å; já as distâncias Ru-Ru envolvendo os outros dois átomos de rutênio são mais curtas, cerca de 3,30 Å. Estes valores mostram que os íons de rutênio nessas estruturas passam a ser distinguíveis, concordando com o estado de oxidação +2 para o íon Ru(1) e o estado de oxidação +3 para os outros dois átomos de rutênio. Essa observação estrutural reforça que neste caso os complexos são descritos como compostos de valência mista e não mais compostos com deslocalização eletrônica.

Como consequência, verifica-se que a geometria do núcleo [Ru₃O]⁰-CO é melhor descrita como um triângulo isósceles do que como um triângulo equilátero.^{36a,61,62,63} A retrodoação entre o íon Ru(II) (Ru(1)) e o ligante CO resulta em uma menor distância da ligação Ru(II)-CO em comparação com as distâncias de ligação Ru(III)-N (valor médio de

1,83 Å e 2,12 Å, respectivamente). Finalmente, a cela unitária do complexo 8 exibe quatro moléculas de complexos espacialmente arranjadas por ligações de hidrogênio formadas entre os átomos de hidrogênio do substituinte amina de um ligante terminal 4-aminopiridina e átomos de oxigênio do carboxilato ou do ligante CO de uma molécula adjacente. (Figura 25).

Figura 24. Estruturas determinadas por difração de raio-X para os complexos (1, dmpz) (A), (7, dmap) (B) e (8, 4-ampy) (C). Os átomos de hidrogênio e as moléculas de solvatação foram omitidos para maior clareza

Fonte: Adaptado da referência 37.

Tabela 6. Alguns valores de distâncias de ligação e ângulos observados para os complexos $[Ru_3O(CH_3COO)_6(dmpz)_2(CO)] \cdot H_2O$ (1. H_2O), $[Ru_3O(CH_3COO)_6(dmap)_2(CO)] \cdot C_2H_4Cl_2$ (7. $C_2H_4Cl_2$) e $[Ru_3O(CH_3COO)_6(4-ampy)_2(CO)]$ (8).

	1. H_2O	7. $C_2H_4Cl_2$	8
distâncias de ligação(Å)			
Ru(1)-O(2)	2.064(6)	2.053(3)	2.062(3)
Ru(2)-O(2)	1.895(3)	1.903(3)	1.899(2)
Ru(2a)-O(2)*; Ru(3)-O(2)**	1.894(3)	1.913(3)	1.899(2)
Ru(1)-C(1)	1.847(12)	1.840(7)	1.809(7)
Ru(2)-N(1)*; Ru(2)-N(1b)**	2.130(5)	2.120(4)	2.122(3)
Ru(1)-Ru(2)***	3.426(1)	3.426(1)	3.416(1)
Ru(2)-Ru(2a)*; Ru(2)-Ru(3)**	3.289(1)	3.314(1)	3.317(1)
ângulos de ligação (°)			
Ru(2)-O(2)-Ru(2a)*; Ru(2)-O(2)-Ru(3)**	120.4(3)	120.6(2)	121.7(2)
Ru(2)-O(2)-Ru(1)	119.8(2)	119.9(2)	119.1(1)
Ru(2a)-O(2)-Ru(1)*; Ru(3)-O(2)-Ru(1)**	119.8(2)	119.5(2)	119.1(1)

*em 1 e 8; **em 7; ***Ru(1)-Ru(2) = Ru(1)-Ru(2a) em 1 e 8; Ru(1)-Ru(2) = Ru(1)-Ru(3) em 7.

Figura 25. Cella unitária para o complexo 8 com o esquema de numeração dos átomos. $N(2) \cdots O(31)^* = 3.132(5)$ Å, $N(2)-H(2A) \cdots O(31)^* = 124,8^\circ$; $N(2) \cdots O(1)** = 3.255(5)$ Å, $N(2)-H(2B) \cdots O(1)** = 179,0^\circ$. Operadores de simetria: $*-x + 5/2, -y + 1, z + 1/2$; $** -x + 2, -y + 1, -z + 2$

Fonte: Adaptado da referência 37.

1.3.2 RMN de ^1H

A Tabela 7 apresenta os valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN dos compostos **1-8**, obtidos a partir de soluções em CD_3CN . A Figura 26 apresenta o espectro do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(4\text{-ampy})_2]$ como representativo da série (os demais espectros de ^1H NMR e COSY estão disponíveis no arquivo CAP1_bSI.pdf). A atribuição dos espectros foi feita por comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H NMR mostrados na Tabela 7 com os deslocamentos químicos dos ligantes livres e de complexos análogos relatados na literatura.²⁸

Figura 26. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{ampy})_2]$ obtido a partir de solução $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ em acetonitrila deuterada

Fonte: Adaptado da referência 37.

Os espectros de RMN de compostos que apresentam a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são sensíveis não apenas à simetria do complexo (D_{3h} para os clusters simétricos e C_{2v} para os clusters assimétricos tais como $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})_2]$), mas também à carga formal da unidade metálica. Complexos $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ possuem um elétron desemparelhado, enquanto que espécies reduzidas como os complexos **1-8** são diamagnéticas.²⁸ Os complexos **1-8** apresentam dois sinais atribuídos às metilas dos acetatos, evidenciando que esses ligantes experimentam diferentes ambientes químicos devido ao abaixamento de simetria D_{3h} para C_{2v} . Os sinais dos ligantes piridínicos coordenados apresentam valores de δ próximos aos

valores observados para os ligantes livres em função do caráter diamagnético destes derivados, nos quais os íons rutênio apresentam estado de oxidação formal Ru(III)Ru(III)Ru(II). Ainda assim, apresentam-se levemente deslocados para valores mais altos de δ em comparação com os ligantes livres. Esse deslocamento para campo mais baixo pode ser atribuído ao efeito indutivo da unidade metálica que, sendo um ácido de Lewis em comparação aos ligantes, pode remover densidade eletrônica dos mesmos.

Na tentativa de racionalizar o comportamento da série, buscou-se traçar correlações entre os valores de deslocamento químico dos diversos núcleos de hidrogênio destes complexos com a basicidade / acidez dos ligantes terminais. No entanto, pode ser difícil observar boas correlações para os sinais de RMN dos ligantes, uma vez que seus hidrogênios experimentam mais intensamente os efeitos indutivos do grupo substituinte do próprio ligante. Já os sinais dos grupos metila dos ligantes acetato são excelentes sondas para discutir a densidade e a localização / deslocalização eletrônica na unidade [Ru₃O].

Tabela 7. Valores de deslocamento químico δ (ppm) e de integração dos sinais de ^1H observados nos espectros de RMN dos complexos 1-8, registrados em soluções de CD_3CN a 298 K

	1, dmpz	2, adpy	3, acpy	4, 3-pic ^a	5, 4-pic	6, tbpy	7, dmap	8, ampy
CH ₃ Ac(a) ^b	2.02, 12H	2.01, 12H	2.00, 12H	1.94, 12H	2.06, 12H	1.96, 12H	2.08, 12H	2.11, 12H
CH ₃ Ac(b)	1.84, 6H	1.80, 6H	1.81, 6H	1.74, 6H	1.79, 6H	1.74, 6H	1.63, 6H	1.58, 6H
H _{ortho} ^c	8.53, 2H	9.20, 2H	9.18, 2H	9.03, 1H	8.98, 2H	9.15, 2H	9.02, 2H	8.94, 2H
H _{ortho'}				9.01, 1H				
H _{meta}		8.44, 2H	8.46, 2H	8.03, 1H	7.83, 2H	8.19, 2H	7.29, 2H	7.29, 2H
H _{para}				8.19				
CH ₃ L ^d	2.63, 6H		2.85, 3H	2.67, 3H	2.85, 3H	1.62, 9H	3.28, 6H	
NH ₂ L ^e		n.o.						5.69
pKa dos ligantes periféricos								
	2.26	3.59	3.60	5.05	5.98	6.14	9.20	9.39

^adados da referência [45]; ^bCH₃(a) se refere ao grupo metila do acetato que se encontra entre um ligante L e o ligante CO; CH₃(b) se refere ao grupo metila do acetato que se encontra entre dois ligantes L; ^cposição *orto*, *meta* e *para* relativas ao átomo N-heterocíclico; ^dCH₃ L se refere ao grupo metila dos ligantes terminais; ^eNH₂ L se refere ao grupo amino dos ligantes terminais.

Conforme discutido no item 1.2.2 deste texto, no que se refere ao sistema π dos clusters, a construção do diagrama de orbitais moleculares negligencia as interações entre os orbitais $d\pi$ e os orbitais dos acetatos.

No entanto, os orbitais $d_{x^2-y^2}$, $d_{x'z'}$ e $d_{y'z'}$ têm simetria adequada para interagir com os acetatos das pontes. Destes, os orbitais $d_{y'z'}$ e $d_{x'z'}$ estão na origem dos orbitais moleculares a_2'' e e'' e dos orbitais moleculares e' e a_2' , respectivamente. Por sua vez, estes dois conjuntos de OM têm simetria apropriada para interagir com o sistema π dos ligantes piridínicos em ambas as orientações (paralela ou perpendicular ao plano da unidade $[Ru_3O]$, respectivamente), proporcionando um caminho para que os grupos acetato sejam sensíveis aos efeitos de variação de densidade eletrônica proporcionada pela variação dos ligantes terminais. Além disso, o orbital $d_{y'z'}$ do íon $Ru(II)$ é aquele que interage com o ligante CO, podendo transmitir variações de densidades eletrônicas oriundas da retro-doação.

Os complexos **1-8** foram então considerados adequados para explorar os efeitos dos ligantes periféricos, tanto piridínicos quanto o CO, já que são espécies com número par de elétrons e não apresentam os efeitos complicadores da anisotropia paramagnética da unidade oxidada $[Ru_3O]^+$. Outro fator a se considerar é que a unidade $[Ru_3O]^+$ é melhor descrita como um centro metálico com deslocalização eletrônica (conforme discutido no item 1.2 deste volume), enquanto que complexos reduzidos contendo ligantes CO e nitrilas têm sido descritos na literatura como unidades com localização de densidade eletrônica. Em outras palavras, são considerados compostos de valência mista.^{36b, 64}

Do ponto de vista da espectroscopia de 1H RMN, Alexiou & Toma mostraram que a unidade $[Ru_3O]^+$ de fato pode ser considerada como um único centro metálico deslocalizado, uma vez que os valores de δ observados para os sinais CH_3 dos acetatos seguem uma tendência ditada por uma “influência *trans*” no caso de complexos oxidados de simetria C_{2v} . Ou seja: ligantes acetato em “*trans*” a ligantes periféricos mais básicos tem a densidade eletrônica de suas metilas aumentada, sendo observados deslocamentos para campos mais altos com o aumento no valor do pK_a dos ligantes piridínicos.⁴⁸ Se os complexos **1-8** também pudessem ser descritos como entidades deslocalizadas, esta influência *trans* deveria resultar em valores de δ menores para os grupos $CH_3(a)$ (grupo CH_3 localizado no acetato “*trans*” a um ligante L) em comparação com os valores δ do grupo $CH_3(b)$ (grupos CH_3 localizado no acetato “*trans*” ao ligante CO), vide Figura 23 ou Figura 26 para verificação das posições CH_3 (a) e (b). Em outras palavras, o grupo metila

do acetato “*trans*” a um ligante piridínico deve estar mais protegido do que o grupo metila de um acetato “*trans*” ao ligante CO. A Tabela 7 e a Figura 27 mostram exatamente o oposto.

Figura 27. Dependência dos valores de δ (ppm) do grupo CH_3 dos acetatos com o pK_a dos ligantes N-heterocíclicos nos complexos 1-8.

Fonte: adaptado da referência 37.

Portanto, considerando agora a descrição localizada para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ (estado de oxidação formal $\text{Ru(III)Ru(III)Ru(II)-CO}$), pode-se analisar duas características: o efeito indutivo do núcleo metálico $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ e a capacidade de doação ou retirada de densidade eletrônica dos ligantes piridínicos e do ligante CO.

O cluster $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{CH}_3\text{OH})_2]$, que não contém ligantes N-heterocíclicos na sua estrutura, é um bom protótipo para abordar a primeira questão. Para esta espécie, o sinal das metilas $\text{CH}_3(\text{b})$ (grupos CH_3 “*trans*” ao ligante CO e coordenado com dois íons Ru(III)) foi observado em 4,88 ppm, enquanto o sinal da metila $\text{CH}_3(\text{a})$ (grupos CH_3 localizados nos acetatos “*trans*” às moléculas de metanol e coordenado a um íon Ru(III) e um íon Ru(II)) foi observado em 4,69 ppm.⁶⁵ Neste caso, os íons Ru(III) são mais ácidos e removem a densidade eletrônica das metilas $\text{CH}_3(\text{b})$, fazendo com que estes sinais ocorram em campo mais baixo do que sinais das metilas $\text{CH}_3(\text{a})$. Estas metilas, por sua vez, encontram-se em acetatos entre íons Ru(III) e (II), tendo sua densidade eletrônica ligeiramente aumentada, sendo deslocadas para campo mais alto.

Essa situação se modifica quando a densidade eletrônica dos íons de Ru(III) passa a ser influenciada pela capacidade de doação de densidade eletrônica de um ligante N-heterocíclico. A dependência dos sinais das metilas dos acetatos com o pKa dos ligantes L (Figura 27) explica esse efeito. O conjunto (b) de acetatos está diretamente ligado aos íons Ru(III), cuja densidade eletrônica é agora modulada pela doação σ dos ligantes L. A densidade eletrônica aumentada nestes íons metálicos blindas essas metilas, abaixando os valores de seus deslocamentos químicos. E mais, a medida que o pKa dos ligantes periféricos aumenta, os valores de δ CH₃(b) na série diminuem, demonstrando que o aumento da basicidade dos ligantes L é reflexo de um aumento em sua capacidade σ -doadora.

Em relação ao conjunto (a) de acetatos, estes se ligam a íons Ru(III) e Ru(II). No entanto, o íon Ru(II) é um centro ácido porque está envolvido em uma forte interação de retrodoação com o ligante CO, o que reduz sua densidade eletrônica e, em última instância, desblinda os grupos CH₃(a). Notavelmente, ao longo da nossa série de ligantes, os valores de δ dos sinais das metilas CH₃(a) aumentam, mostrando que esses hidrogênios ficam menos blindados com o aumento do pKa do ligante. Isso ocorre devido ao fato de que, à medida que os ligantes L doam densidade eletrônica para a unidade [Ru₃O]⁰, a retrodoação com ligante CO é reforçada, desprotegendo os grupos metila do acetato diretamente coordenado ao íon Ru(II) ainda mais. As correlações observadas para os dados de espectroscopia de infravermelho também evidenciam esse fortalecimento (ver abaixo). Este efeito corresponde ao que foi nomeado na literatura como “*push-pull*”, que pode ser grosseiramente traduzido como “empurra – puxa”. Ou seja: o aumento de densidade eletrônica por doação- σ acaba por diminuir globalmente a densidade eletrônica na molécula, uma vez que alimenta e fortalece a retirada de densidade eletrônica pela retrodoação com o ligante CO.

Em resumo, considerando uma descrição localizada para o núcleo [Ru₃O]⁰, o aumentando no pKa dos ligantes L blindas os grupos CH₃(b), enquanto o fragmento {Ru(II)-CO} desblinda a posição CH₃(a). Através dessas observações é possível verificar que os grupos acetato tem um papel fundamental na propagação dos efeitos eletrônicos da unidade [Ru₃O]. Além disso, apesar da localização da valência, as densidades eletrônicas das porções {Ru(III)Ru(III)L₂} e {Ru(II)-CO} são mutuamente afetadas.

1.3.3 Espectroscopia Eletrônica

A Tabela 8 resume os dados de espectroscopia eletrônica coletados para os complexos **1-8** (todos os espectros estão disponíveis no arquivo CAP1_bSI). O espectro de absorção dos clusters assimétricos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$ exibe três bandas principais. A banda larga de baixa energia na região visível, com λ_{max} ao redor de 600 nm refere-se às transições intracluster (IC). A banda em torno de 400 nm corresponde às transições de transferência de carga cluster-ligante (TCCL). E a banda entre 290 e 230 nm refere-se às transições internas dos ligantes aromáticos ($\pi \rightarrow \pi^*$).^{28, 63, 66, 67} Os dados apresentados na Tabela 8 são consistentes com as atribuições mencionadas acima. A Figura 28 apresenta as correlações dos valores de energia das bandas IC e TCCL com o pKa dos ligantes L.

Tabela 8. Dados espectroscópicos coletados para os complexos de 1-8.

λ_{max} (nm) ^a ϵ (mol cm ⁻¹ L ⁻¹)	1, dmpz	2, adpy	3, acpy	4, 3-pic ^b	5, 4-pic	6, tbpy	7, dmap	8, ampy
IC ^c	591	590	588	587	585	586	589	585
	4684	5338	8621	3250	4018	4462	6753	3845
TCCL ^d	386	406	408	327	332	339	394	351
	7288	6963	4986	5640	6202	2322	7657	8778
^e	1, dmpz	2, adpy	3, acpy	4, 3-pic ^b	5, 4-pic	6, tbpy	7, dmap	8, ampy
$\nu(\text{CO})$ (cm ⁻¹)	1945	1947	1940	1939	1943	1948	1927	1920/1940
$\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ (cm ⁻¹)	1609	1603	1608	1607	1610	1613	1611	1605/1617
$\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ (cm ⁻¹)	1569	1566	1569	1572	1570	1574	1579	1575
$\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ (cm ⁻¹)	1420	1421	1420	1420	1420	1421	1423	1420
ϕ CO	1, dmpz	2, adpy	3, acpy	4, 3-pic ^b	5, 4-pic	6, tbpy	7, dmap	8, ampy
^f	0.004	0.004	0.0012	0.0028	0.0042	0.011	0.006	0.011
^g			0.0044			0.024		

^adados registrados a partir de soluções de acetonitrila. ^bdados da referência [45]; ^cIC = transição intra-cluster; ^dTCCL = transição de transferência de carga cluster-ligante; ^edados coletados a partir de pastilhas de KBr; ^ffotólise realizada em soluções de acetonitrila, $\lambda_{\text{exc}} = 377$ nm; ^gfotólise realizada em solução aquosa, tampão fosfato pH = 7.4; o cálculo de ϕ foi feito com base na actinometria química.

De modo geral, a análise da energia das bandas IC deve implicar o efeito da capacidade de doação ou remoção de densidade eletrônica por parte dos ligantes

periféricos nos níveis d_{π} do centro metálico, enquanto a análise da energia das bandas TCCL deve levar em consideração as variações na energia de ambos os níveis $d\pi$ dos metais e π^* dos ligantes. Como pode ser observado na Figura 28, a energia das bandas IC aumenta com o aumento do pKa dos ligantes L. Por outro lado, quando os complexos **1-8** foram considerados como um único grupo, as bandas TCCL não apresentaram nenhuma tendência observável. Para verificar alguma tendência, os ligantes tiveram de ser separados em dois grupos: o grupo dos ligantes mais π -ácidos: ligantes dmpz, adpy e acpy (**1-3**), e o grupo dos ligantes mais básicos: 3-pic, 4-pic, tbpy, dmap e ampy (**4-8**).

Figura 28. Dependência da energia das bandas IC (topo) e de transferência de carga cluster-ligante TCCL com o pKa dos ligantes N-heterocíclicos para os complexos 1-8.

Fonte: Adaptado da referência 37.

Após esta separação, é relativamente fácil explicar o comportamento das bandas de transferência de carga. A basicidade dos ligantes L em **4-8** aumenta a densidade eletrônica nos níveis $d\pi$. A repulsão intereletrônica desestabiliza esses níveis, reduzindo a energia das bandas TCCL. Este efeito intensifica-se com o aumento do poder de doação σ dos ligantes L (Figura 28). Dentro do grupo de ligantes π -ácidos dmpz, adpy e acpy (complexos **1-3**), a remoção da densidade eletrônica abaixa a energia dos níveis metálicos d e aumenta a energia do nível π^* nos ligantes L. Como consequência, a energia das bandas TCCL aumenta proporcionalmente à capacidade retiradora dos ligantes periféricos (baixos valores de pKa). Ou seja, quanto mais retirador π for o ligante L, maior a energia da banda TCCL. Essa observação está de acordo com a tendência observada na parte inferior da Figura 28.

Notavelmente, a energia da transição TCCL no grupo dos ligantes ácidos é menor do que no grupo dos ligantes mais básicos. A presença de substituintes capazes de estender o sistema π desses ligantes, como o segundo N-heteroátomo no ligante dmpz e as funções $-\text{NH}_2\text{-C=O}$ e $-\text{CH}_3\text{-C=O}$ amida e cetona dos ligantes adpy e acpy, diminuem significativamente a energia dos níveis π^* nos ligantes, reduzindo a energia total das bandas de transferência de carga em comparação com os valores observados para o grupo de ligantes σ -doadores.

Em relação às bandas IC, o aumento da energia destas transições é difícil de racionalizar. Novamente, uma descrição localizada para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ tem que ser considerada. Em um trabalho recente, Zhang e colaboradores realizaram cálculos de DFT e propuseram a composição e a ordenação dos níveis de energia para três espécies $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$.⁶⁴ Esses autores mostraram que a descrição deslocalizada se manteve para o cluster tri-substituído com piridina, ou seja: ainda que a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ se encontre reduzida, o fato de os três ligantes serem iguais e não apresentarem nenhum efeito eletrônico especial como a retrodoação, faz com que a unidade metálica apresente um comportamento deslocalizado. Verificou-se que nesse caso, as principais contribuições para os níveis eletrônicos IC vieram do rutênio e das pontes μ -oxo e dos acetatos.

Por outro lado, foi possível distinguir os íons rutênio do cluster assimétrico $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2\text{CO}]$: as porções $\{\text{Ru(II)CO}\}$ e $\{\text{Ru(III)py}\}$ contribuíram independente e fortemente para os níveis de HOMO e LUMO, respectivamente.

Nossos dados experimentais corroboraram essa descrição. Dada a natureza dos níveis HOMO, a forte interação entre o íon Ru(II) e o ligante CO através da retrodoação estabiliza estes HOMOs, aumentando a energia das bandas IC. Além disso, tal como

discutido anteriormente no item sobre ^1H RMN e de acordo com os dados de espectroscopia de infravermelho apresentados a seguir, a capacidade de doação σ dos ligantes periféricos incrementa a retrodoação, aumentando a energia das bandas IC dentro da nossa série de complexos.

1.3.4 Espectroscopia de infravermelho (IV)

Todos os espectros IR dos complexos **1-8**, bem como as atribuições tentativas estão disponíveis no arquivo CAP1_bSI. As atribuições foram baseadas na comparação com os espectros de complexos análogos descritos na literatura e com os espectros dos ligantes livres.^{36b, 68, 69} A Figura 29 ilustra o espectro IV do complexo **8** como representativo da série.

Figura 29. Espectro de infra-vermelho do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2\text{CO}]$ obtido a partir de pastilha de KBr

Fonte: Adaptado da referência 37.

O padrão espectral de infravermelho foi totalmente compatível com os dados da literatura: os espectros apresentam vibrações devidas aos ligantes piridínicos, bem como a banda forte de estiramento $\nu(\text{CO})$ e as vibrações devidas às pontes de acetato (ver Tabela 8 para as frequências mais relevantes na nossa discussão). Conforme observado e discutido anteriormente,⁷⁰ ocorre um desdobramento nas vibrações correspondentes ao estiramento antissimétrico dos grupos acetato $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$, conduzindo a duas regiões típicas em torno de 1610 e 1570 cm^{-1} dentro da série. Esse desdobramento decorre da sensibilidade dessa

vibração à localização de valência e ao campo eletrônico menos simétrico experimentado pela unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ nos clusters carbonílicos.

No caso particular do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{ampy})_2(\text{CO})]$, a característica mais interessante de seu espectro IV é o desdobramento dos picos atribuídos aos estiramentos $\nu(\text{CO})$ e $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ (Figura 29). Segundo nossos dados de raio-X, na cela unitária do complexo é possível verificar a formação de ligações de hidrogênio entre os hidrogênios do grupo amino do ligante 4-ampy e átomos de oxigênio dos ligantes CO/COO^- em moléculas adjacentes (Figura 25). As ligações de hidrogênio presumivelmente enfraquecem as ligações carbono-oxigênio, introduzindo o componente de menor energia nas bandas $\nu(\text{CO})$ e $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ (1920 cm^{-1} e 1605 cm^{-1} , respectivamente, Tabela 8). Curiosamente, o grupo acetato envolvido na rede de ligações de hidrogênio é o grupo ligado em ponte entre os dois íons Ru(III) . Este fato forneceu uma maneira de distinguir entre as vibrações $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ associadas ao grupo acetato ligado em ponte entre dois íons Ru(III) e o grupo acetato ligado em ponte entre um íon Ru(III) e o íon Ru(II) . O espectro de **8**, coletado em solução de diclorometano (arquivo CAP1_bSI), corrobora a hipótese de que é a rede de ligações de hidrogênio que origina o desdobramento dos picos atribuídos aos estiramentos $\nu(\text{CO})$ e $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ no estado sólido: em solução, ambas as vibrações surgem como uma única banda com um máximo definido.

Para complexos mononucleares, geralmente a energia do estiramento $\nu(\text{CO})$ correlaciona-se com o pK_a dos ligantes auxiliares, uma vez que a densidade eletrônica no metal afeta diretamente a magnitude da retrodoação. Altas densidades eletrônicas no centro metálico fortalecem a ligação M-CO , preenchendo o orbital anti-ligante $2\pi\pi^*$ do CO e, conseqüentemente, enfraquecem a ligação C=O . Isso desloca a banda $\nu(\text{CO})$ para frequências mais baixas. Uma vez que o aumento de pK_a dos ligantes L aumenta a densidade eletrônica global da unidade metálica $[\text{Ru}_3\text{O}]$, esta tendência também ocorre ao longo da série **1-8** (Figura 30).

Contudo, para os complexos trinucleares **1-8** esta correlação é pobre, sendo pior do que a correlação verificada para as energias $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ (Figura 30, parte inferior). Na verdade, se usarmos o valor de 1940 cm^{-1} como a frequência do $\nu(\text{CO})$ para o complexo **8** ($\text{L} = \text{ampy}$, linha cheia na Figura 30, topo) a curva de correlação origina um declive ainda menor, mostrando que a sensibilidade da banda $\nu(\text{CO})$ em relação às características dos ligantes periféricos é pequena. Ou seja, além da variação nas frequências $\nu(\text{CO})$ ser apenas uma medida indireta da densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, a descrição localizada da

unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0\text{-CO}$ pode explicar essa observação. Diferentes ligantes L devem afetar menos características como a energia $\nu(\text{CO})$ (que está diretamente relacionada ao íon Ru(II)) do que outros aspectos como as vibrações associadas aos grupos acetato diretamente coordenados aos íons Ru(III) . Além disso, o fato das energias do $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ apresentarem correlações mais bem comportadas com a variação da densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ (modulada pelos ligantes L) mostra, mais uma vez, que deve haver uma contribuição importante dos acetatos na constituição dos níveis π da unidade metálica.

Figura 30. Dependência dos valores dos estiramentos $\nu(\text{CO})$ and $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ com o pKa dos ligantes N-heterocíclicos nos complexos 1-8.

Fonte: Adaptado da referência 37.

Considerando agora a tendência observada para a variação de $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ com o pKa dos ligantes, o efeito “push-pull” se manifesta novamente: o aumento na densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ via doação de densidade eletrônica por parte dos ligantes mais básicos incrementa a intensidade com que o íon $\text{Ru}(\text{II})$ faz a retrodoação com o ligante CO, aumentando a magnitude dessa interação. Esse fato, por sua vez, diminui globalmente a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, enfraquecendo as ligações rutênio-acetato o que acaba por fortalecer as ligações carbono –oxigênio no próprio ligante acetato.

1.3.5 Voltametria cíclica

A Figura 31 traz um voltamograma cíclico do complexo **8** como representativo da série. A Tabela 9 lista a atribuição das ondas redox observadas para todos os complexos (os voltamogramas para os outros complexos estão disponíveis no arquivo CAP1_bSI). No voltamograma da Figura 31 observa-se três pares de ondas atribuídas aos processos $\{\text{Ru}(\text{II})\text{-CO}\}\text{Ru}(\text{II})\text{Ru}(\text{III})$ / $\{\text{Ru}(\text{II})\text{-CO}\}\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})$; $\{\text{Ru}(\text{II})\text{-CO}\}\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})$ / $\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})$ e $\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})$ / $\text{Ru}(\text{IV})\text{Ru}(\text{III})\text{Ru}(\text{III})$ (respectivamente $[\text{Ru}_3\text{O}]^{-1/0}$, $[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/1}$ e $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1/2}$). A localização da valência no íon rutênio coordenado com CO responde pela maior separação das ondas atribuídas aos processos redox $[\text{Ru}_3\text{O}]^{-1/0}$ e $[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/1}$: É mais difícil oxidar o íon $\text{Ru}(\text{II})$ diretamente ligado ao ligante CO, que é fortemente retirador de elétrons.

É conhecido que a natureza dos ligantes axiais L modula o comportamento eletroquímico de complexos trinucleares de rutênio trinuclear.^{28, 41} Na Figura 31 (parte inferior), a influência da natureza básica ou ácida dos ligantes L leva os valores de $E_{1/2}$ a diminuir linearmente com o aumento do pKa dos ligantes N-heterocíclicos. Os ligantes σ -doadores (valores mais elevados de pKa) estabilizaram estados de oxidação mais altos para os centros metálicos, facilitando a sua oxidação. Já os ligantes π -aceitadores (valores de pKa inferiores) favoreceram estados de oxidação inferiores do metal, deslocando as ondas redox para valores mais positivos. Esta relação é direta para os compostos mononucleares e funciona muito bem para compostos trinucleares de rutênio simétricos deslocalizados.⁴¹

Apesar da descrição de valência localizada para os cluster carbonilos assimétricos, esse comportamento voltamétrico foi verificado para os complexos **1-8**. Embora o íon $\text{Ru}(\text{II})$ esteja coordenado ao ligante CO, ele ainda responde à natureza dos ligantes L, conforme discutido anteriormente durante a análise da banda $\nu(\text{CO})$. Além disso, a inclinação da correlação para o processo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/-1}$ é ligeiramente maior que a inclinação

da correlação para os outros dois processos, porque o orbital aceitador do elétron envolvido nessa redução (a_2'' em simetria D_{3h} ou b_1 em simetria C_{2v}) é exatamente o orbital com simetria apropriada para interagir com os orbitais π^* dos ligantes piridínicos. Portanto, este processo redox é mais sensível a características tais como as capacidades σ -dadora ou π -aceitadora dos ligantes L.

Figura 31. (topo) voltamograma cíclico do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(4-ampy)_2]$ (1 mM de complexo, 0,1 M de TBAPF₆ em acetonitrila, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$); (abaixo) Dependência dos valores de $E_{1/2}$ com os valores de pK_a dos ligantes L.

Fonte: Adaptado da referência 37.

Tabela 9. Valores de $E_{1/2}$ observados para os processos redox dos complexos 1-8

	$[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/-1}$	$[\text{Ru}_3\text{O}]^{1/0}$	$[\text{Ru}_3\text{O}]^{2/1}$
1 , dmpz	-0.68	0.69	1.34
2 , adpy	-0.76	0.67	1.32
3 , acpy	-0.68	0.69	1.32
4 , 3-pic ^a	-0.85	0.65	1.27
5 , 4-pic	-0.86	0.65	1.27
6 , tbpy	-0.86	0.66	1.28
7 , dmap	-1.12	0.50	1.10
8 , ampy	-1.10	0.51	1.10

^adados da referência [45]

1.3.6 Fotoreatividade

A fotólise dos complexos **1-8**, em soluções de acetonitrila, foi monitorada através de espectroscopia de absorção. A Figura 32 (topo) mostra como o perfil espectral do complexo **1** muda durante irradiação com $\lambda_{\text{exc}}=377$ nm, 298 K, durante 80 minutos (a fotólise dos outros complexos está disponível no arquivo CAP1_bSI). Observa-se que a banda intra-cluster se intensifica, e uma nova banda surge em 912 nm, gerando dois pontos isobésticos. Estas alterações são consistentes com um equilíbrio químico em solução, a saber: a liberação fotoinduzida da molécula de CO com formação da espécie reduzida $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{S})]$, S = solvente. O perfil espectral do fotoproduto facilita sua identificação, uma vez que exibe a banda larga em torno de 900 nm, atribuída à banda IC em clusters trinucleares reduzidos coordenados a ligantes piridínico e/ou solvente.²⁸

A irradiação de luz na banda de transferência de carga TCCL faz com que o complexo libere a molécula de CO com a transferência de um elétron $d\pi$ da unidade metálica para o orbital π^* do ligante CO. O fato do orbital ligante $p\pi^*$ ser ocupado, diminuiu retrodoação entre o ligante CO e o íon Ru(II). Consequentemente, esta ligação enfraquece, e uma molécula de solvente coordenante (acetonitrila neste caso) substitui o CO sob a ação da luz. Este estado excitado de transferência de carga decai com a

recombinação do elétron, resultando em um cluster trinuclear reduzido como fotoproduto. A irradiação das amostras com luz em 660 nm não promoveu a liberação de CO.

Figura 32. Espectros de absorção coletados a cada 5 minutos durante a fotólise do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CO)(dmpz)_2]$ ($L = dmpz$, $\lambda_{irrad} = 377\text{ nm}$) em soluções de acetonitrila (tempo total de irradiação = 80 minutos) (A); Dependência dos valores de rendimento quântico da liberação fotoinduzida de CO (Φ) com o pKa dos ligantes L (B).

Fonte: Adaptado da referência 37.

Em relação aos rendimentos quânticos (Φ), os valores obtidos para nossa série de complexos (Tabela 8) estão na mesma ordem de grandeza dos valores relatados anteriormente para dois análogos.⁶⁷ A Figura 32 (parte inferior) também mostra como os rendimentos quânticos dependem dos valores de pKa dos ligantes terminais L. Tal como

esperado, esta correlação apresenta desvios importantes da linearidade porque os diferentes grupos funcionais nos ligantes L devem conduzir a diferentes interações de solvatação para os vários complexos. Ainda assim é possível inferir uma tendência de aumento para os valores de Φ com o aumento da basicidade dos ligantes L.

A banda irradiada tem natureza de transferência de carga. Portanto, o estado fundamental é uma espécie neutra, enquanto que o estado excitado fotoativo tem caráter de estado de separação de carga, com densidade de carga negativa no ligante CO e densidade de carga positiva na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^*$. Em outras palavras, o estado excitado simula um complexo trinuclear oxidado. Uma vez que ligantes mais básicos estabilizam as espécies oxidadas (ver a discussão da voltametria cíclica), os ligantes doadores de elétrons favorecem este "estado excitado oxidado" e aumentam os rendimentos quânticos de liberação de CO nestes casos.

Os valores de rendimento quântico obtidos para a fotólise realizada em meio aquoso corroboraram o caráter de "estado excitado oxidado". Escolhemos os complexos **3** e **6** (L = acpy – ligante mais ácido e L = tbpy – ligante mais básico, respectivamente) como modelos para realizar fotólise em meio aquoso, pH fisiológico, em soluções de tampão fosfato. Os valores de Φ aumentaram ao passar do acetonitrila, um solvente menos polar, para o meio aquoso em tampão de fosfato, mais polar (Tabela 8). O meio mais polar deve estabilizar o estado excitado de separação de carga através de interações de solvatação mais favoráveis, o que facilita a liberação de CO.

1.3.7 Considerações Parciais

Sintetizou-se e caracterizou-se uma série de oito acetatos de rutênio trinucleares com fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{CO})]$, onde L = 2,6-dimetilpirazina (dmpz) (**1**), isonicotinamida (adpy) (**2**), 4-acetilpiridina (acpy) (**3**), 3-metilpiridina (3-pic) (**4**), 4-metilpiridina (4-pic) (**5**), 4-tert-butilpiridina (4-tbpy) (**6**), 4-(dimetil)aminopiridina (dmap) (**7**), e 4-aminopiridina (ampy) (**8**), a fim de incrementar os dados disponíveis para os clusters carbonilos trinucleares. Também foi avaliada a fotoreatividade desses complexos. De acordo com dados cristalográficos para o complexo **8**, a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ mantém a geometria típica de triângulos isósceles dos clusters carbonilos. Ao contrário de outros complexos deste tipo, o complexo **8** apresenta célula unitária composta por quatro unidades de cluster arranjadas através de ligações de hidrogênio estabelecidas entre o grupo amina do ligante 4-aminopiridina e átomos de oxigênio dos ligantes CO e acetatos.

Todas as propriedades tratadas neste estudo correlacionam-se bem com a basicidade (ou acidez) dos ligantes periféricos L. Foi possível racionalizar o comportamento desta série de complexos em termos do diagrama de orbitais moleculares qualitativo proposto anteriormente e a descrição eletrônica-localizada da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CO}$. Embora os nossos dados corroborem a descrição de localização de valência, vale a pena mencionar que o fragmento Ru(II)-CO é sensível às características dos ligantes L, como demonstrado pelas medições RMN, IV e voltametria cíclica.

Mais importante ainda, correlacionamos o rendimento quântico da liberação fotoinduzida de CO com as características dos ligantes L e propôs-se um mecanismo para este fenômeno. Além disso, mostramos que a foto-liberação de CO é mais eficiente em tampão fosfato do que em solvente orgânico. Ambas as descobertas permitem um melhor planejamento de sistemas liberadores de CO com base em clusters trinucleares de rutênio.

1.4 Caracterização de um complexo trinuclear de rutênio coordenado ao óxido nítrico

Conforme mencionado anteriormente, há pouquíssimos trabalhos na literatura que tratam da síntese e caracterização de unidades monoméricas discretas de clusters trinucleares de rutênio com ponte $\mu\text{-oxo}$ coordenados a uma molécula de óxido nítrico. Certamente esse fato tem origem na dificuldade de se isolar os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2\text{NO}]\text{PF}_6$ com rendimentos razoáveis e pureza adequada. Há três complexos descritos na literatura, nos quais $\text{L} = \text{piridina}$,^{56a} 4-picolina⁷¹ e 3-picolina.⁴⁵ Esses trabalhos focam a síntese e caracterização dessas espécies e os dados correspondentes à referência 45 serão explorados no próximo item (arquivos CAP1_cMS.pdf e CAP1_cSI.pdf). Além destes complexos, nosso grupo contribuiu com a descrição de outros dois análogos, nos quais $\text{L} = 4\text{-acetilpiridina}$ e 4-tercbutilpiridina, cujos resultados são parte de uma dissertação de mestrado defendida no grupo, mas que ainda não foram publicados.

De modo geral pode-se dizer, em conformidade com o que será discutido abaixo, que o comportamento destas espécies é ditado pela interação dos elétrons desemparelhados da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e do ligante NO^0 . Sendo a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ uma unidade oxidada, contendo um elétron desemparelhado, espera-se que seu comportamento seja similar aos clusters simétricos abordados no item 1.2 deste volume. No entanto, os espectros de EPR destes complexos são silenciosos em todos os casos e mais: os espectros de RMN mostram um perfil intermediário entre aquele observado para a unidade paramagnética $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e a

unidade diamagnética $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ (caso dos carbonilos abordados no item 1.3 deste texto). Esses fatos sinalizam para uma forte interação antiferromagnética entre o elétron desemparelhado da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e o elétron desemparelhado do ligante NO^0 , que atenua o paramagnetismo do centro metálico e sugerem que a mistura orbital entre o ligante NO e o centro metálico é grande. Ainda não há na literatura dados de cristalografia de raio-X de monocristal que nos permitam analisar a geometria e a simetria desses complexos. Além disso, os dados de modelagem molecular disponíveis até o momento, que sugerem uma estrutura eletrônica para essas espécies, não são capazes de explicar a dependência de liberação fotoinduzida de NO com o comprimento de onda de irradiação.

Os cinco complexos mencionados acima (dois da literatura e três do meu grupo de pesquisa) compõem um série a partir da qual tentamos racionalizar o comportamento a partir da correlação de propriedades com as características dos ligantes. No entanto não fomos bem sucedidos até o momento.

Todos esses fatos mostram que ainda não temos uma descrição satisfatória destas espécies que, aparentemente, tem comportamento intermediário entre um cluster oxidado com deslocalização de carga e um cluster reduzido, com localização de carga. Os dados de caracterização descritos a seguir (arquivos CAP1_cMS.pdf e CAP1_cSI.pdf) tornarão este preâmbulo mais claro.

A síntese dos precursores $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ (**2**), $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_3]\text{PF}_6$ (**3**) e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{CO})]$ (**4**) foram realizadas segundo procedimentos de literatura.^{26, 28} O complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ foi purificado em coluna de alumina neutra, eluído com uma mistura 70% CH_3CN : 30% CH_3OH . ESI /MS: $[\mathbf{2} - \text{H}_2\text{O} - \text{PF}_6]^+ m/z$ 860,9; $[\mathbf{3} - \text{PF}_6]^+ m/z$ 953,9 e $[\mathbf{4} + \text{H}^+]^+ m/z$ 889,9.

$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (**1**): 0.35g de $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ foram dissolvidas em 30 mL de diclorometano e a solução resultante foi desaerada por 20 minutos. Em seguida, $\text{NO}_{(\text{g})}$ foi borbulhado nessa solução por 2 horas (gerado a partir da reação de HNO_3 com pastilhas de cobre metálico e passado por uma solução concentrada de NaOH para eliminação de NO_2). Após esse período ocorre a precipitação de um sólido violeta, que foi coletado por filtração, lavado com éter e seco à massa constante em dessecador contendo sílica gel. Rendimento: 92%. Análise elementar: C, 27,8; H, 3,1; N, 4,1; Experimental: C, 26,5; H, 3,4; N, 5,1. ESI /MS: $[\mathbf{1} - \text{PF}_6]^+ m/z$ 890,9.

Figura 33. Estrutura do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]PF_6$ e legenda para atribuição dos espectros de 1H RMN

Fonte: adaptado da referência 45.

1.4.1 Espectroscopia eletrônica, modelagem molecular e medidas eletroquímicas

Os dados coletados a partir dos espectros de absorção dos compostos **1** a **4** são apresentados na Tabela 10. Os compostos **2-4** apresentam comportamento típico, seguindo as características bem descritas dos clusters trinucleares de rutênio.^{25, 26, 28} Mais relevantes para esta discussão são as características do composto **1**.

Tabela 10. Dados de espectroscopia eletrônica (solução de acetonitrila) e de voltametria cíclica (1 mM em acetonitrila 0,1 M TBAPF₆) obtidos a partir de soluções em acetonitrila para os complexos 1 - 4.

Dados de espectroscopia eletrônica	λ_{max} (nm) / log ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)			
	IC	TCCL	TCCL	TCCL
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+(1)$	709/ 2,86*	542/ 3,21	456/ 3,28	372/ 3,39
previsão a partir da modelagem molecular (1)	753	521	460	372
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(H_2O)]^+(2)$	679/ 3,45			312/ 3,76
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_3]^+(3)$	688/ 3,73			313/ 4,05
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(CO)](4)$	587/ 3,51			327/ 3,75
Dados eletroquímicos	$E_{1/2}$ (V vs Ag/ AgCl)			
	$[Ru_3O]^{-1/0}$	$[Ru_3O]^{0/1+}$	$[Ru_3O]^{1+/2+}$	
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]^+(1)$	-0,77	-0,06	1,38	
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(H_2O)]^+(2)$	-1,21	0,039	1,04	
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_3]^+(3)$	-1,31	-0,049	0,98	
$[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(CO)](4)$	-0,85	0,65	1,27	

*no caso do complexo **1**, a transição intra-cluster tem contribuição de níveis do ligante NO, apresentando portanto caráter de transferência de carga.

O espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ é mostrado na Figura 34, sendo consistente com o perfil observado anteriormente para complexos trinucleares de rutênio coordenados com óxido nítrico.^{56a, 71}

Figura 34. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$, registrado a partir de solução 10^{-3} M em acetonitrila

Fonte: adaptado da referência 45.

A descrição clássica da estrutura eletrônica de um complexo trinuclear de rutênio foi feita qualitativamente, em termos do diagrama de orbitais moleculares proposto por Cotton e Norman.³⁴ As considerações feitas na geração deste diagrama contemplam o sistema π da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ sob simetria D_{3h} para complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$ e C_{2v} para complexos assimétricos, tais como o composto **1**. Considera-se que o átomo de oxigênio central apresenta hibridização sp^2 , deixando um orbital p_z de simetria π livre para interagir com os orbitais $d\pi$ dos íons metálicos. Seguindo esta descrição, os espectros eletrônicos dos complexos trinucleares de carga +1 (uma unidade $\text{Ru}_3(\text{III})(\text{III})(\text{III})\text{O}$) são dominados por bandas de transferência de carga cluster-ligante (TCCL) na região UV e visível (abaixo de 400 nm) e uma banda larga de baixa energia denominada transição intra-cluster (IC), em torno de 700 nm, na qual predomina um caráter metálico.^{26, 72, 73}

Embora esta descrição tenha funcionado bem para um número muito grande de compostos,²⁸ ela parece não descrever adequadamente o perfil observado na Figura 34. É bem conhecido que para compostos reduzidos $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$, tanto as transições TCCL como as IC experimentam um grande deslocamento batocrômico, sendo que esta última se desloca

de aproximadamente 700 nm para faixas entre 900 nm a 1100 nm. Contudo, a coordenação de um ligante π -acceptor forte como o CO em um núcleo reduzido $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ promove um deslocamento hipsocrômico da banda IC, que geralmente passa a ocorrer abaixo de 600 nm.^{28, 37, 72} O ligante NO^+ tem um caráter π -acceptor mais forte do que o CO, embora para o NO^0 (nosso caso) o efeito da retrodoação seja atenuado pela presença do elétron π desemparelhado, permitindo a formação de um complexo estável com a unidade oxidada $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$.

O espectro apresentado na Figura 34 não é inteiramente compatível nem com uma unidade oxidada $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ nem com uma unidade reduzida $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$, uma vez que apresenta faixas de absorção dentro de toda a região visível (400 a 800 nm) e nenhuma outra absorção até 1100 nm. Em outras palavras: a transição de menor energia em 709 nm é comparável com as bandas IC de um complexo oxidado e as bandas de transferência de carga centradas em 456 nm e 542 nm estão deslocadas para o vermelho, em regiões típicas de clusters reduzidos. Em trabalhos anteriores, Toma *et. al.* realizaram cálculos de modelagem molecular para os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$ no quais L = piridina ou 4-metilpiridina, mostrando que a contribuição do NO em diferentes níveis de energia do cluster é bastante elevada, particularmente para aqueles níveis envolvendo orbitais d_{xz} e d_{yz} dos íons rutênio.^{56a, 71} Neste contexto, a atribuição usual do espectro eletrônico em termos de TCCL e IC não se aplica estritamente, uma vez que a mistura orbital NO- $[\text{Ru}_3\text{O}]$ é alta, mesmo para os níveis onde predomina o caráter metálico.

No nosso caso, é razoável supor um paralelismo do comportamento espectroscópico do complexo **1** com o do composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ uma vez que o ligante 3-pic é um isômero de posição do ligante 4-pic e presumivelmente não introduzirá uma forte perturbação na estrutura eletrônica do composto **1**.

Isto foi observado em nossos dados de modelagem molecular obtidos através de cálculo semi-empírico, realizado através de uma combinação dos métodos PM3(tm) e ZINDO/S (a estrutura otimizada do complexo **1**, bem como as contribuições relativas dos orbitais $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e NO nos níveis eletrônicos do composto estão disponíveis no arquivo CAP1_cSI.pdf). Como pode ser visto na Tabela 10, as transições teóricas e experimentais apresentam boa concordância. A geometria obtida pelo método PM3(tm) para o composto **1** é equivalente à relatada anteriormente e para todos os complexos a estrutura final é composta por um triângulo planar isósceles para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, com duas ligações Ru- μO equivalentes de 1,905 Å e uma mais longa (2,005 Å), em posição *trans* em relação ao ligante NO. O NO, por sua vez, é linearmente coordenado ao centro metálico. Todos esses

parâmetros estruturais estão de acordo com geometrias experimentais observadas para complexos análogos.²⁸ O alongamento da ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-NO}$ pode estar relacionado com uma forte interação entre este ligante não-inoncente e o íon rutênio, resultando num acoplamento antiferromagnético dos elétrons não emparelhados da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ e do ligante NO^0 , gerando um estado fundamental singlete. Os cálculos ZINDO/S revelaram o mesmo perfil espectral teórico relatado anteriormente, sendo a única diferença o deslocamento das transições, que são deslocadas para o vermelho na ordem: piridina $\sim$ 3-picolina $<$ 4-picolina. A análise da população de Mulliken com base nas funções de onda ZINDO/S revelou que a carga no NO é essencialmente zero (0,02) no complexo, corroborando com a atribuição anterior de NO^0 coordenado para esta classe de clusters com carga formal +1. Embora a análise da população de Mulliken seja conhecida como dependente da base e deva ser usada com cautela, esses resultados qualitativos são indicativos de que o acoplamento eletrônico entre o NO e o centro metálico pode explicar o modo linear de coordenação de NO no cluster, mesmo se o NO ainda for considerado como um ligante de carga formal zero.

Em relação ao comportamento electroquímico dos compostos **1-4**, os dados obtidos a partir de experimentos de voltametria cíclica são apresentados na Tabela 10. Todos os compostos apresentam três pares de ondas atribuídas aos processos redox $\text{Ru(III)Ru(II)Ru(II)}/\text{Ru(III)Ru(III)Ru(II)}/\text{Ru(III)Ru(III)Ru(III)}/\text{Ru(III)Ru(III)Ru(IV)}$. O comportamento eletroquímico é quase reversível, mostrando relações de corrente de pico próximas de 1 e cerca de 70 mV para a separação entre pico anódico e pico catódico. Vale ressaltar o fato de que para os compostos **1** e **4** (nitrosilo e carbonilo, respectivamente) a diferença entre os valores sucessivos de $E_{1/2}$ não é tão regular quanto para os complexos piridínicos.²⁸ No caso do cluster **4**, a forte retrodoação com o ligante CO estabiliza a forma reduzida do cluster ($[\text{Ru}_3\text{O}]^0$), deslocando o valor de $E_{1/2}$ do processo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/1+}$ para valores mais positivos. Poder-se-ia esperar o mesmo comportamento para o cluster **1**, porém a presença do elétron desemparelhado no ligante NO^0 e seu forte acoplamento com o elétron desemparelhado da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ favorece a formação da espécie +1, deslocando o valor de $E_{1/2}$ do processo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/1+}$ para valores mais negativos. Estas observações corroboram a análise feita a partir da espectroscopia UV-visível.

1.4.2 Espectroscopia de Infra-vermelho

Os espectros de infra-vermelho dos complexos **1 - 4** foram atribuídos por comparação com complexos semelhantes anteriormente relatados na literatura,^{28, 56a, 71} e os

valores de $\nu(\text{NO})$ encontram-se na Tabela 11 (os espectros estão disponíveis no arquivo CAP1_cSI.pdf). Para o complexo **1**, o estiramento do NO foi observado em 1883 cm^{-1} . Este pico é bastante simétrico e não é observado no precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$. O valor ocorre dentro do intervalo típico para complexos de nitrosilo com uma coordenação linear M-NO, próxima à frequência vibracional do NO livre (1876 cm^{-1}). Os picos restantes estão associados com as vibrações características do acetato, da picolina e do contra-íon PF_6^- .

Com o objetivo de abordar o efeito dos ligantes periféricos nos espectros de infravermelho dos nitrosilos trinucleares de rutênio, a Tabela 11 também apresenta os valores de frequências $\nu(\text{NO})$ para os poucos complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$ já descritos, em que L são ligantes piridínicos com pKa diferentes. O óxido nítrico coordenado aos íons de rutênio tem geralmente uma banda intensa na região entre 1800 cm^{-1} a 1970 cm^{-1} , cuja frequência depende do estado de oxidação do metal e da estereoquímica da ligação NO com o íon metálico.⁷⁴ É também conhecido que, tipicamente, várias classes de nitrosilo de rutênio apresentam uma correlação entre o valor de $\nu(\text{NO})$ e o valor de pKa dos respectivos co-ligantes. Esta correlação reflete o enfraquecimento da ligação nitrogênio-oxigênio de NO devido ao fortalecimento da retrodoação com o centro metálico que, por sua vez, é influenciada pelo pKa dos co-ligantes.⁷⁵

Tabela 11. Valores de $\nu(\text{NO})$ para complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{NO})]^+$ e valores de pKa dos ligantes L

L	$\nu(\text{NO})\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	pKa	ref
4-acpy	1874	3,51	dados não publicados
py	1865	5,25	56a
3-pic	1883	5,63	este trabalho
4-pic	1874	5,98	71
4-tbpy	1870	6,14	dados não publicados

4-pic=4 metilpiridina; 4-acpy=4-acetilpiridina; 4-tbpy = 4-tercetilpiridina

No caso dos complexos trinucleares de rutênio, esse comportamento típico parece não se manifestar. Observa-se que, mesmo para ligantes com valores de pKa muito diferentes, tais como 4-acetilpiridina e 4-tercetilpiridina, os valores de $\nu(\text{NO})$ não

apresentam qualquer tendência clara de dependência com o pKa dos co-ligantes. Esta observação possivelmente corrobora o fato de que, no caso de complexos trinucleares de rutênio, o comportamento do centro metálico e do ligante NO é mais dependente da forte interação entre as duas unidades através do emparelhamento antiferromagnético entre seus elétrons desemparelhados do que da influência de doação ou retirada de densidade eletrônica por parte dos ligantes periféricos L. No entanto, é importante notar que esta é uma análise preliminar, uma vez que a série de ligantes L explorados até agora ainda é pequena.

1.4.3 ^1H -RMN e EPR

Os espectros de ^1H RMN dos compostos **1** - **4** foram atribuídos por comparação com complexos análogos,^{56a, 71} e com os espectros dos ligantes livres e a partir das correlações observadas nos espectros COSY. Os espectros de RMN estão disponíveis no arquivo CAP1_cSI.pdf e os dados relevantes para a nossa discussão são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Dados obtidos a partir de espectros de ^1H RMN para os compostos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2\text{L}]\text{PF}_6$ ($\text{L} = \text{NO}$ e H_2O , **1 e **2** respectivamente), coletados em soluções aproximadamente 10^{-2} M em acetonitrila deuterada**

δ (ppm)	1	2	3-pic ^[a]	Acetato ^[a]
CH ₃ (a)	3,93 (12H)	4,73 (12H)	-	2,1
CH ₃ (b)	3,25 (6H)	4,83 (6H)	-	2,1
H α	4,32 (2H)	-1,65 (2H)	8,42	-
H α'	4,28 (2H)	-1,65 (2H)	8,44	-
H β	8,04 (2H)	-1,49 (2H)	7,16	-
H γ	5,51 (2H)	5,85 (2H)	7,45	-
H δ	1,78 (6H)	5,88 (6H)	2,32	-

[a] coleção de espectros ^{13}C e ^1H NMR da Aldrich

Conforme discutido anteriormente neste texto nos itens 1.2.4 e 1.3.2, os sinais dos ligantes piridínicos coordenados à unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ são dependentes do estado de oxidação dos íons rutênio. Os complexos reduzidos ($[\text{Ru}_3\text{O}]^0$) com os estados de oxidação formais Ru(III)Ru(III)Ru(II) são diamagnéticos e os sinais dos ligantes coordenados estão

próximos dos valores de deslocamento químico observados para os ligantes livres. Por outro lado, os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ (estados de oxidação formais $\text{Ru(III)Ru(III)Ru(III)}$) têm um elétron desemparelhado, sendo paramagnéticos. Portanto, os sinais de seus ligantes não são apenas sensíveis a efeitos indutivos, mas também ao paramagnetismo da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Tipicamente, para um cluster oxidado como o precursor **2**, os hidrogênios na posição α do ligante piridínico deslocam-se para campo mais alto em relação ao ligante livre e os hidrogênios dos grupos CH_3 dos acetatos exibem deslocamentos para campo mais baixo, compatível com os dados apresentados na Tabela 12. Os deslocamentos nos sinais dos demais núcleos de hidrogênio piridínicos diminuem com a distância, sendo consistentes com o mecanismo de pseudocontato da interação paramagnética. Este comportamento típico expressa o efeito paramagnético da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$.

No entanto, pode-se observar na Tabela 12 que os valores de deslocamento químico observados para os núcleos de hidrogênio no nitrosilo **1**, um complexo que também é paramagnético, a princípio são diferentes dos valores observados para o composto **2**. De fato, o composto **1** exibe valores de δ entre os valores observados para os ligantes livres (espécies diamagnéticas) e os valores observados para os clusters oxidados (espécies paramagnéticas). Este resultado confirma que a interação dos elétrons desemparelhados da unidade metálica e do ligante NO^0 é tão forte que remove parcialmente o efeito da anisotropia paramagnética, promovendo no complexo **1** um comportamento intermediário entre aquele observado para os clusters paramagnéticos (composto **2**, por exemplo) e compostos diamagnéticos, como os ligantes livres.

Na verdade, os espectros de EPR do composto **1**, tanto em estado sólido como em solução de acetonitrila, são silenciosos (arquivo CAP1_cSI.pdf). Isto significa que o composto **1**, apesar de ter dois elétrons desemparelhados, é uma espécie diamagnética, suportando a hipótese de acoplamento antiferromagnético entre o centro $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ e o ligante NO^0 .

1.4.4 Fotólise

A fotólise do nitrosilo **1** foi realizada em solução tampão fosfato, pH 7,4, para simular o ambiente fisiológico e as alterações dos espectros foram monitoradas em função do tempo para diferentes comprimentos de onda de irradiação (377 nm, 447 nm e 660 nm, arquivo CAP1_cSI.pdf). A Figura 35 apresenta o resultado para a irradiação em 532 nm.

Em relação às alterações do perfil espectral, o comportamento do complexo **1** durante a irradiação a 377, 447 e 532 nm é o mesmo, mostrando uma diminuição gradual na banda em 452 nm, um deslocamento batocrômico da transição em 542 nm e a formação de uma banda em 680 nm. O perfil do espectro do fotoproduto é totalmente compatível com o espectro do precursor **2**, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, mostrando que o NO é liberado e substituído por uma molécula de solvente. Observaram-se pontos isosbéticos em torno de 400 nm e 550 nm, com ligeiras variações para cada comprimento de onda de irradiação, indicando que a reação que ocorre durante a fotólise é a mesma para todos os λ_{irrad} . A partir da investigação espectroscópica, aparentemente o NO não pode ser liberado pela irradiação dentro da janela terapêutica ($\lambda_{\text{irrad}} = 660 \text{ nm}$) pois não se observa alteração espectral condizente com a fotosubstituição do NO.

Figura 35. Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ ($5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 7.4$.) em tampão fosfato durante irradiação com comprimento de onda = 532 nm

Fonte: adaptado da referência 45.

De todo modo, o monitoramento espectrofotométrico é uma medida indireta da fotosubstituição do NO, já que monitora a formação do cluster sulfatado. Para realizar a detecção direta de NO, a fotólise foi realizada com irradiação nos mesmos comprimentos de onda, 377, 447, 532 e 660 nm, mas utilizando um eletrodo seletivo para detecção de NO(g). Os cronoamperogramas correspondentes a esta fotólise são apresentados na Figura

36. Imediatamente após a exposição da solução à irradiação laser, o cronoamperograma indicou um aumento substancial da corrente detectada pelo eletrodo seletivo, indicando a produção fotoquímica de NO(g). Estimamos a quantidade de NO(g) liberada pela reação fotoinduzida, utilizando uma curva analítica (disponível no arquivo CAP1_cSI.pdf), e os valores são mostrados na Tabela 13.

Figura 36. Cronoamperograma correspondentes às fotólises do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]PF_6$ obtidos em solução de tampão fosfato (pH = 7,4)

Fonte: Adaptado da referência 45.

Observa-se que em comprimentos de onda inferiores a 450 nm, a liberação de NO é maior. Além disso, a liberação de NO ainda ocorre na região do visível (532 nm), embora com uma eficiência muito menor. Novamente, não conseguimos detectar NO dentro da sensibilidade do experimento amperométrico usando 660 nm como comprimento de onda de irradiação. Essas observações poderiam ser facilmente racionalizadas em termos da irradiação seletiva de transições de transferência de carga (região contemplada pelos comprimentos de onda 377, 447 e 532 nm) e irradiação de uma transição de caráter metálico (660 nm), especialmente porque é o comportamento típico observado para outros nitrosilos de rutênio, que geralmente liberam NO sob irradiação dos estados excitados de transferência de carga.⁷⁶ No entanto, este argumento não deveria aplicar-se inteiramente ao composto **1** se levarmos em conta a mistura orbital elevada entre o NO e a unidade metálica, proposta a partir dos resultados da modelagem molecular. A mistura orbital

ocorre com maior extensão na região do ultravioleta, mas também foi considerada relevante para os níveis de energia mais baixos.^{56a, 71}

Tabela 13. Valores de rendimento quântico e quantidade de NO_(g) liberado (M) a partir do complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂NO] em solução tampão fosfato (pH = 7,4) em diferentes comprimentos de onda de irradiação

λ_{irrad} (nm)	ϕ	[NO] ^[b] (10 ⁻⁶ M)	[NO] ^[c] (10 ⁻¹² M)
377	0,10	2,15	-
447	0,006	2,10	-
532	0,004	0,95	-
660	[a]	-	19
-	-	-	144 ^[c]

[a] os rendimentos quânticos foram calculados com actinometria química; [b] valores obtidos a partir dos cronoamperogramas; [c] obtido a partir do NOA; [d] na presença do redutor ácido ascórbico, [ácido ascórbico] = 45 mM, tampão fosfato 0,01 M.

Portanto, tentamos ainda detectar a liberação de NO por estímulo com $\lambda_{\text{irrad}} = 660$ nm realizando uma experiência no equipamento NOA (Nitric Oxide Analyzer), que detecta NO(g) sob um fluxo de hélio, levando o limite de sensibilidade do experimento para a faixa de 1 picomolar. Desse modo, além da irradiação, também foi possível verificar a liberação de NO(g) na presença de ácido ascórbico, para simular a reação com agentes redutores endógenos. Os resultados são mostrados na Figura 37.

Figura 37. Liberação de NO detectado por NOA a partir do complexo [Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(NO)]PF₆ em solução 5.89 x 10⁻⁵ M em tampão fosfato, pH = 7.4) (A) irradiada em 660 nm; (B) na ausência de luz após reação com solução 45 mM de ácido ascórbico.

Fonte: Adaptado da referência 45.

Verifica-se que o composto **1** de fato libera NO como uma consequência da irradiação dentro da janela terapêutica, embora com menos eficiência do que quando irradiado com luz de maior energia. Observa-se também que a liberação é muito mais pronunciada na presença de um agente redutor tal como o ácido ascórbico. Este fato não é surpreendente, uma vez recentemente meu grupo descreveu a liberação de NO a partir do análogo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{NO}]\text{PF}_6$, desencadeada por uma reação redox com ácido ascórbico.⁴⁴

No composto **1**, formalmente a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$ apresenta carga +1, enquanto o NO coordenado é neutro. Uma possibilidade para explicar a liberação de NO mediada pelo ácido ascórbico, é que o redutor atua sobre a unidade metálica, não sobre o ligante. A implicação aqui é que a redução do estado de oxidação do centro metálico diminui a afinidade do mesmo com o NO^0 coordenado, tanto quanto a redução de um íon NO^+ coordenado diminui a afinidade com um centro metálico em estados de oxidação inferiores.

Apesar de termos calculado a quantidade de NO liberada a partir de diferentes experimentos (Tabela 13), é possível propor uma discussão qualitativa da dependência desses valores com o comprimento de onda de irradiação. A partir da análise espectroscópica, pode-se verificar que todas as transições irradiadas implicam em orbitais moleculares com diferentes graus de contribuição de NO. No entanto, não há uma correlação óbvia entre a natureza desses níveis de energia com os rendimentos quânticos observados, se admitirmos como correto o fato da mistura orbital $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-NO}$ ser grande, inclusive nos níveis da baixa energia correspondentes à banda de absorção acima de 700 nm.

Por outro lado, é conhecido o fato de que a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$ constitui um excelente aceitador final de energia de excitação em diferentes sistemas polinucleares, principalmente porque participa de reações rápidas de transferência de elétrons fotoinduzidas.^{58, 77} Seu decaimento é muito rápido também, uma vez que os níveis IC de baixa energia promovem um caminho muito rápido para decaimento vibracional. No nosso caso, presumivelmente estes níveis de baixa energia estão suprimindo o estado excitado responsável pela liberação do NO, conduzindo ao valor mais baixo de liberação de NO quando a irradiação ocorre em 660 nm.

Finalmente, os valores dos rendimentos quânticos seguem a mesma tendência observada para os valores de quantidade de NO liberado obtidos utilizando o NOmeter e NOA. A saber: para pequenas quantidades de NO liberado, o rendimento quântico também

foi menor. Esse paralelismo mostra que não deve haver uma contribuição importante de reações de recombinação após a fotoindução da liberação de NO. Se houvesse uma taxa significativa de recombinação, a dependência observada da quantidade de NO liberado com λ_{irrad} não seguiria a mesma tendência dos rendimentos quânticos.

1.4.5 Considerações Parciais

Neste item apresentou-se a síntese e a caracterização do novo nitrosilo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e dos compostos **2** - **4** também. As medidas de ^1H RMN mostraram que o complexo **1** exibe um comportamento médio entre um complexo trinuclear reduzido e um complexo trinuclear oxidado. Isto reflete o aumento significativo na densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{1+}$, devido à grande mistura orbital dos níveis metálicos e de NO^0 e a consequente interação entre seus elétrons desemparelhados. A mistura também afeta a frequência de $\nu(\text{NO})$ observada no espectro na região do infravermelho, que não apresenta a típica correlação com os valores de pKa dos ligantes periféricos. A hipótese do acoplamento antiferromagnético é corroborada pelos resultados de EPR. Os resultados da fotólise mostraram que o composto **1** é capaz de libertar NO em pH fisiológico por irradiação com luz visível e, mais interessante, dentro da janela terapêutica (660 nm), ainda que com baixos rendimentos.

Portanto, os resultados de caracterização nos mostram que, em termos comparativos com os sistemas abordados nos itens 1.2 e 1.3, os clusters coordenados ao NO apresentam comportamento intermediário entre uma espécie oxidada com deslocalização eletrônica e uma espécie reduzida com localização eletrônica. No entanto, a estrutura eletrônica descrita até o momento para essa classe de compostos não é totalmente adequada para descrever essas observações, principalmente se tentarmos correlacionar a dependência da fotoliberação de NO com a natureza dos diferentes níveis eletrônicos irradiados. Até o momento não encontramos na literatura nem tão pouco fomos capazes de obter monocristais que permitissem a elucidação estrutural desses nitrosilos. Certamente a determinação experimental da simetria desses compostos é ponto fundamental na descrição de sua estrutura eletrônica.

1.5 Atividade biológica de alguns complexos trinucleares de rutênio e suas interações com albumina do soro humano

1.5.1 Citotoxicidade *in vitro* contra célula de melanoma do cluster $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{NO}]\text{PF}_6$

A proposta deste trabalho (que cronologicamente foi realizado em meu laboratório antes do trabalho descrito no item acima) foi a verificação da viabilidade de se utilizar um cluster trinuclear de rutênio para algum fim biológico. Nesse caso em particular, queríamos verificar se os clusters seriam liberadores de NO viáveis para fins terapêuticos, principalmente como quimioterápico para câncer. Como o objetivo era bastante específico, utilizamos para a realização de testes de citotoxicidade em relação às células de melanoma murino o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{NO}]\text{PF}_6$ (**1**), já descrito na literatura.⁷¹ Os dados apresentados neste item referem-se aos arquivos CAP1_dMS.pdf e CAP1_dSI.pdf.

Pesquisas já demonstraram que o câncer é uma das maiores causas de mortalidade mundial, superando outras enfermidades como doenças infecciosas e cardiovasculares. Estima-se que em 2030 o câncer poderá causar a morte de 17 milhões de pessoas.⁷⁸ O câncer geralmente está associado às alterações gênicas (alteração na sequência das bases do DNA) ou epigenéticas (alterações na estrutura do DNA, como uma metilação, sem alterar a sequência das bases nitrogenadas) em um organismo, e células antes normais começam a proliferar-se de maneira desordenada, com perda da diferenciação celular em função de problemas na expressão gênica.⁷⁹ Estas novas células neoplásicas são as principais células de um tumor.⁸⁰ De modo geral, três fatores respondem pelas mutações: radiações que fragmentam cromossomos, vírus que introduzem sequências modificadas de DNA nas células e genes que ocasionam alterações na sequência do DNA original.⁸¹

No que diz respeito aos tratamentos disponíveis, utilizam-se métodos clássicos como a remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e quimioterapia, sendo que nenhum destes apresenta 100% de eficácia na cura da doença e, na maioria dos casos, ocasionam efeitos colaterais e danos às células sadias dos pacientes.⁸² Neste contexto, ainda é necessário o desenvolvimento de alternativas aos medicamentos usuais, visando o desenvolvimento de compostos com maior seletividade às células não sadias e menores efeitos tóxicos sistêmicos, que são comuns quando o alvo do agente terapêutico é o DNA. Nesse contexto, já foi explorado no Preâmbulo deste texto, que uma alternativa bastante interessante para o tratamento de cânceres superficiais como o melanoma é o uso de fotosensibilizadores em TFD. Neste caso encaixam-se complexos como o estudado neste

item do texto. De modo geral, as moléculas fotosensibilizadores atuam como pró-fármacos que, sob ação da luz, geram ou liberam as espécies químicas que efetivamente irão atuar no câncer.

No trabalho que originalmente descreveu o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{NO}]\text{PF}_6$ (referência 71), a fotoliberação de NO foi investigada em dois comprimentos de onda abaixo de 500 nm, a partir de irradiação com fonte de luz contínua e uso de monocromador. No presente trabalho, a fotólise do composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2\text{NO}]\text{PF}_6$ (em soluções de acetonitrila, espectros disponíveis no arquivo CAP1_dSI.pdf) foi refeita, mas agora utilizando diferentes linhas laser, a fim de avaliar as contribuições das diferentes transições presentes no espectro do cluster (Figura 38).

Figura 38. (A) Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (4-pic = 4-metilpiridina) e seu espectro eletrônico em solução de acetonitrila

Fonte: adaptado da referência 44.

Para três comprimentos de onda de irradiação diferentes, 377 nm, 447 nm e 532 nm, o complexo apresenta o mesmo comportamento: a banda em 451 nm, normalmente atribuída a uma banda de transferência de carga cluster-ligante (TCCL), desaparece. Já as bandas em 551 nm e 690 nm (TCCL e intra - cluster IC, respectivamente) se deslocam, originando um perfil de espectro típico das espécies solvatadas $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{CH}_3\text{OH})]\text{PF}_6$ (**2**). Esta observação confirma que o composto **1** é um liberador de NO eficiente por irradiação com luz UV e, mais interessante, com luz visível. No entanto, a sua irradiação a 660 nm (uma região onde predominam as transições de IC), não conduz a alterações perceptíveis em seu espectro eletrônico, mostrando que o NO não é liberado com eficiência por irradiação com uma luz de energia mais baixa.

Uma vez determinado que o complexo **1** libera NO na região do visível, realizou-se outra fotólise com irradiação em 532 nm, contudo a partir de uma solução tampão fosfato para simular o meio de cultura celular (para detalhes ver arquivo CAP1_dSI.pdf). A medição amperométrica, que detecta diretamente a formação de NO_(g), mostrou que a liberação também é eficiente em meio aquoso, pH = 7,0.

A atividade citotóxica *in vitro* dos compostos **1** e **2** em relação à linhagem celular B16F10 (melanoma murino) foi avaliada por curvas dose-resposta utilizando o método colorimétrico clássico do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]).⁸³ Então, 10⁴ células foram incubadas durante 24 h em placa para cultura de células de 96 poços. Após este período de incubação, o composto foi adicionado dentro da faixa de concentrações de 1,95 µM a 62,5 µM. As células foram incubadas durante 3 h a 37 ° C e os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos na presença (para **1**) e ausência de luz (para **1** e **2**). A viabilidade celular foi expressa como uma porcentagem dos valores de absorção em células tratadas em comparação com as células não tratadas (controle). Os dados são apresentados como média ± erro padrão de culturas em triplicata.^{83c} Os resultados estão apresentados na Figura 39 e mostram que a viabilidade celular foi reduzida em 90% quando o cluster **1** foi irradiado em 532 nm.

No entanto, também foi observado 60% de morte celular na ausência de luz, o que poderia ser atribuído a uma liberação de NO mediada por uma reação redox do cluster no meio celular. Para testar a viabilidade desta hipótese, foi verificado com sensor amperométrico se ocorreria ou não liberação de NO após a adição do agente redutor ácido ascórbico, em solução tampão (Figura 40). Uma quantidade significativa de NO foi detectada a partir dessa reação, permitindo inferir que o cluster nitrosilo pode ser reduzido no ambiente celular, liberando NO. Considerando o fato de que o produto mais provável dessa redução seja um cluster solvatado como o [Ru₃O(CH₃COO)₆(4-pic)₂(solvente)]ⁿ, a mesma avaliação *in vitro* foi realizada utilizando o composto modelo **2** para testar se este composto pode ser citotóxico para a linhagem celular de melanoma murino B16F10. Verificou-se que não houve diminuição significativa da viabilidade celular (Figura 40), o que sugere que o NO é a espécie ativa relacionada com a morte celular e que o mesmo pode ser liberado através de estímulo redutivo e / ou fotoindução.

Figura 39. Efeito citotóxico do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(4-pic)_2(NO)]PF_6$ em linhagem de melanoma murino(B16F10) irradiada em $\lambda = 532\text{ nm}$ e não irradiada; incubação por um período de 3 h com várias concentrações do nitrosilo (resultados obtidos a partir do teste MTT, $n = 3$).

Fonte: adaptado da referência 44.

Figura 40. (A) Liberação de óxido nítrico em tampão fosfato a partir do nitrosilo e adição de ácido ascórbico (medida feita no escuro); (B) Efeito citotóxico do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(4-pic)_2(CH_3OH)]PF_6$ em células de melanoma murino B16F10, incubadas com soluções em várias concentrações do cluster por 3h

Fonte: Adaptado da referência 44.

Em resumo, os dados apresentados mostram que o cluster $[Ru_3O(CH_3COO)_6(4-pic)_2NO]PF_6$ diminui notavelmente a viabilidade das células de melanoma murino B16F10 quando irradiado com luz visível, embora alguma atividade também seja observada no escuro. Os experimentos controle mostram que o óxido nítrico é a espécie ativa real, uma vez que pode ser liberado mesmo no escuro por uma reação de redução. A espécie solvatada $[Ru_3O(CH_3COO)_6(4-pic)_2(CH_3OH)]PF_6$ não mostrou citotoxicidade para esta linhagem celular. Vale ressaltar que a liberação de NO no escuro pode resultar num efeito sinérgico com a liberação fotoinduzida, aumentando os efeitos desejados. Além disso, a

liberação de NO no escuro abre a possibilidade de utilizar estes compostos na terapia de outros tipos de câncer que não aqueles superficiais, como o melanoma. Portanto, os dados mostraram que o cluster **1** é um potencial agente anticâncer, atuando como um pró-fármaco liberador de óxido nítrico.

1.5.2 Interação dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{L})]\text{PF}_6$ no quais $\text{L} = \text{NO}$ ou H_2O com albumina do soro humano

Os resultados apresentados neste item tratam da interação dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ com a albumina do soro humano, a HSA. A investigação do aquo-complexo também foi realizada porque este constitui o produto mais provável da liberação de NO. Este trabalho foi o primeiro relato sobre a investigação da interação com albumina pelo método de Stern-Volmer aplicado aos complexos trinucleares de rutênio.⁴⁶ Os dados completos encontram-se no arquivo CAP1_eMS.pdf. A síntese de ambos os complexos foi descrita anteriormente pelo nosso grupo na referência 45, arquivo CAP1_cMS.pdf.

Figura 41. Estrutura dos complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$

Fonte: adaptado da referência 46.

Quando se pretende estudar complexos como candidatos em potencial a metalo-fármacos, um aspecto que deve ser investigado diz respeito à interação desses candidatos com bio-alvos. A albumina do soro humano (HSA), a proteína plasmática mais abundante, tem sido utilizada extensivamente na literatura como modelo para investigações dessa natureza, pois permite inferir a possibilidade de um determinado composto químico ser transportado e armazenado eficientemente no corpo.¹⁷

A atuação eficaz e o metabolismo de fármacos no organismo são dependentes da afinidade dos mesmos com a HSA. Essa proteína é um dos alvos preferenciais de complexos de rutênio, que podem se ligar à macromolécula por meio do imidazol do resíduo de histidina.^{84, 85} Os resíduos de aminoácido têm sido reconhecidos como os principais sítios de ligação em meio biológico, especialmente para metais. Portanto, estudar sua reatividade com candidatos à metalo-fármacos é fundamental como modelo para o entendimento das possíveis reações e modos de coordenação de derivados metálicos com biomoléculas.⁸⁶

A estrutura da HSA apresenta regiões preferenciais para a ligação de fármacos. Essas regiões são classificadas em três domínios similares (I, II e III), e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B. As regiões responsáveis pelo armazenamento dos compostos nas albuminas estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, e são conhecidas como sítios I e II de Sudlow⁸⁷.

Figura 42. Estrutura da HSA

Fonte: imagem de domínio público coletada na internet.

A HSA está presente nas mais variadas formas de vida⁸⁸ e, nos mamíferos, é sintetizada no fígado, apresentando um tempo de meia-vida de 19 dias.⁸⁹ Esta biomolécula é responsável pelo controle da pressão osmótica e está implicada no metabolismo, distribuição e transporte de várias substâncias endógenas e exógenas, como por exemplo ácidos graxos, hormônios, drogas, metais essenciais e quimioterápicos. Esta proteína também está envolvida em outras funções essenciais, como o sequestro de radicais livres de oxigênio e a inativação de vários metabólitos tóxicos.^{89, 90}

É extensivamente conhecido na literatura que a fluorescência da molécula HSA é em grande parte devido à presença do resíduo de triptofano e, em menor extensão devido à

tirosina, dependendo do comprimento de onda de excitação.⁹¹ A intensidade de fluorescência diminui quando certos substratos são adicionados a uma solução de HSA, de modo que a espectroscopia de fluorescência é amplamente utilizada para investigar a interação entre a proteína e outras moléculas.⁹²

Já o comportamento fotoquímico dos clusters trinucleares de rutênio coordenados a um ligante NO foi recentemente descrito por nosso grupo.^{44, 45} Embora os nitrosilos sejam termicamente estáveis, em solução e na presença de luz, a substituição de NO por uma molécula de solvente pode ocorrer. Conhecendo então a fotoreatividade do complexo nitrosilo, foi realizada uma experiência controle na qual o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ foi incubado com uma solução de HSA em tampão fosfato (pH = 7,4) para verificar, durante um determinado intervalo de tempo e na presença de luz ambiente e de albumina, se é o nitrosilo ou o complexo aquo que realmente interage com a proteína (Figura 43). Como pode ser verificado, a diminuição da intensidade da banda em 452 nm e o aparecimento de uma banda em torno de 680 nm indica a perda parcial do ligante NO, com a geração do aquo-complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$, que apresenta uma banda em 679 nm (inserto da Figura 43).

Figura 43. Acompanhamento espectrofotométrico ($\lambda = 432 \text{ nm}$) de uma solução em tampão fosfato do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ ($5.37 \times 10^{-6} \text{ M}$) incubado com HSA ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) a 303K.

Fonte: Adaptado da referência 46.

A partir dos gráficos da Figura 43, calculou-se que a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para a aquação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ na presença de HSA é $k_{\text{obs}} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e o $\tau_{1/2} = 85$ minutos. Destes resultados, determinou-se que uma incubação de 5 minutos do composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$

$\text{pic})_2(\text{NO})\text{PF}_6$ com HSA garante que praticamente apenas o nitrosilo está presente em solução. Por outro lado, um período de incubação de 120 minutos leva-nos predominantemente à análise da interação da espécie aquo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ com HSA.

Posto isto, a Figura 44 mostra que, para ambos os tempos de incubação, a intensidade de fluorescência de HSA diminui quando a concentração do complexo em solução aumenta.

Figura 44. Espectros de fluorescência da HSA na presença do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (A) com 5 minutos de incubação ($[\text{supressor}] = 0$; 2,57; 5,15; 7,70; 10,2; 12,8; 15,4; 17,9; 20,5; 23,1 $\times 10^{-6}$ M); (B) com 120 minutos de incubação ($[\text{supressor}] = 0$; 3,08; 6,16; 9,24; 12,3; 15,4; 18,5 $\times 10^{-6}$ M). Os experimentos foram realizados a 303 K, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, tampão fosfato.

Fonte: Adaptado da referência 46.

A supressão de fluorescência pode ocorrer por dois tipos de mecanismos: o estático e / ou o dinâmico. Quando o mecanismo de supressão dinâmica predomina, a interação entre o supressor e o estado excitado do fluoróforo ocorre através de colisões durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, e o processo tem controle difusional. Por outro lado, quando o mecanismo é estático, a interação entre o fluoróforo e o supressor ocorre no estado fundamental, com a formação de uma nova espécie que não é luminescente.^{92c, 93} A equação de Stern-Volmer é amplamente utilizada para inferir o tipo de mecanismo de supressão analisando a relação F_0 / F a diferentes temperaturas:

$$F_0 / F = K_{\text{SV}}[Q] + 1$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de supressor, respectivamente, K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do supressor. Quando o mecanismo é dinâmico, K_{SV} pode ser substituído pelo termo $\tau_0 k_q$, onde k_q é a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida médio do fluoróforo na ausência de supressor ($\sim 10^{-8}$ s).⁹⁴ A Figura 45 apresenta os gráficos de Stern-Volmer para a interação da HSA com os dois compostos sob investigação neste trabalho. Os valores de K_{SV} foram determinados a partir das inclinações desses gráficos. Em seguida, os valores de k_q foram calculados utilizando a de Stern-Volmer (Tabela 14).

Figura 45. Gráficos de Stern–Volmer para (A) HSA–[Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(NO)]PF₆ e (B) HSA–[Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(H₂O)]PF₆ em diferentes temperaturas, $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Fonte: Adaptado da referência 46

Tabela 14. Constantes de Stern-Volmer obtidas para os sistemas HSA–[Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(NO)]PF₆ e HSA–[Ru₃O(CH₃COO)₆(3-pic)₂(H₂O)]PF₆

HSA–[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (3-pic) ₂ (NO)]PF ₆				HSA–[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (3-pic) ₂ (H ₂ O)]PF ₆		
$T(K)$	$K_{SV} (10^4 M^{-1})$	$k_q (10^{12} M^{-1} s^{-1})$	R	$K_{SV} (10^4 M^{-1})$	$k_q (10^{12} M^{-1} s^{-1})$	R
298	3.67	3.67	0.999	4.67	4.67	0.996
303	4.29	4.29	0.996	5.18	5.18	0.998
308	6.30	6.30	0.998	5.31	5.31	0.998
$T(K)$	$K_b (10^3 M^{-1})$	n	R	$K_b (10^3 M^{-1})$	n	R
298	10.48	0.95	0.999	12.88	0.86	0.995
303	15.55	0.91	0.997	8.71	0.82	0.996
308	178.44	1.08	0.997	4.78	0.77	0.991
$T(K)$	$\Delta H (kJ mol^{-1})$	$\Delta S (J mol^{-1} K^{-1})$	$\Delta G (kJ mol^{-1})$	$\Delta H (kJ mol^{-1})$	$\Delta S (J mol^{-1} K^{-1})$	$\Delta G (kJ mol^{-1})$
298			-22.94			-6.34
303	215	796	-24.32	-75.5	-231	-5.44
308			-30.96			-3.99

Com base exclusivamente na análise dos gráficos de Stern-Volmer (boa linearidade) e na dependência de K_{SV} com a temperatura, pode-se inferir que apenas um mecanismo de supressão esteja presente. Para o nitrosilo, o mecanismo de supressão deve ser dinâmico, uma vez que os valores de K_{SV} aumentam com o aumento da temperatura na presença do complexo. Para o composto aquo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(H_2O)]PF_6$, os valores de K_{SV} seguem a mesma tendência, embora aumentem menos do que para o nitrosilo. No entanto, os valores de k_q são maiores do que a constante de difusão média de pequenas moléculas (supressor) em solução aquosa ($2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$), o que caracteriza a contribuição do mecanismo de supressão estático.

Portanto, apesar da linearidade observada para os gráficos de Stern-Volmer, a análise de K_{SV} e k_q sugere a ocorrência de ambos os tipos de mecanismos de supressão. Especialmente no caso do complexo aquo, para o qual o K_{SV} aumenta menos com a temperatura, a ocorrência de interações fortes no estado fundamental é bastante provável, levando em conta que a presença de uma molécula de solvente lábil em sua estrutura pode proporcionar um sítio de coordenação livre para interagir com os resíduos de aminoácidos disponíveis na proteína.

Posto que o mecanismo estático também contribui para a supressão da HSA, foram determinados os valores das constantes de ligação dos complexos com a HSA. A constante de ligação (K_b) e estequiometria da reação (n) são calculadas utilizando a equação de Stern-Volmer modificada:

$$\log (F_0 - F) / F = \log K_b + n \log [Q]$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor respectivamente, K_b é a constante de ligação e n equivale à estequiometria da reação. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de constante de ligação (K_b) e estequiometria da interação para os sistemas $HSA-[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]PF_6$ e $HSA-[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(H_2O)]PF_6$ em diferentes temperaturas

T(K)	HSA- $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(NO)]PF_6$			HSA- $[Ru_3O(CH_3COO)_6(3-pic)_2(H_2O)]PF_6$		
	$K_b (10^3 M^{-1})$	n	R	$K_b (10^3 M^{-1})$	n	R
298	10.48	0.95	0.999	12.88	0.86	0.995
303	15.55	0.91	0.997	8.71	0.82	0.996
308	178.44	1.08	0.997	4.78	0.77	0.991

A análise dos valores de K_b é bastante útil para inferir como uma espécie molecular, particularmente uma droga, será distribuída no plasma sanguíneo. Em geral, valores mais baixos de K_b significam que a interação entre o fármaco e uma determinada proteína de transporte é fraca, conduzindo a uma má distribuição no plasma. Por outro lado, altos valores de K_b levam a uma diminuição na concentração de fármaco livre no plasma, uma vez que a interação com a proteína é mais forte.⁹⁵ Os valores de K_b relativamente altos ($\sim 10^3$ M) obtidos sugerem que existe uma forte interação entre os complexos e a HSA, mostrando que o componente estático deve ser significativo. Além disso, observa-se que a constante de ligação para o sistema HSA - $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ aumenta com o aumento da temperatura, o que suporta ainda a contribuição do mecanismo de extinção estática, uma vez que neste caso a estabilidade da espécie associada proteína-complexo aumenta com o aumento da temperatura. Vale notar ainda que existe um aumento significativo no valor de K_b para o nitrosilo a 308 K, o que implica que este complexo pode ser armazenado e transportado eficientemente no corpo pela HSA.

Já para o sistema HSA / $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$, os valores de K_b diminuem com o aumento das temperaturas, o que prejudica a capacidade da HSA de armazenar e transportar o complexo aquo a uma temperatura mais próxima à temperatura do corpo. Também é observado na Tabela 15 que a estequiometria da reação é próxima de 1 em todos os casos, sugerindo a presença de um único sítio de ligação para os complexos na molécula HSA.

Em termos da natureza das possíveis interações entre os complexos e a macromolécula, basicamente observam-se quatro tipos: hidrofóbica, ligação de hidrogênio, van der Waals e interações eletrostáticas.⁹⁶ Os valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) podem ser determinados a partir da equação de van't Hoff:

$$\ln K_b = -\Delta H / RT + \Delta S / R$$

onde K_b é a constante de ligação a uma temperatura T e R é a constante do gás. Os valores de ΔH e ΔS são calculados a partir dos valores de inclinação e intercepto do gráfico de $\ln K_b$ em relação a $1 / T$ (Figura 46). Em seguida, os valores de ΔG são determinados a partir da equação:

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

Figura 46. Gráficos de Van't Hoff para os sistemas (A) $\text{HSA}-[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e (B) $\text{HSA}-[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$

Fonte: Adaptado da referência 46

Sabemos que os parâmetros termodinâmicos são dependentes da temperatura. Mudanças na energia livre (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) são usadas para caracterizar as forças de interação ou tipos de ligação. ΔG está relacionado com a espontaneidade da reação, enquanto ΔH e ΔS são as principais quantidades para avaliar a força de uma ligação. Valores ΔH e ΔS negativos indicam a presença de ligações de hidrogênio e / ou forças de van der Waals; valores negativos ΔH e positivos ΔS sugerem a presença de interações eletrostáticas e os valores positivos ΔH e ΔS indicam a presença de interações hidrofóbicas.⁹⁷

Os parâmetros termodinâmicos calculados para nossos sistemas estão apresentados na Tabela 16. Pode-se verificar que todos os valores de ΔG são negativos, mostrando a espontaneidade da interação entre os complexos e a HSA.

Tabela 16. Parâmetros termodinâmicos para os sistemas $\text{HSA}-[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e $\text{HSA}-[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$.

T (K)	HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$			HSA- $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$		
	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
298			-22.94			-6.34
303	215	796	-24.32	-75.5	-231	-5.44
308			-30.96			-3.99

No caso do nitrosilo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$, os valores positivos de ΔH e ΔS sugerem que as forças hidrofóbicas desempenham um papel importante na sua ligação à HSA, enquanto os valores negativos de ΔH e ΔS indicam a presença de ligações de hidrogênio e / ou forças de van der Waals nas interações para o aquo-complexo

$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$. Em ambos os casos, a presença de um grupo metila no ligante 3-picolina confere alguma hidrofobicidade aos complexos que, de outro modo, estariam mais propensos a apresentar interações eletrostáticas com a proteína, uma vez que são moléculas catiônicas. No entanto, o ligante NO constitui um sítio lipofílico⁹⁸ que pode favorecer a interação hidrofóbica sugerida pelos valores calculados de ΔH e ΔS . O complexo aquo, por sua vez, apresenta a molécula de água em sua estrutura que deve ser considerada como local de formação de ligações de hidrogênio.

1.5.2.1 Considerações parciais

A interação entre a HSA e os complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ foi investigada por espectroscopia de fluorescência e o modelo de Stern-Volmer. Para ambas as espécies estudadas, observou-se a supressão da fluorescência da HSA com concentrações crescentes dos complexos, originados em interações espontâneas a julgar pelos valores negativos de ΔG . Observou-se que os mecanismos de supressão dinâmica e estática estão presentes e, apesar dos valores de K_{sv} aumentarem com o aumento da temperatura, os nossos dados sugerem uma contribuição importante da supressão estática. O complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ sofre interação com a HSA de natureza hidrofóbica, provavelmente devido à lipofilicidade do ligante nitrosilo. Enquanto o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{PF}_6$ está envolvido na formação de ligações de hidrogênio com HSA, provavelmente através da molécula de água coordenada. Vale ressaltar que os resultados descritos neste estudo serão importantes para ajudar a definir a distribuição e o transporte desses candidatos a metalo-fármacos no plasma sanguíneo. O elevado valor de K_b observado para o complexo de nitrosilo a 308 K sugere que este composto pode ser eficientemente armazenado e transportado no corpo pela HSA.

1.5.3 Atividade tripanocida de complexos trinucleares de rutênio simétricos combinados com ligantes azanaftalenos

Os dados apresentados neste item correspondem aos arquivos CAP1_fMS.pdf e CAP1_fSI.pdf. Os complexos testados para atividade tripanocida são aqueles descritos no item 1.2 deste texto. A doença de Chagas afeta de 7 a 8 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica.⁹⁹ Atualmente, a doença de Chagas não tem tratamento efetivo e a terapia tem sido limitada a duas drogas: benzonidazol e nirfutimox. O uso deste último fármaco foi descontinuado no Brasil e

depois na Argentina, Chile e Uruguai.¹⁰⁰ Nem o benzonidazol nem o nirfutimox são eficazes contra a fase crônica da doença, o que tem encorajado a procura de novos compostos com atividade melhorada e menos efeitos secundários.

Em se tratando de metalo-fármacos, Farrell e colaboradores já demonstraram que a coordenação de ligantes biologicamente ativos (tais como moléculas contendo quinolina) a metais de transição parece ser uma boa estratégia para aumentar as propriedades farmacológicas destes compostos.¹⁰¹ Com relação à atividade biológica potencial dos ligantes azanaftaleno, esses compostos têm a estrutura central da quinolina e podem atuar contra doenças tropicais.¹⁰² De fato, o uso de quinina e seus derivados para tratar a infecção aguda por malária tem sido explorado desde o início do século XX.^{102d} Os fatos históricos mostram que os jesuítas já sabiam que o quinino poderia ser usado no tratamento da malária e da febre amarela quando a América do Sul foi descoberta.^{102c} Finalmente em 1949, foram relatados derivados de quinolina como compostos eficientes no tratamento da doença de Chagas.^{102f}

Em relação à avaliação de complexos inorgânicos como fármacos candidatos contra a infecção por *T.cruzi*, pesquisadores como Gambino,¹⁰³ Franco,¹⁰⁴ Navarro¹⁰⁵ e Silva,¹⁰⁶ entre outros, buscaram novos compostos metálicos com maior eficácia quimioterapêutica.

Com o objetivo de avançar o conhecimento sobre a série de complexos trinucleares de rutênio combinados aos ligantes azanaftalenos, realizamos ensaios de atividade tripanocida para as formas tripomastigota (fase aguda da doença de Chagas) e amastigota (fase crônica da doença de Chagas) do protozoário *T.cruzi*, cepa CL Brener. O presente trabalho relata os dados coletados para ambos os ensaios e uma comparação entre os dados obtidos com benzonidazol (BZN, o medicamento de referência), os ligantes azanaftaleno livres, o complexo não combinado com os ligantes azanaftalenos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ e os complexos trinucleares **1-6**, Figura 47.

A Tabela 17 (e as Figuras S1 e S2 do arquivo CAP1_fSI.pdf) mostra os valores de IC_{50} calculados para $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ (um complexo modelo para um centro “exclusivamente” metálico), para os ligantes livres, para os compostos **1 - 6** e para o benzonidazol. Os valores aqui apresentados revelaram que a atividade dos complexos **1-6** contra o *T.cruzi* é superior ou semelhante à atividade do complexo modelo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ e dos ligantes livres em todos os casos (com exceção da atividade do complexo **5** em relação à forma amastigota). Notavelmente, o composto **6** é muito mais ativo do que o fármaco de referência BZN em relação tanto à forma tripomastigota quanto à forma amastigota do *T.cruzi*.

Figura 47. Estrutura dos complexos avaliados para atividade tripanocida

Fonte. Adaptado da referência 47.

Tabela 17. Atividade tripanocida (IC_{50}), citotoxicidade (DL_{50}) e índice de seletividade (IS) dos ligantes azanaftalenos e dos complexos trinucleares de rutênio

Composto	IC_{50} (μM) tripomastigota	IC_{50} (μM) amastigota	DL_{50} (μM) LLC-MK ₂	IS tripomastigota	IS amastigota
Benzonidazol	5,19	10,77	266,2	51,2	24,7
[Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CH ₃ OH) ₃ (CH ₃ COO)]	358,5	330,1	231,5	0,6	0,7
Complexo 1, qui	165,9	53,16	300,7	1,8	5,6
quinazolina	193,9	81,27	435,1	2,2	5,3
Complexo 2, 5-nitro	43,18	18,42	401,7	9,3	21,8
5-nitroisoquinolina	62,61	17,58	343,3	5,4	19,5
Complexo 3, 5-briq	4,60	40,27	279,0	60,0	6,92
5-bromoisoquinolina	42,39	39,27	207,7	4,8	5,2
Complexo 4, iq	95,73	15,81	332,9	3,4	21,0
isoquinolina	140,3	55,86	444,2	3,1	7,9
Complexo 5, 5-amiq	91,83	50,81	383,6	4,1	7,5
5-aminoisoquinolina	148,3	45,00	365,5	2,4	8,1
Complexo 6, thiq	1,39	1,06	222,4	160	209
5,6,7,8-tetrahidroisoquinolina	182,8	53,23	396,1	2,1	7,4

Esperávamos que nossos dados se assemelhassem aos resultados obtidos para outros complexos de coordenação, como polipiridinas de rutênio contendo fenazinas,¹⁰³ no sentido de que o complexo **4** (coordenado ao ligante isoquinolina) apresentaria maior atividade tripanocida. Tal como no caso das fenazinas, os ligantes azanaftaleno são aromáticos, planares e hidrofóbicos, podendo intercalar DNA do parasita e diminuir a sua viabilidade. Outras características, tais como a presença do substituinte amino no ligante 5-aminoquinolina, poderia ajudar a interação do complexo com biomoléculas através da

formação de ligações de hidrogênio. No entanto, estas expectativas foram frustradas uma vez que os valores de IC_{50} para os complexos **4** e **5** são bem maiores do que os valores de IC_{50} do BZN, e o complexo **5** é ainda menos ativo em relação à forma amastigota do que o ligante 5-aminoisoquinolina livre. Essas observações permitem inferir que o DNA não seja o alvo real aqui.

Surpreendentemente o complexo **6**, que tem o ligante 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolina, é o mais ativo dentro da série e é notavelmente mais ativo que o fármaco de referência BZN (Tabela 17 e Figura 48). O segundo anel de thiq é saturado, o que significa que o ligante perdeu sua planaridade e conjugação eletrônica. Neste ponto, a comparação exclusiva dos valores de IC_{50} seria demasiado especulativa para sugerir qualquer mecanismo de ação. No entanto, a citotoxicidade melhorada causada pela metilação não é um tópico inexplorado, a literatura mostra que compostos tetrahydro tendem a ser mais tóxicos e mutagênicos do que seus análogos insaturados no caso dos metabólitos do benzopireno.¹⁰⁷

Finalmente, os valores elevados de DL_{50} (dose letal) observados para os compostos sob investigação significam que eles são pouco tóxicos para células saudáveis. Em relação ao complexo **6**, as concentrações de DL_{50} são mais baixas para ambas as formas do parasita *T. cruzi*. Esse fato, associado aos valores muito baixos de IC_{50} para esse composto, conduziram a valores de índice de seletividade excelentes (IS). IS é definido como a razão entre DL_{50} e IC_{50} . Altos valores de IS significam que a dose ativa de um fármaco é muito mais baixa do que a sua dose letal. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu que um candidato para ser considerado como promissor e avançar para a fase de testes *in vivo* deve apresentar valores de IS superiores a 10.¹⁰⁸ Os valores de IS do complexo **6** são 160 e 209 para as formas tripomastigota e amastigota, respectivamente.

Em resumo, os complexos **1-6** exibiram melhor atividade tripanocida *in vitro* em comparação com os respectivos ligantes livres e o complexo modelo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$. Como destaque, o complexo **6** apresentou maior atividade do que o medicamento de referência para a doença de Chagas (BZN) para ambas as formas do parasita, a tripomastigota (fase crônica da doença) e a amastigota (fase aguda da doença). Seus altos valores de IS e, mais importante, sua maior atividade contra a fase crônica da doença de Chagas tornam o complexo **6** um candidato muito interessante para estudos posteriores *in vivo*.

Figura 48. Atividade tripanocida do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(thiq)_3]PF_6$ contra as formas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*, cepa CL Brener.

Fonte: adaptado da referência 47.

CAPÍTULO 2

No caso deste capítulo e do próximo, que tratam respectivamente de complexos bi- e mononucleares de rutênio, não se pretende aprofundar as discussões conforme foi feito no Capítulo 1. Aqui os resultados publicados serão apenas resgatados, com o objetivo de informar o leitor dos trabalhos conduzidos em meu laboratório.

2 Carboxilatos binucleares de rutênio com ponte μ -oxo e sua potencial atividade antialérgica

A hemeritina é uma proteína análoga à hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio em alguns invertebrados marinhos. A descoberta de que um complexo binuclear de ferro com ponte μ -oxo faz parte do sítio ativo dessa proteína (Figura 49) fez com que aumentasse o interesse na síntese e caracterização de complexos binucleares de metais de transição como o rutênio e o ferro.¹⁰⁹ Vários complexos de dirutênio com diferentes ligantes terminais já foram sintetizados e caracterizados.^{109b, 110} Uma das características químicas mais relevantes dessa classe de compostos, que determina sua reatividade em solução, é o forte efeito *trans* da ponte μ -oxo.^{110a, 111}

Figura 49. Representação esquemática do complexo de ferro que compõe o sítio ativo da hemeritina (acima) e complexos modelo (abaixo)

Por conta desse efeito, ligantes monodentados são bastante lábeis e trocam facilmente com moléculas de solvente. Entretanto, a coordenação de ligantes bidentados rígidos ou tridentados flexíveis minimiza a ocorrência da reação de troca e constituem então uma forma de controlar a labilidade desta posição.¹¹¹

Também de interesse para este capítulo, os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (FAINES) são constituídos por um ou mais anéis aromáticos, ligados a um grupo ácido. São ácidos orgânicos fracos e atuam em tecidos inflamados.¹¹² O grupo carboxilato atua como um ligante bidentado para metais de transição.

Os FAINES derivados de ácidos arilpropionícos fazem parte de um grupo relativamente novo de fármacos. Possuem atividade anti-inflamatória, propriedades analgésicas e antitérmicas, sendo utilizados amplamente no tratamento de dores crônicas, artrite reumatoide, osteoartrose, entre outras.¹¹³ De modo geral, os FAINES agem inibindo a ação das ciclooxigenases (COX), que são enzimas promotoras da biossíntese de prostaglandinas no local da inflamação.¹¹⁴ Desse modo, os FAINES inibem, mas não eliminam completamente o processo inflamatório.¹¹²⁻¹¹⁵ Além da atividade anti-inflamatória, após os anos 2000, descobriu-se que os FAINES também possuem a capacidade de inibir, prevenir e tratar alguns tipos de tumores.¹¹⁶ Compostos de coordenação combinados aos FAINES tem sido desenvolvidos, a fim de diminuir efeitos colaterais, a degradação enzimática dos medicamentos ou ainda melhorar a afinidade e especificidade dos mesmos.¹¹⁷ Pareceu-nos então bastante oportuno obter e caracterizar complexos binucleares de rutênio combinados aos FAINES ibuprofeno e cetoprofeno (Figura 50) e investigar sua potencial atividade antialérgica, uma vez que as alergias são, grosso modo, um processo inflamatório.

Figura 50. Estrutura dos complexos binucleares de fórmula geral $[Ru_2O(carb)_2(py)_6](PF_6)_2$, no quais carb = ibuprofenato ou cetoprofeno

Fonte: adaptado da referência 118.

O processo inflamatório pode ser descrito, de maneira bastante simplificada, como a reação de um organismo a uma infecção. Esse processo implica em uma série de reações mediadas por sinalizadores químicos, tais como vermelhidão e inchaço na região de lesões, febre, ocorrência de secreção, etc. De certa forma, o contato com alérgenos é entendido pelo organismo como uma infecção.¹¹⁹ Doenças alérgicas são consideradas hoje como um problema de saúde pública global.

As imunoglobulinas são glicoproteínas que funcionam como anticorpos. Há vários tipos e aquelas denominadas IgE respondem a uma variedade de alérgenos estando, portanto, implicadas nos processos alérgicos.¹²⁰ As IgE são glicoproteínas ativadoras de mastócitos, células do tecido conjuntivo cuja principal característica é o alto conteúdo de grânulos cheios de sinalizadores químicos. A ativação de receptores de IgE, chamados de FcεRI e localizados na membrana dos mastócitos é o evento chave para a iniciação e propagação de respostas fisiopatológicas envolvidas em condições alérgicas.^{120, 121} A interação entre o antígeno e o imunocomplexo FcεRI-IgE desencadeia a sinalização de eventos intracelulares que leva à desgranulação dos mastócitos e consequente liberação de mediadores alérgicos pré-formados, além da síntese e secreção de mediadores lipídicos e citocinas (Figura 51).¹²² Assim, a inibição da resposta dos mastócitos, quando estimulada por um antígeno (alérgeno), representa uma via importante para o desenvolvimento de novos fármacos antialérgicos. O uso atual de drogas anti-inflamatórias para tratar alguns distúrbios alérgicos¹²³ levou-nos a estudar a potencialidade dos complexos de dirutênio combinados com drogas anti-inflamatórias para inibir a ativação de mastócitos.

Figura 51. Representação esquemática da via clássica de desgranulação de mastócitos estimulada por alérgeno

Fonte: adaptado da referência 124.

Os mediadores químicos liberados durante a desgranulação dos mastócitos estimulados por alérgenos^{120, 121} são divididos em três classes de moléculas bioativas: mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos), citocinas (IL-4, TNF- α) e o conteúdo de grânulos citoplasmáticos (histamina, β -hexosaminidase e serotonina). A enzima β -hexosaminidase é amplamente aceita como um marcador biológico para a desgranulação dos mastócitos, e sua quantidade é indiretamente medida através da avaliação da fluorescência da metilumbeliferona, o produto da clivagem do reagente químico comercial (substrato) 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamida (MUG), mediada pela β -hexosaminidase.¹²⁵

Ainda em termos do modelo utilizado para ensaiar a potencialidade antialérgica de uma nova molécula, células de leucemia basofílica de rato, as RBL-2H3, são amplamente utilizadas como modelo para estudar a desgranulação.¹²⁶ Estas células são mastócitos da mucosa com funções semelhantes aos mastócitos primários. Além disso, essas células são robustas e crescem muito bem em diferentes superfícies.¹²⁷

2.1 Síntese dos complexos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (1) e $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (2)

Os dados apresentados neste capítulo correspondem aos arquivos CAP2_MS.pdf e CAP2_SI.pdf.

$[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (1): Adicionou-se 1,136 g de ibuprofeno (5,501 mmol) a uma mistura de 135 mL de água e 45 mL de etanol contendo 1,136 g de RuCl_3 (5,477 mmol). Esta mistura foi aquecida até 70 °C durante 10 minutos, com mudança de cor de castanho para castanho avermelhado. Após o aquecimento, adicionou-se 7 mL de piridina (87 mmol) nesta solução e deixou-se reagir sob refluxo durante 1 hora, levando a uma solução verde. Depois de o meio reacional ter atingido a temperatura ambiente, adicionou-se excesso de NH_4PF_6 . O meio reacional foi deixado em repouso, quando ocorre a precipitação de um sólido verde. O sólido isolado por filtração foi purificado em coluna de adsorção de alumina neutra e a fração azul de interesse foi eluída com uma mistura 8 CH_2Cl_2 / 2 CH_3CN (v / v). $\eta = 20,6\%$. Análise elementar, Exp. (Calc): % C 47,2 (48,2); % H 4,3 (4,6); % N 5,9 (6,0). $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- = 1448 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{s}}\text{COO}^- = 1403 \text{ cm}^{-1}$; $\Delta\nu = 43 \text{ cm}^{-1}$ (coordenação de ponte).

$[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (2): Adicionou-se 1,065 g de cetoprofeno (4,188 mmol) a uma mistura de 105 mL de água e 35 mL de etanol contendo 0,8784 g de RuCl_3 (4,234 mmol). Esta mistura foi aquecida até 70 °C durante 30 minutos, com mudança de cor de castanho

para castanho avermelhado. Após o aquecimento, adicionou-se 7 mL de piridina (87 mmol) nesta solução e deixou-se reagir sob refluxo durante 1 hora, levando a uma solução verde. Depois de o meio reacional ter atingido a temperatura ambiente, adicionou-se excesso de NH_4PF_6 . O meio reacional foi deixado em repouso, quando ocorre a precipitação de um sólido verde. O sólido isolado por filtração foi purificado em coluna de adsorção de alumina neutra e a fração azul de interesse foi eluída com uma mistura 8 CH_2Cl_2 / 2 CH_3CN (v / v).

$\eta = 12\%$. Análise elementar, Exp. (Calc): % C 48,6 (50,0); % H 3,8 (3,8); % N 5,2 (5,6). $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- = 1449\text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{s}}\text{COO}^- = 1404\text{ cm}^{-1}$; $\Delta\nu = 45\text{ cm}^{-1}$ (coordenação de ponte).

2.2 Caracterização estrutural por espectrometria de massas

A estrutura de complexos binucleares de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{RCOO})_2(\text{L})_6](\text{PF}_6)_2$ tem sido caracterizada por meio de medidas de difração de raios-X e RMN.¹²⁸ Embora a espectrometria de massa tenha sido utilizada para estudar esses complexos, até onde temos conhecimento nenhum dos trabalhos anteriores explorou o uso dos padrões de fragmentação obtidos a partir de medidas ESI-MS / MS para este fim. Portanto, na ausência de cristais adequados para realizar a análise de raios-X e considerando também a originalidade do uso da técnica para a caracterização estrutural de complexos $[\text{Ru}_2\text{O}]$, optamos por realizar sua caracterização estrutural usando ESI-MS / MS. A Figura 52 mostra a correspondência entre o padrão isotópico observado para o íon molecular dos complexos **1** e **2** e a previsão teórica. A Tabela 18 reúne a atribuição dos principais fragmentos observados nos espectros ESI MS / MS dos dois complexos.

Como se pode ver na Figura 52, os íons moleculares $[\mathbf{1} - \text{PF}_6]^+$ e $[\mathbf{2} - \text{PF}_6]^+$ são detectados como um conjunto característico de íons isotopólogos, sendo o mais abundante observado em m/z 1249 e m/z 1345, respectivamente. A distribuição isotópica é característica da presença de dois átomos de Ru, que é um elemento de isótopos múltiplos (^{104}Ru (18,7%); ^{102}Ru (31,6%); ^{101}Ru (17,0%); ^{100}Ru (12,6%); ^{99}Ru (12,7%); ^{98}Ru (1,88%) e ^{96}Ru (5,52%)). Ambos os íons gasosos foram então selecionados e dissociados através de colisões a 20 eV com argônio (espectros disponíveis no arquivo CAP2_SI). Até certo ponto, os compostos **1** e **2** mostram um comportamento em fase gasosa quase idêntico, portanto, neste primeiro momento, serão comentados apenas os resultados ESI-MS / MS para o complexo de ibuprofeno, tendo em mente que a discussão também se aplica ao complexo **2**.

Figura 52. Espectros ESI MS dos complexos (A) $[Ru_2O(ibu)_2(py)_6](PF_6)_2$ e (B) $[Ru_2O(ceto)_2(py)_6](PF_6)_2$ registrados a partir de soluções metanólicas. Acima é mostrada o perfil de distribuição isotópica teórico.

Fonte: adaptado da referência 118.

Tabela 18. Fragmentos observados em fase gasosa para os complexos (1) e (2) nos espectros ESI MS/MS

$[Ru_2O(ibu)_2(py)_6](PF_6)_2$ (1)		$[Ru_2O(ceto)_2(py)_6](PF_6)_2$ (2)	
$[1 - PF_6]^+$	m/z 1249	$[2 - PF_6]^+$	m/z 1345
$[1 - PF_6 - 3py + CH_3OH]^+$	m/z 1044	$[2 - PF_6 - 3py + CH_3OH]^+$	m/z 1140
$[1 - PF_6 - 4py + CH_3OH]^+$	m/z 965	$[2 - PF_6 - 4py + CH_3OH]^+$	m/z 1061
$[1 - PF_6 - 5py + CH_3OH]^+$	m/z 886	$[2 - PF_6 - 5py + CH_3OH]^+$	m/z 981
		$[2 - PF_6 - 6py + CH_3OH]^+$	m/z 902
$[1 - PF_6 - 4py - 1ibu]^+$	m/z 727		
		$[2 - PF_6 - 1keto - (C_{15}H_{13}O)]^+$	m/z 883
		$[2 - PF_6 - 1py - 1keto - (C_{15}H_{13}O)]^+$	m/z 804
		$[2 - PF_6 - 2py - 1keto - (C_{15}H_{13}O)]^+$	m/z 725

A dissociação induzida por colisão (CID) gera principalmente fragmentos de carga +1 +1 originados de perdas sucessivas de piridina e formação de adutos em fase gasosa com uma molécula de metanol (

Figura 53). Assim, observa-se um íon em m/z 1044 atribuído à perda de três piridinas e à associação de uma molécula de metanol, a partir do íon molecular em m/z 1249. O íon gasoso em m/z 1044 gera ainda outros fragmentos com duas perdas sucessivas de uma molécula de piridina, produzindo os fragmentos em m/z 965 e m/z 886, respectivamente (Tabela 18). Curiosamente, nesta sequência de fragmentação, não se observou perda de metanol às custas de moléculas de piridina, sugerindo a importância da formação de aduto com solvente na estabilização dos íons gasosos.

Figura 53. Padrão de dissociação em fase gasosa do composto $[Ru_2O(ibu)_2(py)_6](PF_6)_2$

Fonte: adaptado da referência 118.

Figura 54. Padrão de dissociação em fase gasosa do composto $[Ru_2O(ceto)_2(py)_6](PF_6)_2$

Fonte: adaptado da referência 118.

Finalmente, observa-se um íon em m/z 727, que foi atribuído à perda de quatro piridinas e um ibuprofenato a partir do íon molecular $[1 - PF_6]^+$ com manutenção de carga. Este íon é menos abundante do que os outros originados nas sucessivas perdas de piridina, sugerindo, como esperado, que a piridina está ligada de forma mais fraca à unidade $[Ru_2O]$ do que o ibuprofenato em ponte. Portanto, o caminho de fragmentação centrado em perdas de carboxilato é menos favorável do que o centrado em perdas de piridina.

Em geral, o composto **2** apresenta um padrão de fragmentação mais extenso, seguindo duas vias distintas. O mesmo caminho de fragmentação das perdas de piridina e formação de aduto com metanol é observado (Figura 54). No entanto, o complexo **2** apresenta um último processo de fragmentação, perdendo o sexto ligante piridina e originando o íon monovalente em m/z 902.

Apesar do complexo **2** também perder uma molécula de carboxilato, aparentemente segue um caminho de fragmentação diferente do observado para o complexo **1**, uma vez que inicialmente perde o carboxilato sem a perda de piridina e exibe uma clivagem no ligante cetoprofenato remanescente, perdendo um fragmento $C_{15}H_{13}O$, gerando o íon em m/z 883. Este íon sofre fragmentação posterior, perdendo sucessivamente moléculas de piridina, produzindo os fragmentos em m/z 804 e em m/z 725 (Figura 54 e Tabela 17).

2.3 Espectroscopia eletrônica

A Figura 55 apresenta os espectros eletrônicos dos complexos $[Ru_2O(ibu)_2(py)_6](PF_6)_2$ e $[Ru_2O(ceto)_2(py)_6](PF_6)_2$. Tipicamente, os espectros eletrônicos de compostos contendo a unidade $[Ru_2O]$ com os íons rutênio em estado de oxidação +3 exibem bandas fortes nas regiões entre 300 nm - 400 nm e 550 nm - 600 nm, atribuídas respectivamente à transferência de carga metal - ligante e às transições internas da unidade metálica $[Ru_2O]$. Ambos os compostos apresentam as transições de transferência de carga em 326 nm ($14.500 M\text{ cm}^{-1}$, **1**) e em 328 nm ($14.985 M\text{ cm}^{-1}$, **2**) e as transições internas em 586 nm ($7.275 M\text{ cm}^{-1}$ (**1**) e $5.960 M\text{ cm}^{-1}$, (**2**)). O fato da substituição de acetatos pelos FAINES não promover nenhuma alteração espectral em relação ao perfil típico sugere que os carboxilatos ligados em ponte afetam pouco a estrutura eletrônica desses compostos.

De modo geral, em complexos com dois íons rutênio e um ligante oxo em ponte, o diagrama de orbitais moleculares de natureza π é construído considerando a contribuição dos orbitais $d\pi$ dos íons rutênio e os orbitais $p\pi$ do ânion oxo.¹²⁹ Os dois centros Ru^{3+} (d^5) contribuem com 10 elétrons, cada um exibindo um ambiente pseudo-octaédrico, e a ponte

μ -oxo contribui com 4 elétrons. A interação $d\pi(\text{Ru}) - p\pi(\mu\text{-O})$ mais forte envolve os orbitais d_{zx} dos íons Ru e o orbital p_x do ânion O^{2-} , ambos perpendiculares ao plano da unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$ (plano zy). Essa interação dá origem ao orbital ligante π_1 , o orbital não ligante n_2 e o orbital anti-ligante π_2^* (Figura 56). As interações no plano da unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$ entre os orbitais p_y do ânion O^{2-} e d_{zy} dos centros metálicos são mais fracas e produzem os orbitais ligante π_2 , não ligante n_1 e anti-ligante π_1^* . O orbital d_{xy} permanece essencialmente não ligante (n) no complexo. Seguindo este esquema, tais compostos exibem uma banda de absorção típica entre 500-600 nm atribuída a uma transição de transferência de carga centrada no metal envolvendo os orbitais $d\pi(\text{Ru})$ e $p\pi(\mu\text{-O})$ ($n_1 \rightarrow \pi_2^*$ ou $n_2 \rightarrow \pi_2^*$).^{110a, b, 111a}

Figura 55. Espectros eletrônicos dos complexos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ obtidos a partir de soluções em acetonitrila, $2 \times 10^{-5} \text{M}$.

Fonte: adaptado da referência 118

Figura 56. Diagrama de orbitais moleculares π para uma unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$

Fonte: adaptado da referência 129.

O diagrama acima foi idealizado para o complexo binuclear linear com ponte μ -oxo $[\text{Cl}_5\text{Ru}-\text{O}-\text{RuCl}_5]^n$.¹²⁹ As principais diferenças entre o exemplo acima e a classe de complexos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ são a conformação dobrada da ligação Ru-O-Ru e a presença das pontes de acetato. A contribuição da mistura entre os orbitais $d\pi$ do metal e os orbitais dos ligantes acetatos foi negligenciada porque, novamente, foi considerada demasiadamente pequena para ser relevante. De fato, um trabalho recente focado em cálculos DFT para essa classe de complexos, não mostrou contribuição significativa das pontes de acetato para os orbitais HOMO e LUMO. Mesmo para os níveis de energia mais baixa, a contribuição máxima de acetato observada é de cerca de 20%.^{110b}

Em relação à conformação dobrada, a literatura simplesmente adotou um paralelismo entre a estrutura eletrônica de uma unidade linear e uma unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$ angular, apesar de haver dados cristalográficos para compostos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ mostrando que o ângulo Ru-O-Ru está na faixa entre 120 a 125°. ^{110, 111} O ponto aqui é que o diagrama de orbitais moleculares, conforme ilustrado na Figura 56, considera dois orbitais p puros da ponte oxo para interagir com os orbitais d dos íons rutênio. Contudo, a fim de proporcionar um ângulo Ru-O-Ru de 120°, tem-se que considerar o ânion óxido com hibridização sp^2 . Neste caso, haveria exclusivamente um orbital p puro disponível para interagir e dois elétrons a menos para preencher o diagrama de orbitais moleculares resultante. Portanto, embora este diagrama de OM qualitativo pareça funcionar adequadamente para atribuir os espectros eletrônicos de compostos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$, ele também deve ser revisto.

2.4 Potencial antialérgico

Conforme dito anteriormente, a desgranulação de mastócitos estimulados por alérgenos é considerada um evento chave nas doenças alérgicas. Consequentemente, uma das estratégias para encontrar novos candidatos antialérgicos é monitorar a capacidade de novas moléculas para inibir a ativação e a desgranulação de mastócitos.

O pré-tratamento de células de leucemia basofílica de rato (RBL) sensibilizadas com IgE e com os compostos **1** e **2**, seguido de estimulação celular com alérgeno (DNP-BSA, dinitrofenil-albumina sérica bovina), mostrou uma forte inibição da desgranulação celular concentração-dependente no caso do complexo **2**, com um valor de IC_{50} a 18 μM (Figura 57A). Além disso, a atividade inibitória de **2** foi consideravelmente mais potente do que a exibida pelo fumarato de cetotifeno ($\text{IC}_{50} = 154,7 \mu\text{M}$), determinada em trabalho anterior.^{126c} O cetotifeno é um estabilizador de mastócitos comumente utilizado como

controle positivo em ensaios de desgranulação de mastócitos.¹³⁰ É interessante notar que, contrariamente ao observado para o complexo Ru-cetoprofeno (**2**), o tratamento celular com cetoprofeno sozinho não inibiu a desgranulação de mastócitos estimulados pelo antígeno conforme esperado (Figura 57A).

Figura 57. Ensaio de inibição da desgranulação de mastócitos RBL estimulados por antígeno, avaliada pela dosagem da β -hexosaminidase liberada na presença de (A) $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (2**) e cetoprofeno e (B) $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ (**1**) e ibuprofeno. Em ambos os casos o fumarato de cetotifeno foi utilizado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SD de três ensaios independentes.**

Fonte: adaptado da referência 106.

Em geral, FAINEs como o cetoprofeno e o ibuprofeno inibem as duas isoformas da ciclo-oxigenase, denominadas COX-1 e COX-2, que catalisam o estágio inicial na geração de prostaglandinas, moléculas envolvidas na inflamação alérgica.¹³¹ A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tipos de células, enquanto a COX-2 é induzida principalmente no processo inflamatório.¹³² A produção de prostaglandinas em mastócitos ativados por antígeno, incluindo RBL, é catalisada pela COX-2.¹³¹ Por conseguinte, esperávamos que o cetoprofeno e o ibuprofeno sozinhos pudessem ter um efeito positivo na inibição da liberação de β -hexosaminidase através de alguma via da cascata de sinalização celular, o que não ocorreu (ver Figura 57A e B para cetoprofeno e ibuprofeno, respectivamente).

Essa observação mostra que a coordenação do cetoprofeno com o centro metálico origina uma nova espécie capaz de se combinar aos mastócitos e inibir a liberação de β -hexosaminidase. No entanto, é necessário verificar se a atividade inibidora do composto **2** está de fato relacionada a sua capacidade de diminuir a desgranulação dos mastócitos e não

à promoção da morte dos mesmos ou à inibição da atividade da β -hexoaminidase. A Figura 58 mostra que concentrações mais elevadas do composto **2** inibem moderadamente a atividade da β -hexosaminidase: 200 μ M do composto provoca 37% de inibição da enzima, enquanto a mesma concentração provoca 85% de inibição da desgranulação. Por conseguinte, os resultados demonstraram que a redução na percentagem de enzima β -hexosaminidase liberada é primariamente atribuída à capacidade do composto **2** de inibir a desgranulação dos mastócitos.

A incubação das células RBL-2H3 com o complexo **2** durante 2 horas causou uma pequena diminuição na viabilidade celular apenas nas concentrações mais elevadas, demonstrando que a sua atividade inibitória contra a desgranulação dos mastócitos não é causada por um efeito citotóxico (Figura 58). Apenas uma pequena redução na viabilidade celular (cerca de 20%) foi observada após tratamento com a maior concentração de fármaco (200 μ M). Estes resultados são consistentes com um efeito inibitório primário do composto **2** na redução da desgranulação de mastócitos estimulada por antígeno e sugerem que esta nova molécula é um candidato promissor para explorar os mecanismos de ação em mastócitos estimulados com alérgeno para futura aplicação como um fármaco antialérgico. É importante ainda destacar que o fato do composto **2** não estimular a desgranulação dos mastócitos sugere que este composto não apresenta potencial alergênico, uma propriedade necessária para as suas futuras aplicações farmacológicas.

Em contraste com os resultados obtidos para o complexo **2**, a interação com o composto de ibuprofeno **1** provocou a *liberação* de β -hexosaminidase como mostrado na Figura 57B. Este comportamento pode ser causado por estimulação celular (propriedade alergênica) ou morte celular (por necrose^{xi}). No entanto, a primeira possibilidade foi descartada uma vez que o composto **1** mostrou efeito citotóxico para células RBL, quando incubadas com as células durante 20 minutos (tempo do bioensaio) ou 2 horas (Figura S5B e C, do arquivo CAP2_SI). O efeito citotóxico do composto **1** torna a sua utilização impraticável como um fármaco antialérgico, mas não descarta a sua aplicação em outros tipos de doenças tais como o cancro, por exemplo, como observado para composto semelhante de dirutênio-ibuprofeno.¹³³

^{xi} Necrose: morte celular desordenada, que ocorre em função de alguma patologia. Processo diferente da apoptose, que é a morte celular programada.

Figura 58. Ensaios de viabilidade celular dos mastócitos RBL e de inibição da atividade da β -hexosaminidase na presença do complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ ANOVA seguida do teste de Dunnett's indicam significância estatística de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.001$, em comparação com ensaio controle (células não tratadas com complexo).**

Fonte: Adaptado da referência 118.

2.5 Considerações parciais

Apresentou-se a síntese de dois novos complexos binucleares de rutênio, $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$, que combinam na mesma estrutura o centro metálico $[\text{Ru}_2\text{O}]$, que é um análogo biomimético do centro ativo de hemeritina, e os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais ibuprofeno e cetoprofeno. Ambos os complexos foram caracterizados por espectrometria ESI-MS / MS e espectroscopia UV-visível. Os resultados são totalmente consistentes com as estruturas propostas e, aparentemente, a combinação com o FAINE não perturba o comportamento eletrônico do centro metálico.

O complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ foi identificado como um composto muito promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antialérgicos, considerando sua potencialidade para inibir a liberação de mediadores alérgicos a partir de mastócitos estimulados com antígeno. A investigação sobre o mecanismo molecular responsável pelo potencial antialérgico de $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ faz parte do trabalho em andamento. Além disso, o fato do composto $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ceto})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ não estimular a desgranulação dos mastócitos também é muito positivo e sugere que esta molécula não apresenta qualquer

potencial alergênico e pode ser utilizada com segurança para outras aplicações farmacológicas. Em contraste, o complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibu})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ estimula a liberação de β -hexosaminidase, devido à sua citotoxicidade para a linha celular RBL-2H3, o que torna seu uso impraticável como antialérgico, mas não exclui outras potenciais aplicações biológicas.

CAPÍTULO 3

3 CARBOXILATOS MONONUCLEARES DE RUTÊNIO

Neste capítulo serão tratados dois complexos mononucleares de rutênio combinados com as fluoroquinolonas norfloxacin e a ciprofloxacina. Posto isto, no próximo item apresento uma pequena introdução (que não tem a pretensão de ser exaustiva, mas sim de ser breve) sobre essa classe de fármacos.

3.1 Breve introdução sobre fluoroquinolonas e complexos metálicos combinados a fármacos dessa classe

A ideia do uso de quinolonas como fármacos surgiu acidentalmente quando George Lesher, em 1962, isolou o ácido nalidíxico como subproduto da síntese e purificação da cloroquina (agente antimalárico). Em seus ensaios, verificou que esse ácido possuía atividade antimicrobiana.¹³⁴

Atualmente, as quinolonas são usadas numa gama variada de infecções como infecções urinárias, prostatite, uretrite, cistite, faringite, gastroenterite e algumas podem ser usadas em casos de infecções sistêmicas.¹³⁵ Atuam contra ambos os tipos de bactéria, gram-positivas e gram-negativas,^{xii} devido sua capacidade de interferir na ação das enzimas topoisomerases II (DNA-girase) e IV, que respondem por modificações topológicas do DNA durante a síntese bacteriana.¹³⁶

Após a descoberta de sua atividade, modificações na estrutura do ácido nalidíxico foram sistematicamente introduzidas, visando melhora na eficácia desses fármacos (Figura 59). As fluoroquinolonas, uma subclasse das quinolonas, diferem destas últimas por possuírem em sua estrutura um átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinil na posição 7. Alguns representantes deste grupo são a norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, perfloxacina e a enrofloxacina que é usada exclusivamente na medicina veterinária.¹³⁷ A combinação destes dois substituintes levou a uma ampliação no espectro de ação e ao aumento na capacidade das quinolonas originais penetrarem na parede bacteriana, melhorando sua atividade contra bactérias Gram-negativas e abrangendo

^{xii} A terminologia gram-positiva e gram-negativa se refere a como diferentes bactérias respondem ao teste colorimétrico de Gram. Neste teste, bactérias gram-positivas apresentam-se coradas de roxo enquanto as gram-negativas apresentam-se coradas de vermelho. A coloração adquirida neste teste está relacionada com a constituição da parede celular e permite fazer a distinção entre diferentes tipos de microrganismos.

algumas Gram-positivas. Atingiu-se também um perfil farmacocinético melhor, levando à descoberta de alguns exemplos cuja atividade antibacteriana é cerca de 1.000 vezes superior à observada para o ácido nalidíxico.¹³⁸

Figura 59. Relação estrutura – atividade da quinolonas

Fonte: adaptado da referência 139.

Em se tratando da reatividade destas moléculas frente a outras espécies, tanto o grupo carboxilato quanto a carbonila adjacente (Figura 59 e Figura 60) são sítios de coordenação para uma variedade de cátions metálicos. Essa reatividade frente a cátions influencia as propriedades farmacológicas e toxicológicas desses fármacos quando administrados tanto na forma livre quanto sob a forma complexada a um metal.¹⁴⁰ A função amina do grupo piperazina é facilmente ionizável, podendo também participar de reações de complexação. No entanto a coordenação bidentada envolvendo um dos átomos de oxigênio do ácido carboxílico e a carbonila da piridona predomina na maior parte dos exemplos.¹⁴¹ A formação de adutos com íons metálicos divalentes como os alcalino-terrosos também foi descrita como um evento biológico importante, uma vez que a capacidade destes fármacos interagirem com alguns componentes celulares (proteínas, membranas, ácidos nucleicos, etc) pode ser mediada por esta complexação.¹⁴² Foi demonstrado, por exemplo, que o íon Mg^{2+} funciona como um mediador da interação do DNA bacteriano com o fármaco, formando um aduto com os grupos fosfato da cadeia de

DNA e carboxilato da fluoroquinolona. Esse arranjo aparentemente seria estabilizado através de interações envolvendo os anéis aromáticos da quinolona e as bases nitrogenadas do DNA. Posteriormente, a quinolona promove a clivagem da DNA-girase, promovendo a atividade antibacteriana.¹⁴³

De interesse particular para este texto são a norfloxacin e a ciprofloxacina (Figura 60). A norfloxacin atua por inibição da DNA-girase e topoisomerase IV, duas enzimas envolvidas na síntese e replicação do DNA bacteriano.^{134b} É um fármaco de amplo espectro, utilizado principalmente no tratamento de infecções do trato urinário, respiratório e da pele. Também é eficaz no tratamento da diarreia e conjuntivite, quando administrada na forma de colírio. No entanto, a norfloxacin não é eficaz em infecções que envolvem bactérias anaeróbias.¹⁴⁴

A ciprofloxacina foi introduzida no mercado em 1983, tendo sido desenvolvida por pesquisadores do laboratório Bayer na Alemanha.^{135b} É a fluoroquinolona mais potente em relação a microrganismos Gram-negativos, sendo até oito vezes mais ativa que a norfloxacin contra enterobactérias e pseudomonas. Ela pode ser administrada por via oral ou intravenosa, sendo a via intravenosa mais indicada em casos de infecções graves. Por via oral, apenas 70% da dose administrada são absorvidos. A distribuição da ciprofloxacina ocorre em diferentes líquidos e tecidos orgânicos, atingindo concentração terapêutica nas amídalas, gânglios linfáticos, secreção brônquica, pulmões, saliva, pele e tecido subcutâneo, fígado, pâncreas, músculos, aparelho genital feminino, ossos, próstata, sêmen e aparelho renal. Atinge concentração na bile quatro vezes maior que a concentração no sangue.^{135b}

Figura 60. Estruturas da norfloxacin e da ciprofloxacina

Fonte: a autora.

A investigação de complexos de esfera de coordenação mista, ou seja, contendo uma ou mais moléculas de fluoroquinolonas coordenadas ao centro metálico, além de moléculas de água ou ligantes piridinícos,^{141a} tem mostrado uma série de aplicações em potencial para esses metalo-fármacos. Além disso, foi demonstrado já há algum tempo que a coordenação de íons metálicos aos grupos carboxilato e piridona do fármaco não comprometem sua atividade antimicrobiana. No caso de complexos carregados, a natureza do contra-íon utilizado interfere na atividade biológica dos complexos.¹⁴⁵

3.2 Dois compostos obtidos pela combinação de rutênio e a ciprofloxacina

Os dados apresentados neste item correspondem aos arquivos CAP3_aMS.pdf e CAP3_aSI.pdf.

$(C_{17}H_{19}FN_3O_3)_3[RuCl_6].3H_2O$ ((ciproH₂⁺)₃[RuCl₆].3H₂O, **1**): Ciprofloxacina (480 mg, 1,50 mmol) e RuCl₃.nH₂O (100 mg, 0,480 mmol) foram adicionados a uma mistura de etanol (25 mL) e HCl 0,1 M (10 mL) e a solução resultante foi mantida sob refluxo durante 2 horas. A mistura reacional foi esfriada à temperatura ambiente e mantida sob refrigeração durante a noite. Este procedimento deu origem a um sólido avermelhado que foi isolado por filtração, lavado com solução diluída de HCl e água e secado sob vácuo. A cromatografia em camada delgada (óxido de alumínio como fase estacionária e mistura 1 acetonitrila: 1 metanol (v: v) como fase móvel) do composto **1**, mostrou apenas uma mancha que não exibiu a luminescência característica da ciprofloxacina sob irradiação em 254 nm e 365 nm. Rendimento: 360 mg (54%). C₅₁H₆₃F₃N₉O₁₂Cl₆Ru (1364,90): calc. H 4,65, C 44,88, N 9,24; Encontrado H 4,42, C 44,51, N 8,75.

$[Ru(C_{17}H_{17}FN_3O_3)_3].4H_2O$ ([Ru(cipro)₃].4H₂O, **2**): Uma suspensão de ciprofloxacina (480 mg, 1,50 mmol) e RuCl₃.nH₂O (100 mg, 0,480 mmol) em água (15 mL) foi aquecida sob refluxo durante 3 h.¹⁴⁶ Deixou-se o meio reacional esfriar à temperatura ambiente e depois filtrou-se. Adicionou-se acetona ao filtrado numa proporção de 25: 1. O precipitado castanho amarelado foi isolado por filtração e seco sob vácuo. O composto **2** foi purificado por cromatografia de exclusão utilizando Sephadex G-10 (Sigma-Aldrich). Rendimento: 355 mg (63%). C₅₁H₅₉F₃N₉O₁₃Ru (1164,15): calc. H 5,11, C 52,62, N 10,80; Encontrado H 5,02, C 50,61, N 10,20.

3.2.1 Síntese e solubilidade dos compostos $(\text{ciproH}_2^+)_3[\text{RuCl}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ru}(\text{cipro})_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

A literatura descreve duas classes principais de complexos de metal-fluoroquinolona. A abordagem sintética que emprega valores de pH baixos leva a complexos iônicos nos quais a fluoroquinolona aparece na sua forma totalmente protonada, como o contra-íon de um ânion de coordenação simples, como o BiCl_n .¹⁴⁷ Por outro lado, quando a síntese é realizada em meio orgânico, isolam-se os compostos de coordenação, sendo o centro metálico coordenado com um a três ânions de fluoroquinolato e moléculas de solvente. Na verdade, o produto sintético pode ser ajustado pelo controle das condições de síntese como solvente e pH, e este fato foi observado neste trabalho. Propõe-se que o composto **1**, sintetizado em meio ácido rico em ânions Cl^- seja isolado como um sal de $[\text{RuCl}_6]^{3-}$, enquanto o composto **2**, sintetizado na ausência de ácido, é proposto como sendo um "verdadeiro" composto de coordenação. As estruturas sugeridas para os compostos **1** e **2** estão ilustradas na Figura 61.

Figura 61. Estrutura proposta para os complexos $(\text{ciproH}_2^+)_3[\text{RuCl}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1) e (B) $[\text{Ru}(\text{cipro})_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2).

Fonte: Adaptado da referência 148.

Em relação às diferenças no comportamento dos dois complexos em virtude de suas estruturas, a característica mais importante é a diferença de solubilidade em água entre

estas espécies. Embora o composto de coordenação **2** seja solúvel em meio aquoso (como o seu análogo de ferro¹⁴⁹), o composto iônico **1** é solúvel em condições extremas de pH, assim como a ciprofloxacina livre. Esta característica pode ser racionalizada em termos dos valores de pKa da fluoroquinolona e da carga total dos compostos.

Para o composto **1**, os valores de pKa determinados por titulação espectrofotométrica são pKa1 = 3,4 e pKa2 = 8,7. Para este composto, é razoável supor que os valores de pKa devem ser semelhantes aos valores de ciprofloxacina livre, uma vez que se propõe que a fluoroquinolona não está coordenada com o centro metálico. Dependendo do método de determinação de pKa, a literatura relata três equilíbrios de protonação: um para o grupo aza da piperazina (o sítio mais ácido da molécula), um para o carboxilato e um para a amina periférica no anel da piperazina, com valores de pKa variando de pKa1 = 3,6 a 4,1, pKa2 = 5,9 a 6,4 e pKa3 = 8,2 a 9,0, respectivamente.¹⁵⁰ Por comparação, no caso do composto **1** podemos atribuir o primeiro equilíbrio observado (pKa = 3,4) à protonação do átomo de azoto de piperazina e o segundo (pKa = 8,7) à protonação de amina periférica. Presumivelmente, a protonação do carboxilato não foi observada devido à ocorrência de dois equilíbrios ácido-base em um pequeno intervalo de pH (3-6) e à simplicidade do método empregado neste trabalho.

Em relação ao composto **2**, propõe-se que a ciprofloxacina tenha a sua função carboxilato coordenada ao centro metálico, e deve apresentar apenas o equilíbrio de protonação do seu grupo amina. O pKa observado neste trabalho é 5,7. A literatura relatou valores de pKa com flutuações significativas para o equilíbrio de protonação da amina da ciprofloxacina livre (8,2-9,0), dependendo da metodologia empregada. No nosso caso, como esperado, este pKa é menor, devido ao efeito indutivo do íon Ru(III), que atua como um ácido de Lewis, removendo a densidade eletrônica do ligante e aumentando de um modo geral sua acidez. Este efeito foi corroborado pelos resultados voltamétricos, que serão discutidos a seguir. Este valor de pKa é também responsável pelas diferenças observadas no espectro eletrônico do composto **2** em água destilada (pH = 5,8) ou pH fisiológico (pH = 7,4, tampão fosfato, ver abaixo): em água provavelmente há uma grande contribuição de espécies com as três aminas protonadas, enquanto a ciprofloxacina desprotonada deve prevalecer em pH fisiológico.

Portanto, a partir dos valores de pKa determinados podemos concluir que, em água destilada (pH 5,8) e pH fisiológico, a ciprofloxacina no composto **1** está presente como um zwitterion (função amina protonada e função carboxilato predominantemente desprotonada) ou seja, como uma molécula neutra. Este fato certamente responde pela

baixa solubilidade do composto **1** em meio aquoso. Na verdade, a ciprofloxacina livre só é solúvel em água sob condições extremas de pH, pois em valores baixos de pH ela apresenta carga +2 e em valores de pH mais elevados, apresenta carga -1. Tendo em conta esta característica, a carga total da fluoroquinolona parece determinar sua solubilidade em meio aquoso, tanto quanto foi observado para o composto **1**.

3.2.2 Caracterização estrutural por meio de espectrometria de massas ESI - MS e medidas de TG - DTA

Para o composto iônico **1**, observou-se um cluster de picos de baixa intensidade de íons isotopólogos centrado em m/z 1325,8 no espectro ESI - MS / MS, atribuído ao aduto $\{[\text{cipro.H}^+]_3[\text{RuCl}_5].\text{H}_2\text{O}.\text{CH}_3\text{OH}\}^+$. No entanto, o pico mais intenso é observado em m/z 994,6 e sua distribuição isotópica é compatível com o perfil isotópico do carbono.¹⁵¹ Esta observação leva à conclusão de que este fragmento não tem rutênio na sua composição. Este pico foi atribuído ao aduto monovalente $(\text{cipro})_3.\text{H}^+$ formado em fase gasosa por três moléculas de ciprofloxacina. De facto, observa-se no espectro ESI MS/MS do composto **1** (Figura 62), uma série de adutos de ordem inferior, atribuídos aos fragmentos $(\text{cipro})_2.\text{H}^+$ em m/z 663,3 e $(\text{cipro}).\text{H}^+$ em m/z 332,1. Vale ressaltar que ainda é observado outro pico em $m/z = 763,6$, o qual foi atribuído a um fragmento de ciprofloxacina originado da sua fragmentação em fase gasosa. Já foi demonstrado por Calza et al.¹⁵² que a fragmentação de ciprofloxacina em fase gasosa implica na perda de grupos HF, CO₂ e -C₃H₅ (ciclopropano). Considerando a perda dos fragmentos de HF e CO₂ das três moléculas de ciprofloxacina do aduto $(\text{cipro})_3.\text{H}^+$ e a perda de um grupo alquilo -C₃H₅ de uma ciprofloxacina, obtém-se um fragmento de massa 763, correspondente ao pico observado em $m/z = 763,6$. Portanto, estas observações levam-nos a concluir que o espectro ESI MS/MS do composto **1** é dominado pela química da ciprofloxacina em fase gasosa. Este resultado corrobora a atribuição da estrutura do composto **1** a um composto iônico, no qual a ciprofloxacina não está coordenada ao centro de metálico, que não é detectado porque ocorre como um ânion de coordenação e os experimentos foram realizados no modo positivo de detecção.

Já o espectro ESI MS do composto **2** (Figura 63) exhibe dois clusters de íons isotopólogos centrados em m/z 1093.3 e 547.1, atribuídos aos íons mono- e bivalentes $[\text{Ru}(\text{cipro})_3].\text{H}^+$ e $[\text{Ru}(\text{cipro})_3].2\text{H}^+$, respectivamente. A distribuição isotópica observada é compatível com a do rutênio,¹⁵¹ corroborando a formulação proposta para o composto **2**.

Figura 62. Expansão dos picos observados no espectro ESI MS/MS do composto $(\text{ciproH}^+)_3[\text{RuCl}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1), obtido a partir de solução metanólica (fragmentação do íon m/z 994.6); ênfase na concordância da distribuição isotópica teórica e observada experimentalmente

Fonte: Adaptado da referência 148

Figura 63. Expansão dos picos observados no espectro ESI MS do composto $[\text{Ru}(\text{cipro})_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2), obtido a partir de solução metanólica, com ênfase na distribuição isotópica do rutênio. (a) $[2\text{H}^+ - 4\text{H}_2\text{O}]^+$ e (b) $[2.2\text{H}^+ - 4\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

Fonte: Adaptado da referência 148.

Além da caracterização em fase gasosa, os compostos sob investigação foram analisados também por medidas de medidas de termogravimetria, conforme os resultados apresentados na Figura 64.

Figura 64. Curvas TG e DTA obtidas para os compostos (a) $[C_{17}H_{19}FN_3O_3]_3[RuCl_6] \cdot 3H_2O$ (b) $[Ru(C_{17}H_{17}FN_3O_3)_3] \cdot 4H_2O$ e (c) ciprofloxacina, sob atmosfera de $N_{2(g)}$, rampa de aquecimento $10^\circ C/min$.

Fonte: Adaptado da referência 148.

Para fins de comparação, as curvas TG / DTA de ciprofloxacina livre também foram obtidas nas mesmas condições utilizadas para os compostos metálicos. Já foram relatados resultados de TG para ciprofloxacina livre e compostos iônicos e de coordenação de Cu, Zn e Ru¹⁵³ e, embora os dados tenham sido coletados em condições diferentes, os dados relatados neste trabalho são compatíveis com os da literatura.

Para a ciprofloxacina livre (na sua forma zwitteriônica), não há perda de moléculas de água de hidratação no início do termograma. O primeiro processo de perda de massa (68%) termina em cerca de 400 °C e é atribuído a uma decomposição parcial das moléculas de ciprofloxacina com perda de H₂O e CO₂. Este primeiro passo de decomposição foi observado anteriormente em 277 °C.^{153a} Em nosso experimento, um pico intenso a 272 °C também é observado. No entanto, uma inspeção rigorosa do termograma mostra que a esta temperatura não há perda de massa, sugerindo que este pico endotérmico pode ser atribuído a uma alteração de fase, por exemplo, à fusão de ciprofloxacina. Sua decomposição completa ocorre até 600 °C (pico endotérmico em 623 °C), sendo todo o perfil do termograma de acordo com aquele observado na literatura.^{153a}

Conforme pode ser visto na Figura 64, embora os perfis sejam aparentemente parecidos, os dados de TG são fundamentais para distinguir entre os compostos iônico (**1**) e de coordenação (**2**). No caso do composto **1**, observa-se uma perda de massa de 4% a 60 °C, correspondente à perda de três moléculas de água, corroborando os resultados da análise elementar. Turel *et al.*,^{153b, c} relataram que este processo ocorre em 62,5 °C para um composto iônico análogo de Cu, seguido de perdas de massa acima de 230 °C, atribuídas à perda de moléculas de CO₂, H₂O e HCl (tendo em mente que o ânion de coordenação - um composto de cobre e um de rutênio em nossa investigação - é composto por ligantes cloro). A decomposição total do composto iônico de Cu foi relatada como sendo completa acima de 800 °C. O comportamento do composto iônico de rutênio **1** observado neste trabalho é totalmente compatível com a descrição acima.

Para o composto de coordenação **2**, as moléculas de água de hidratação são perdidas a 135 °C (6% em massa, correspondendo a quatro moléculas de água). Para análogos de zinco(II), esta perda ocorreu em 140 °C.^{153c} Aparentemente, a coordenação promove alguma estabilidade térmica à ciprofloxacina, uma vez que a sua decomposição começa acima de 300 °C, um valor superior ao observado para a ciprofloxacina livre e para o composto iônico **1**. No entanto, a característica mais importante que emerge da análise térmica é a temperatura na qual ocorre a perda de moléculas de água de hidratação. Para o composto iônico **1** isto ocorre a 60 °C, sinalizando para a perda de moléculas de água que

interagem fracamente. Por outro lado, para o composto de coordenação **2**, as moléculas de água de hidratação são perdidas acima de 100 °C, mostrando que neste caso estas moléculas de H₂O estão fortemente ligadas ao composto. De acordo com a discussão apresentada por Turel *et al.*,^{153a} as moléculas de água desempenham um papel importante quando a fluoroquinolona tem sítios em sua estrutura para a formação de ligações de hidrogênio. Em compostos de coordenação típicos como **2**, tanto a função amina no anel de piperazina como o grupo C=O do carboxilato coordenado participam de uma estrutura de ligações de hidrogênio com moléculas de água¹⁵⁴ e esta estrutura é responsável pelo aumento na temperatura para perda de água de hidratação. No caso de compostos iônicos tais como **1**, estes sítios já estão protonados, não estando disponíveis para formar uma rede de ligações de hidrogênio com o solvente, de tal modo que as suas moléculas de água de hidratação são fracamente associadas ao composto, sendo perdidas mais facilmente.

3.2.3 Caracterização espectroscópica e eletroquímica

Os espectros de infravermelho das quinolonas são bastante complicados na região de 2000 a 1000 cm⁻¹, devido aos diferentes grupos funcionais exibidos por esta família de fármacos, e o quadro é mantido no espectro IR de complexos de metais de transição.¹⁵⁵ De modo geral, a literatura traz apenas a atribuição das vibrações mais características. Por exemplo: o estiramento do ácido carboxílico $\nu(\text{COOH})$ (ou $\nu(\text{C=O})_c$) entre 1730-1700 cm⁻¹, o estiramento da piridona $\nu(\text{C=O})_p$ em cerca de 1630 cm⁻¹ e os estiramentos simétrico e antissimétrico do carboxilato $\nu(\text{COO})_s$ entre 1400 - 1280 cm⁻¹) e $\nu(\text{COO})_as$ entre 1650 - 1510 cm⁻¹. Estas duas últimas vibrações são muito úteis, uma vez que o valor de $\Delta\nu(\text{COO})$ permite inferir o modo de ligação da função carboxilato em relação ao íon metálico ($\Delta\nu(\text{COO}) > 200 \text{ cm}^{-1}$ monodentado; $< 100 \text{ cm}^{-1}$ bidentado e $\geq 150 \text{ cm}^{-1}$ em ponte ou iônico).¹⁵⁵ A Tabela 19 traz os principais dados de infravermelho coletados neste trabalho para os compostos **1** e **2**, bem como uma atribuição tentativa. Também apresenta os dados obtidos para ciprofloxacina livre para fins de comparação.

No caso da ciprofloxacina livre, esperava-se observar um forte pico atribuído ao $\nu(\text{C=O})_c$. Na verdade, esta banda foi observada em 1724 cm⁻¹, mas como um pico de baixa intensidade. Isto é compatível com o fato de que a ciprofloxacina usada neste trabalho (Fluka) está na sua forma zwitteriônica, que não exibe a vibração $\nu(\text{C=O})_c$ uma vez que a função ácido carboxílico está desprotonada. Possivelmente, esta banda foi ainda observada devido à presença de uma quantidade residual de ciprofloxacina na sua forma ácida. O

valor observado de $\Delta\nu = 165 \text{ cm}^{-1}$ (próximo a 150 cm^{-1}) também corrobora a predominância do fármaco em sua forma iônica. No caso do composto iônico **1**, que foi isolado a partir de meio ácido, o espectro IR exibe o $\nu(\text{C=O})_c$ como um pico intenso em 1709 cm^{-1} e o composto de coordenação **2**, como esperado, não exibe esta vibração, já que apresenta o grupo carboxilato e não a função ácido. Em todos os casos estudados neste trabalho, o $\nu(\text{C=O})_p$ ocorre em sua faixa típica de frequência entre 1620 e 1630 cm^{-1} .

Tabela 19. Atribuição tentativa dos principais picos observados nos espectros de infravermelho dos compostos $[\text{Ru}(\text{cipro})_3].4\text{H}_2\text{O}$; ciprofloxacina livre (na forma de cloridrato) e $[\text{cipro}]_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$, obtidos a partir de pastilhas de KBr

	$\nu(\text{C=O})_p$	$\nu(\text{COOH})$	$\nu(\text{COO})_{as}$	$\nu(\text{COO})_s$	$\Delta\nu_{(\text{COO})} / \text{cm}^{-1}$
$[\text{Ru}(\text{cipro})_3].4\text{H}_2\text{O}$	1630	-	1608	1382	226
Ciprofloxacina	1620	1724	1542	1377	165
$[\text{cipro}]_3[\text{RuCl}_6].3\text{H}_2\text{O}$	1626	1709	1608	1385	223

Em relação ao modo de coordenação da ciprofloxacina no complexo **2**, nossos dados indicam que o carboxilato é coordenado de forma monodentada ($\Delta\nu = 226 \text{ cm}^{-1}$). Isto é coerente com outros exemplos de literatura, nos quais se tem demonstrado (também com base em resultados de raios-X^{155a}) que o modo de coordenação mais comum para esta classe de compostos metal-quinolona é a quelação do íon central por um átomo de oxigênio do carboxilato e pelo átomo de oxigênio da piridona. O valor encontrado para o composto **1**, $\Delta\nu = 223 \text{ cm}^{-1}$, também sugere uma coordenação monodentada. Na ausência de dados de difração de raio-X de monocristal, não é trivial atribuir o modo de coordenação de maneira inequívoca. Contudo, no composto **1** o carboxilato está protonado e a protonação pode simular a coordenação para um íon metálico.

O espectro eletrônico do composto **1** em DMSO é dominado por transições intensas características de ciprofloxacina na região do UV (283 nm , $\epsilon = 144978 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 319 nm , $\epsilon = 39393 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e 332 nm , $\epsilon = 37433 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), atribuídos a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$. Já o espectro eletrônico do composto **2** em solução de DMSO também apresenta as bandas características das transições de ciprofloxacina ($\pi \rightarrow \pi^*$ em 276 nm , $\epsilon = 119087 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $n \rightarrow \pi^*$ em 314 nm , $\epsilon = 38382 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e um ombro largo e de baixa intensidade que foi observado na região entre 400 e 500 nm . Presumivelmente, bandas d-d ou de transferência de carga ficam encobertas pelas transições fortes da ciprofloxacina.

O perfil eletroquímico de ambos os compostos é bastante semelhante (Figura 65), embora eles apresentem importantes mudanças nos valores $E_{1/2}$ dos processos observados. O composto **1** apresenta um par de ondas quase reversíveis em -0,11 V (EPH), que foi atribuído ao par redox $\text{Ru}^{+3/+2}$. Este par redox foi observado em -0,25 V (EPH) para o composto **2**. De fato, esta variação negativa é esperada quando se passa do composto iônico para o composto de coordenação, uma vez que neste último caso o ácido duro Ru(III) deve ser estabilizado pela coordenação para os átomos de oxigênio do ligante ciprofloxacina, que são bases duras. Assim, a coordenação deve tornar a redução do íon central mais difícil de ocorrer.

Figura 65. Voltamogramas cíclicos dos complexos (a) $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_3]_3[\text{RuCl}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e (b) $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3)_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em solução $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ em $0,1 \text{ M TBAPF}_6$, DMSO.

Fonte: adaptado da referência 148.

As duas ondas irreversíveis observadas em ambos os voltamogramas na região negativa são consistentes com o comportamento previamente apresentado por Saha,¹⁵⁶ que observou duas reduções para ciprofloxacina: a primeira atribuída à redução irreversível da piperazina e a outra atribuída à redução centrada na piridona. O aspecto interessante é que para o composto **2**, onde as moléculas de ciprofloxacina são coordenadas ao ácido de Lewis Ru(III), os valores de potencial de redução ($E_{1/2} = -0,85 \text{ V}$ e $-1,45 \text{ V}$ vs EPH) são menores do que os valores observados para o composto **1** ($E_{1/2} = -0,92 \text{ V}$ e $-1,56 \text{ V}$ vs EPH). Este fato é consistente com a remoção da densidade eletrônica dos ligantes de ciprofloxacina pelo íon rutênio no composto **2** (como já observado na determinação dos valores de pKa), facilitando os processos de redução desta ciprofloxacina que, uma vez coordenada, fica pobre em densidade de elétrons.

3.2.4 Dependência do comportamento dos compostos com variação dos valores de pH

Os espectros eletrônicos de ambos os compostos em solução aquosa a diferentes valores de pH: pH 1,5 (estômago), pH 7,4 (fisiológico) e pH 8,0 (intestino) foram investigados (Figura 66). Os perfis de espectro dos compostos **1** e **2** são dependentes do pH, devido aos diferentes graus de protonação que a ciprofloxacina tem em cada situação. Em pH 1,5, a ciprofloxacina é protonada e a pH 7,4 e 8, a ciprofloxacina não é protonada em todos os compostos. Portanto, os perfis dos espectros apresentam pequenas diferenças devido ao fato de que as espécies químicas presentes em solução são dependentes do pH.

Figura 66. Espectros eletrônicos do composto (a) $[C_{17}H_{19}FN_3O_3]_3[RuCl_6].3H_2O$ e (b) $[Ru(C_{17}H_{17}FN_3O_3)_3].4H_2O$ em solução $5,0 \times 10^{-6}$ M de HCl, pH 1,5; tampão PBS, pH 7,4 e solução de NaOH, pH 8,0.

Fonte: adaptado da referência 148.

Os compostos **1** e **2** também foram incubados em pH estomacal (1,5) a 37 ° C para testar a sua estabilidade e eventuais variações no pH do meio (Figura 67). Como se pode ver, os compostos são estáveis, uma vez que não existem variações significativas dos valores de pH durante o período de incubação nem ocorre precipitação, sinalizando para a manutenção de sua estrutura. Para o composto **2**, que é muito solúvel em meio aquoso, foi avaliada também sua estabilidade em água e em pH fisiológico (tampão fosfato) (dados apresentados no arquivo CAP3_aSI.pdf), observando-se que o composto é estável por um período de pelo menos 48 Horas.

Figura 67. Variação de pH com o tempo observada para os complexos $[Ru(C_{17}H_{17}FN_3O_3)_3].4H_2O$ ($8.0 \times 10^{-6} M$) e $[C_{17}H_{19}FN_3O_3]_3[RuCl_6].3H_2O$ ($2.5 \times 10^{-4} M$) em solução de HCl, pH = 1,5; 37 °C.

Fonte: Adaptado da referência 148.

3.2.5 Avaliação da interação do composto 2 com o ctDNA

Embora seja conhecido que complexos de rutênio tem afinidade por uma variedade de biomoléculas, a molécula de DNA é um alvo clássico para esses complexos, especialmente se a intenção é que o candidato tenha atividade contra câncer. Portanto, na avaliação de um candidato à fármaco, é mandatório investigar as possíveis interações do candidato com a molécula de DNA.

Basicamente, o DNA constitui-se de unidade básicas chamadas de nucleotídeos que, por sua vez são compostos por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada, as quais são a adenina, a guanina, a citosina e a timina.¹⁵⁷ A atividade anti-câncer de alguns derivados metálicos tem sido atribuída a danos causados na estrutura do DNA pela interação com complexos metálicos. Essas interações podem ser fracas, como a intercalação de fragmentos aromáticos dos ligantes entre as bases nitrogenadas do DNA. Ou podem ser fortes, com a formação de ligações covalentes como as que ocorrem no caso do exemplo clássico, a chamada “cis-platina” (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]).¹⁵⁸

Sabe-se que a ciprofloxacina apresenta sua ação antibacteriana pela inibição da replicação do DNA, especialmente para os patógenos Gran-negativos,¹⁵⁹ razão pela qual é fundamental estudar a interação dos complexos quinolona-metal com o DNA. Embora se saiba que ambos os grupos carbonilo e carboxilato nas posições C4 e C3, respectivamente, estão envolvidos na interação com o DNA, na maioria dos casos tem sido demonstrado que

a coordenação com um íon metálico envolvendo ambos os grupos não impede a atividade do fluoroquinolona.^{155a} Mais recentemente, um estudo teórico da ciprofloxacina usando métodos DFT mostrou que a função amina protonada (na forma zwitteriônica de ciprofloxacina) é um sítio de formação de ligação de hidrogênio, sugerindo que também pode contribuir para a interação com os sítios ativos de proteínas ou com DNA.¹⁶⁰

A fim de verificar se existe uma interação do composto **2** (que é a espécie solúvel em água) com o ctDNA e avaliar a natureza desta interação, realizou-se uma titulação espectrofotométrica (Figura 68) em uma concentração fixa do composto **2** ($2,29 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e quantidades crescentes de ctDNA ($4,9 \times 10^{-5}$ a $4,9 \times 10^{-4}$ M).

Figura 68. Variação dos espectros UV-vis de (A) $[Ru(cipro)_3].4H_2O$ ($2,29 \times 10^{-5}$ M) com a adição de quantidades crescentes de ctDNA (de $4,9 \times 10^{-5}$ a $4,9 \times 10^{-4}$ M) em tampão fosfato (0,15 M cloreto de sódio e 0,015 M citrato de sódio, pH 7,0). (B) variação de absorbância em 353 nm com adição de ctDNA (C) e duplo recíproco do gráfico de Benesi-Hildebrand

Fonte: Adaptado da referência 148.

Na Figura 68A observa-se um alargamento na banda em 276 nm (atribuída a uma transição do complexo **2**) e um aumento de intensidade nos comprimentos de onda mais baixos devido à adição do *ct*DNA, que tem um máximo de absorção na região do UV. Apesar da sobreposição das bandas de absorção do complexo e do DNA, também é observado um deslocamento batocrômico da absorção do *ct*DNA, conduzindo ao ombro entre 290 e 300 nm. Esta observação permite concluir que há uma interação entre o *ct*DNA e o complexo **2**. Relatos anteriores da literatura mostram que os deslocamentos para o vermelho são devidos a uma interação de intercalação envolvendo o empilhamento- π dos cromóforos aromáticos dos ligantes e os pares de bases do DNA.^{149, 161} A força de ligação do complexo **2** ao *ct*DNA foi avaliada calculando a constante de ligação intrínseca K_b , que foi obtida a partir da inclinação do gráfico de Benesi-Hildebrand (Figura 68A).¹⁶¹ O valor observado de $K_b = 2,47 (\pm 0,89) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ sugere uma interação relativamente forte e está na mesma faixa observada para outros complexos metálicos com ciprofloxacinato.¹⁴⁹ Mesmo para compostos de rutênio com outros ligantes em sua esfera de coordenação (tais como fenantrolinas modificadas e derivados de imidazol¹⁶²), as constantes de ligação ao DNA determinadas por métodos espectroscópicos, tipicamente caem no Intervalo entre 10^4 a 10^5 molL^{-1} . Em todos os casos, tanto quanto para o composto **2**, a hidrofobicidade dos ligantes parece ser o aspecto principal promovendo o processo de intercalação (que é fundamentalmente baseado em interações de natureza π). No entanto, é interessante ressaltar que, para um novo composto cobre – ciprofloxacina,¹⁶³ os autores afirmam que a carga positiva do íon de coordenação auxilia a interação fármaco - DNA por meio da atração eletrostática ao esqueleto de fosfato do DNA.

3.2.6 Considerações parciais

Dois novos complexos de rutênio-ciprofloxacina foram obtidos por duas vias sintéticas simples e distintas. A caracterização voltamétrica dos complexos mostra que o íon rutênio é estabilizado em sua forma Ru(III) pela coordenação com a ciprofloxacina, com baixo potencial de oxidação. Devido a esta estabilização, a redução da ciprofloxacina também é facilitada. Uma comparação entre os complexos obtidos a partir das duas abordagens sintéticas mostra que estes produtos têm duas estruturas distintas que devem ter implicações importantes do ponto de vista da sua potencial aplicação como metalofármacos. O "verdadeiro" composto de coordenação $[\text{Ru}(\text{cipro})_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ é totalmente solúvel em água, o que deve melhorar sua biodisponibilidade. Outra característica

importante é que estes compostos são estáveis sob pH fisiológico e estomacal. Uma investigação preliminar sobre a interação do composto **2** e o *ct*DNA mostra que o complexo se liga ao DNA ($K_b \sim 10^4$), possivelmente por uma interação de intercalação, como sugerido pelos perfis dos espectros UV-visível.

3.3 Um complexo homoléptico de rutênio combinado à norfloxacin e sua interação com a albumina do soro humano

Os dados apresentados neste item correspondem aos arquivos CAP3_bMS.pdf e CAP3_bSI.pdf e a estrutura do composto investigado é apresentada na Figura 69.

Figura 69. Estrutura proposta para o complexo $[Ru(nor)_3]$.

Fonte: Adaptado da referência 164.

A síntese foi realizada de acordo com Chattah et al.¹⁶⁵ Em um frasco de 25 mL, dissolveu-se 0,1094 g de $RuCl_3$ (0,48 mmol) e 0,4474 g de norfloxacin (1,4 mmol) em 15 mL de água. A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecida sob refluxo durante 3 horas. A solução foi resfriada até à temperatura ambiente e filtrada. Em seguida, foram adicionados 200 ml de acetona ao filtrado, quando ocorre a precipitação de um sólido castanho. O produto foi isolado por filtração, dissolvido em um volume mínimo de água e depois purificado por cromatografia de exclusão em coluna com fase estacionária

Sephadex G-10. Este procedimento produziu $m = 0,0517$ g ($\eta = 10,2\%$). Análise elementar $[\text{Ru}(\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3)_3]$: calc. H 4,9, C 54,5, N 11,9; encontrado H 5,0, C 53,1, N 12,1.

Como foi dito anteriormente, os complexos metálicos combinados com fluoroquinolonas são tipicamente caracterizados por meio de difratometria de raio-X.¹⁶⁶ No nosso caso, na ausência de um cristal adequado, realizou-se a caracterização estrutural do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ utilizando espectrometria ESI - HRMS e espectroscopia IR. A Figura 70 apresenta a correspondência entre o padrão isotópico observado para o íon molecular protonado $[\text{Ru}(\text{nor})_3]\cdot\text{H}^+$ e o padrão teórico.

Figura 70. Íon molecular observado para o composto $[\text{Ru}(\text{nor})_3]\cdot\text{H}^+$ no espectro ESI MS registrado a partir de mistura 1 H_2O : 1 CH_3CN , superposto com a distribuição isotópica calculada.

Fonte: Adaptado da referência 164.

No espectro ESI-HRMS do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$, existe um conjunto de íons isotopólogos centrados em m/z 1057.3, atribuídos ao complexo protonado $[\text{Ru}(\text{nor})_3]\cdot\text{H}^+$. A multiplicidade isotópica é característica da presença do átomo de rutênio, que é um elemento isotópico múltiplo.¹⁵¹ O valor de $\Delta m/z$ é um, confirmando a carga +1 para este fragmento. Observou-se também no espectro MS / MS do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$, picos centrados em m/z 958,4 e 639,3 e seu padrão isotópico coincide com o do carbono. Este comportamento já foi observado por nós anteriormente, para o composto $[\text{Ru}(\text{cipro})_3]$. Estes picos foram atribuídos como a espécie monovalente formada pela protonação de adutos em fase gasosa formados por três moléculas de norfloxacin (Hnor₃.H⁺) e por duas moléculas de norfloxacin (Hnor₂.H⁺), respectivamente, oriundas de fragmentação na fonte

do complexo de coordenação (a expansão dos picos centrados em m/z 958,4 e 639,3 está disponível como informação suplementar no arquivo CAP3_bSI.pdf).

As quinolonas e fluoroquinolonas possuem espectros complexos na região do infravermelho, devido à presença de diferentes grupos funcionais em sua estrutura. As bandas mais estudadas são aquelas que correspondem aos grupos carbonílicos da piridona $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ ao redor de 1630 cm^{-1} e do ácido carboxílico $\nu(\text{COOH})$, em torno de 1725 cm^{-1} .^{1, 155a} Esta última banda tende a desaparecer em complexos metálicos com quinolonas porque, para se coordenar ao íon metálico, o grupo carboxílico está desprotonado. Esta ideia é suportada por estudos de cristalografia de raios X de alguns complexos quinolona-metal que mostram que a maioria destes complexos têm a quinolona coordenada ao íon metálico através do oxigênio da piridona e outro átomo de oxigênio do grupo carboxilato, conforme discutido no item 3.2.2 deste texto. O espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ (Figura 71) mostra uma banda intensa em 1633 cm^{-1} , atribuída à piridona $\nu(\text{C}=\text{O})_p$. A região do $\nu(\text{COOH})$ é limpa, confirmando a coordenação da norfloxacinina ao íon rutênio.

Figura 71. Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})]_3$ obtido a partir de pastilhas de KBr

Fonte: adaptado da referência 164.

Outras informações importantes obtidas a partir de espectros na região do infravermelho dizem respeito ao modo de coordenação da fluoroquinolona com o íon rutênio. Os carboxilatos podem coordenar com um íon metálico como ligantes

monodentados ou bidentados. Neste último caso, podem quelar um único centro metálico ou pode atuar como uma ponte entre dois centros. O modo de coordenação pode ser identificado pela diferença entre as frequências dos estiramentos antissimétrico e simétrico dos grupos R-COO^- , isto é, $\Delta\nu(\text{COO}^-) = [\nu(\text{COO})_{\text{as}} - \nu(\text{COO})_{\text{s}}]$, conforme discutido no item 3.2.2.^{69, 167}

No caso do complexo de norfloxacin, as bandas $\nu(\text{COO})_{\text{as}}$ e $\nu(\text{COO})_{\text{s}}$ foram observadas em 1578 cm^{-1} e 1383 cm^{-1} , respectivamente, resultando em $\Delta\nu(\text{COO}^-) = 195\text{ cm}^{-1}$. Esta observação corrobora a estrutura proposta na Figura 69, em que o carboxilato apresenta um modo de coordenação monodentado.

Os espectros de UV-visível das fluoroquinolonas mostram uma banda de absorção característica entre 300 e 380 nm atribuída às transições $n-\pi^*$. Essas transições podem aparecer resolvidas em dois "sub-picos", um dos quais ocorre quando a fluoroquinolona possui ligação de hidrogênio intermolecular com moléculas de água (solvente) e a outra quando a fluoroquinolona forma uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de oxigênio da piridona e o grupo OH da função ácido. Um segundo máximo é observado entre 240 e 300 nm (transições $\pi-\pi^*$) devido à absorção dos anéis aromáticos.¹⁶⁸

O espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ em água (Figura 72) é compatível e mostra as bandas características na região UV em 273 nm ($\epsilon = 102.000\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e em 334 nm ($\epsilon = 32.100\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ respectivamente. Possivelmente a cauda da transição $n-\pi^*$ está superposta com as transições originadas da combinação do fármaco com o centro de metal e as transições d-d.

Figura 72. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$, em água ($7.5 \times 10^{-6}\text{M}$).

Fonte: Adaptado da referência 164.

É bem conhecido que a excitação da HSA em 280 nm promove a emissão de fluorescência de resíduos de triptofano e tirosina em aproximadamente 330-340 nm e o estudo de sua supressão tem sido útil no estudo das interações da HSA com fármacos de interesse.^{166b,c, 169} A Figura 73A ilustra um gráfico representativo da supressão da fluorescência da HSA pela adição de quantidades crescentes do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$. A banda em 425 nm é devida à emissão intrínseca do composto $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$. A Figura 73B mostra os gráficos de Stern-Volmer, obtidos conforme os procedimentos e equações descritas no item 1.5.2 deste texto.

Figura 73. (A) Espectros de fluorescência da HSA na presença de concentrações crescentes de $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$, obtidos após períodos de 5 minutos de incubação. (B) Gráficos de Stern-Volmer para o sistema HSA- $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ em diferentes temperaturas, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$

Fonte: Adaptado da referência 164.

A Tabela 20 mostra os valores de K_{sv} (constante de Stern-Volmer) e também os valores de k_q , considerando $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ como o valor para o tempo de vida do estado excitado da HSA.

Tabela 20. Constantes de Stern-Volmer para o sistema HSA- $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ em diferentes temperaturas

T (K)	$K_{\text{sv}} (\text{L mol}^{-1})$	$k_q (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})$	R
298	1.68×10^4	1.68×10^{11}	0.979
303	2.49×10^4	2.49×10^{11}	0.992
308	5.20×10^4	5.20×10^{11}	0.934

A magnitude da constante K_{sv} concorda com dados de literatura para compostos semelhantes.^{169d, 170} Observa-se também um aumento nos valores de K_{sv} com o aumento da temperatura, característica do mecanismo dinâmico de supressão.^{92c, 169c} No entanto, os valores de k_q são uma ordem de grandeza maior do que o coeficiente de difusão considerado médio dos supressores ($2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sinalizando também para a contribuição da supressão estática.

Considerando-se então essa contribuição, calculou-se a constante de ligação K_b para o sistema HSA-[Ru(nor)₃]. Quando as moléculas se ligam independentemente a sítios equivalentes numa macromolécula, o equilíbrio entre moléculas livres e ligadas é dado pela equação:

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

onde K_b é a constante de ligação aparente entre o supressor e a HSA e n é o número de potenciais sítios de ligação na estrutura da HSA.¹⁷¹

De acordo com a literatura, os valores de K_b de sistemas onde a HSA está presente ocorrem na faixa entre 10^4 e 10^6 L mol^{-1} .^{92c, 169d,e, 170a,b,d, 171, 172} Valores de K_b baixos significam que a interação entre uma determinada espécie química e uma proteína de transporte é fraca, levando a uma distribuição mais pobre no plasma sanguíneo. Por sua vez, altos valores de K_b refletem baixas concentrações de espécies livres no plasma sanguíneo.¹⁶⁸

Os valores de K_b observados neste trabalho (Tabela 21) são compatíveis com a literatura e permitem inferir que a proteína é capaz de transportar o composto em questão.^{92c, 169d,e, 170a,b,d, 171, 172} Já os valores de n para todas as temperaturas estão próximos da unidade, sugerindo a relação 1:1 na interação deste complexo com a HSA.

Tabela 21. Constantes de ligação K_b e estequiometria da interação do sistema HSA-[Ru(nor)₃] em diferentes temperaturas

T (K)	$K_b (\text{L mol}^{-1})$	n	R
298	4.2×10^4	1.18	0.999
303	1.2×10^4	1.15	0.998
308	0.14×10^4	0.91	0.999

Neste ponto é preciso mencionar que, embora útil, a análise de Stern-Volmer baseada exclusivamente em intensidades de fluorescência pode não ser suficiente para

atribuir o mecanismo de supressão. Especialmente para um sistema como o HSA-[Ru(nor)₃], em que o supressor tem emissão intrínseca dentro da faixa de comprimentos de onda de excitação da proteína (Figura 73A). Para um sistema HSA-supressor, a melhor maneira de distinguir o mecanismo de supressão é através de medidas de tempo de vida do estado excitado envolvido. A formação de um aduto HSA-supressor no estado fundamental da albumina remove uma fração da espécie luminescente que está originalmente sendo monitorada (HSA livre). O resultado líquido é uma diminuição da intensidade da fluorescência monitorada. No entanto, a fração de HSA não complexada não é perturbada, e, portanto, seu tempo de vida permanece constante e igual a τ_0 .^{92c,173}

No nosso caso, medidas de tempo de vida foram realizadas em 298 e 310 K. A 298 K, não foi observada mudanças no tempo de vida do fluoróforo com a adição de [Ru(nor)₃]. Conforme discutido acima, valores de tempo de vida inalterados são característicos do mecanismo de supressão estático. Esta característica é observada a 298 K, levando à conclusão de que o mecanismo de supressão de fluorescência é predominantemente estático nesta temperatura.

No entanto, a 310 K há uma diminuição nos valores de tempo de vida do estado excitado do fluoróforo com o aumento da concentração do supressor (Figura 74), sugerindo a predominância do mecanismo dinâmico para temperaturas mais altas. A supressão dinâmica depende da difusão. Em temperaturas mais altas, coeficientes de difusão aumentam e a constante de supressão bimolecular (k_q) consequentemente também aumenta (as curvas exponenciais de decaimento da fluorescência da HSA estão disponíveis no arquivo CAP3_bSI.pdf). Portanto, conclui-se que ambos os mecanismos contribuem.

Para concluir a análise, a partir dos valores dos parâmetros termodinâmicos inferimos inferiu-se os modos de interação que podem ocorrer entre a HSA e o complexo [Ru(nor)₃]. A Tabela 22 apresenta estes parâmetros, obtidos a partir do gráfico de van't Hoff, disponível no arquivo CAP3_bSI.pdf.

Tabela 22. Parâmetros termodinâmicos para o sistema HSA-[Ru(nor)₃]

T (K)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
298			-26.37
303	-259.2	-779.9	-23.66
308			-18.55

Figura 74. Variação nos valores de tempo de vida de fluorescência da HSA com adição de quantidades crescentes de $[Ru(nor)_3]$ a 310K, em tampão fosfato

Fonte: Adaptado da referência 164.

Em geral, quatro forças são responsáveis pela interação de uma determinada espécie e uma proteína: interação eletrostática, forças de van der Waals e forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.¹⁷⁴ O cálculo dos parâmetros termodinâmicos, a partir da equação de van't Hoff nos permite inferir quais deles ocorrem entre a HSA e o supressor.

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^\theta}{RT} + \frac{\Delta S^\theta}{R}$$

onde K_b é a constante de ligação, T é a temperatura em Kelvin, R é a constante dos gases ($8.31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); ΔH é a mudança de entalpia e ΔS é a mudança de entropia do sistema. Para o cálculo da mudança de energia livre, é utilizada a equação:

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

A partir da Tabela 22 pode-se observar que a interação entre HSA e o complexo $[Ru(nor)_3]$ é espontânea, uma vez que os valores de ΔG são negativos. Por outro lado, os valores negativos de ΔH e ΔS são característicos da formação de ligações de hidrogênio e / ou a presença de interações mediadas por forças de van der Waals.¹⁷⁵ Essa observação é consistente com a estrutura do complexo $[Ru(nor)_3]$, que fornece sítios eletronegativos

(átomos de flúor e oxigênio) para a formação de ligações de hidrogênio e os grupos etilo para as interações de van der Waals.

3.3.1 Considerações parciais

A síntese e caracterização de um novo complexo de rutênio combinado com três moléculas de norfloxacin foram apresentadas. A coordenação com o rutênio influencia solubilidade da fluoroquinolona, sendo o complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3]$ totalmente solúvel em água. Este aspecto deve ter implicações importantes e positivas para as aplicações biológicas potenciais do composto.

As caracterizações estruturais e espectroscópicas são compatíveis com a formulação e estrutura propostas para o composto. A partir dos espectros ESI - HRMS observou - se o íon molecular correspondente à espécie $[\text{Ru}(\text{nor})_3]\cdot\text{H}^+$, enquanto os espectros de infra - vermelho permitiram atribuir o modo de coordenação da norfloxacin ao Ru(III). Além disso, o espectro eletrônico é consistente com o esperado, sendo dominado pelas absorções de norfloxacin na região UV.

Com relação à interação com HSA, nossos dados mostram que ambos os mecanismos dinâmico e estático contribuem para a supressão da luminescência da HSA. A partir de medidas de tempo de vida, observou-se que a temperaturas mais baixas prevalece o mecanismo estático de supressão, sinalizando para a formação de um aduto não luminescente no estado fundamental da HSA. Com o aumento da temperatura, como esperado, o mecanismo de supressão dinâmica tende a predominar. Finalmente, a partir dos parâmetros termodinâmicos obtidos, nossos dados sugerem a formação de ligações de hidrogênio e / ou a ocorrência de interações de van der Waals, o que é consistente com a estrutura da norfloxacin.

CAPÍTULO 4

4 OUTROS TRABALHOS

Neste item pretendo apenas elencar outros trabalhos publicados no período após minha contratação, e fazer um breve comentário que os localize no todo do meu trabalho. Para facilitar esta tarefa, idealizei a tabela abaixo que agrupa esses trabalhos não em ordem cronológica, mas sim em função de sua temática.

Tabela 23. Trabalhos publicados após minha contratação na Universidade de São Paulo que não serão explorados nos demais capítulos deste texto

Trabalhos	Referências
1	<ul style="list-style-type: none"> a. Toma, S. H.; Santos, J. J.; Nikolaou, S.; Araki, K.; Toma, H. E.; Direct assembly of a metallodendrimer encompassing seven triruthenium clusters units. <i>Inorganica Chimica Acta</i>, v. 390, p. 148-153, 2012. b. Nikolaou, S.; Toma, S. H.; Souza, V. R.; Bonacin, J. A.; Araki, K.; Toma, H. E.; Triangular ruthenium acetate clusters containing the bis(pyridyl)propane ligand and their inclusion chemistry with β-cyclodextrin. <i>Transition Metal Chemistry</i>, v. 36, p. 775-783, 2011. c. Nikolaou, S.; Formiga, A. L. B.; Toma, H. E.; Probing the electronic delocalization in a cyclic pyrazine ruthenium cluster hexamer. <i>Inorganic Chemistry Communications</i>, v. 13, p. 1032-1035, 2010. d. Nikolaou, S.; Toma, H. E.; A convergent approach for the generation of dendrimers containing the $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ Electroactive core. <i>European Journal of Inorganic Chemistry</i>, v. 14, p. 2266-2271, 2008. e. Nikolaou, S.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N.; Toma, H. E.; Synthesis and characterization of the $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{bpe})\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}](\text{PF}_6)_2$ dimer. <i>Transition Metal Chemistry</i>, v. 33, p. 1059-1065, 2008. f. Eberlin, M. N.; Tomazela, D. M.; Araki, K.; Alexiou, A. D. P.; Formiga, A. L. B.; Toma, H. E.; Nikolaou, S.; Electrospray ionization tandem mass spectrometry of polymetallic oxo- and carboxylate-bridged $[\text{Ru}_3\text{O}]$. <i>Organometallics</i>, v. 25, p. 3245-3250, 2006. g. Toma, H. E.; Nikolaou, S.; Eberlin, M. N.; Tomazela, D. M.; Synthesis, properties and gas phase collision-induced dissociation the heptanuclear bridged complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpe})_2\{\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2\}_2](\text{PF}_6)_4$. <i>Polyhedron</i>, v. 24, p. 731-738, 2005.
2	<ul style="list-style-type: none"> a. Vidal, R. S.; Doro, F. G.; Ferreira, K. Q.; Rocha, Z. N.; Castellano, E. E.; Nikolaou, S.; Tfouni, E.; Cis-trans isomerization in the syntheses of ruthenium cyclam complexes with nitric oxide. <i>Inorganic Chemistry Communications</i>, v. 15, p. 93-96, 2012. b. de Carvalho, A. N.; Fornari, E. C.; Gomes, W. R.; Araújo, D. M. S.; Machado, A. E. H.; Nikolaou, S.; The bimolecular sensitization of nitric oxide release from weak interacting ruthenium units. <i>Inorganica Chimica Acta</i>, p. 444-448, 2011. c. Fornari, E. C.; Marchesi, M. S. P.; Machado, A. E. H.; Nikolaou, S.; Exploring weak interactions to assemble a nitrosyl ruthenium compound able to release no under visible light irradiation. <i>Polyhedron</i>, p. 1121-1126, 2009. d. de Oliveira, A. R. M.; Oliveira, F. M.; de Santana, D. C. A. S.; Nikolaou,

	S.; Bonato, P. S.; Silva, R. S.; HPLC separation, NMR and QTOF/MS/MS structure elucidation of a prominent nitric oxide donor agent based on an isomeric composition of a nitrosyl ruthenium complex. <i>Inorganic Chemistry Communications</i> , v. 12, p. 343-346, 2009.
3	<ul style="list-style-type: none"> a. de Oliveira, R. S.; Boffo, E. F.; Reis, F. C. C.; Nikolaou, S.; Andriani, K. F.; Caramori, G. F.; Doro, F. G.; A ruthenium polypyridyl complex with the antihypertensive drug valsartan: synthesis, theoretical calculations and interaction studies with human serum albumin. <i>Polyhedron</i>, v. 114, p. 232-241, 2016. b. Cardoso, F. P.; Aquino, N. S.; Crepaldi, L. B.; Nikolaou, S.; Barros, V. P.; Andrade, A. R.; Biocathodes for enzymatic biofuel cells using laccase and different redox mediators entrapped in polypyrrole matrix. <i>Journal of the Electrochemical Society</i>, v. 161, p. 445-450, 2014. c. Gusso, M. R.; Uemi, M.; Donato, P. M.; Nikolaou, S.; Machado, A. E. H.; Okano, L. T.; Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins. <i>The Journal of Physical Chemistry A</i>, v. 110, p. 10545-10551, 2006. d. Ferreira, K. Q.; Cardoso, L. N.; Nikolaou, S.; Rocha, Z. N.; Silva, R. S.; Tfouni, E.; Solvent dependent conformational isomerism and ligand oxidation of novel Ru(II) cyclen complexes. <i>Inorganic Chemistry</i>, v. 44, p. 5544-5546, 2005.
4	<ul style="list-style-type: none"> a. Dias, Karina; Nikolaou, S.; Giovani, W. F.; The in vitro antioxidant properties of the Al-quercetin/βcd and Al-catechin/βcd inclusion compounds, rationalized in terms of their electrochemical behaviour. <i>Medicinal Chemistry Research</i>, v. 21, p. 2920-2925, 2012. b. Dias, K.; Nikolaou, S.; Does the combination of resveratrol with Al(III) and Zn(II) improve its antioxidant activity?, <i>Natural Products Communications</i>, v. 6, p. 1673-1676, 2011. c. Moreira, E. Z.; Ferreira, A. D. Q.; Neri, C. R.; Mukhopadhyay, S.; Dovidauskas, S.; Nikolaou, S.; Iamamoto, Y.; Syntheses, electrochemistry and photophysical properties of a series of meso-pyridylpentafluorophenylporphyrins. <i>Journal of Porphyrins and Phthalocyanines</i>, v. 14, p. 975, 2010. d. Moreira, E. Z.; Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N.; Iamamoto, Y.; Nikolaou, S.; The use of electrospray ionization tandem mass spectrometry on the structural characterization of novel asymmetric metallo-organic supermolecules, based on pentafluorophenylporphyrins and ruthenium complexes. <i>Polyhedron</i>, v. 27, p. 2721-2729, 2008. e. Dias, K.; Nikolaou, S.; Giovani, W. F.; Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/beta-cyclodextrin and Al(III) quercetin/beta-cyclodextrin inclusion compounds. <i>Spectrochimica Acta. part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy</i>, v. 70, p. 154-2008, 2008.

Os trabalhos 1a-g são, em sua totalidade, relacionados ao meu doutorado. Ou seja: embora tenham sido escritos e publicados ao longo de sete anos após minha contratação, se referem a experimentos integralmente realizados no Instituto de Química de USP, SP, nos anos de 1997 a 2002. A grande maioria destes trabalhos se refere à Química Supramolecular (exceto o artigo 1f). Alguns são dados que constam de minha tese de doutorado (1c-e; g) e os demais são frutos de contribuições variadas que dei em outros

trabalhos. Destaque para o trabalho 1f, que proporcionou o início do uso da espectrometria de massas em minha linha de pesquisa.

Os trabalhos agrupados sob o rótulo 2 se referem aos nitrosilos, porém focando complexos mononucleares de rutênio. Nos trabalhos 2a e 2d, fui apenas colaboradora e trabalhei na parte de elucidação estrutural dos complexos e seus isômeros a partir das técnicas de RMN e ESI MS.

Os trabalhos 2b e 2c são fruto de dois estágios de iniciação científica, ambos financiados com bolsa FAPESP, orientados na FCFRP. Em ambos procurei demonstrar que era possível promover o arranjo supramolecular em solução de complexos nitrosilos a partir de interações fracas, a fim de promover a liberação fotoinduzida do NO em comprimentos de ondas maiores. A discussão central aqui era a seguinte: complexos de coordenação têm características de cinética de liberação e de controle de liberação (estímulo redox ou luminoso) muito adequadas para a finalidade de liberação controlada de óxido nítrico. No entanto, em se tratando de fotoliberação, as bandas de transferência de carga que sensibilizam a dissociação do NO ocorrem em energias muito altas, em comprimentos de onda muito fora da chamada janela terapêutica (idealmente entre 600nm e 800nm). Sendo assim, houve um período inicial (década de 90 do século passado) em que os trabalhos se preocupavam apenas em descrever a liberação fotoinduzida de NO em condições que eventualmente permitissem a utilização dos complexos de coordenação, tais como meio aquoso, pH fisiológico, etc. Como desdobramento, passou-se a realizar testes de atividade biológica em que se mostrava a efetiva viabilidade dos sistemas, especialmente para câncer tipo melanoma, ainda que a irradiação dos fotosensibilizadores fosse realizada em comprimentos de onda do ultra-violeta. Contudo, muito rapidamente passou-se para a fase em que os pesquisadores buscavam estratégias para sensibilizar a fotoliberação do NO a partir dos complexos em comprimentos de onda maiores, idealmente dentro da janela terapêutica. Na época em que os trabalhos 2b e 2c foram desenvolvidos, esse era um dos temas centrais na literatura. No entanto, entre a idealização do uso dessa estratégia (apresentada como uma das frentes de trabalho de meu primeiro auxílio regular da FAPESP, processo 2005/01069-8), a orientação efetiva dos estágios de IC (algo entre 2006-2008, pois ambas as estagiárias foram bolsistas PIBIC e depois FAPESP) e o fechamento dos trabalhos, com escrita e publicação dos mesmos, perdeu-se o “*timing*” e, quando ambos foram publicados, já havia na literatura a descrição de sistemas mais promissores. Este exemplo é bastante importante para mostrar as dificuldades inerentes de se trabalhar apenas com alunos de Iniciação Científica (que era o meu caso na

época). É possível desenvolver ideias interessantes, sofisticadas, em suma: trabalhos de qualidade. Mas uma característica invariável dos trabalhos de IC é que demoram um tempo excessivamente longo para se concluírem.

Os trabalhos elencados sob o número 3 são trabalhos nos quais atuei como colaboradora. No trabalho 3a conduzi os estudos de interação do complexo de rutênio em questão com a albumina do soro humano. No trabalho 3b, contribuí com a condução da síntese e caracterização dos complexos de rutênio e ósmio que foram utilizados como mediadores redox dos eletrodos modificados. E, para os trabalhos 3c e 3d, novamente contribuí com a investigação estrutural das moléculas envolvidas, através da realização de experimentos e análise de dados de RMN.

Por fim, os trabalhos agrupados sob o número 4 são fruto da co-orientação de um Mestrado (aluno Emanuel Zimmerman Moreira) e um Doutorado (aluna Karina Dias). O projeto de Mestrado, cuja orientadora principal foi a Prof. Yassuko Iamamoto, do Departamento de Química da FFCLRP, tratou da síntese e caracterização de uma extensa série de porfirinas e porfirinas combinadas a complexos de rutênio (tanto complexos polipiridínicos mononucleares quanto os complexos trinucleares), que por fim renderam esses dois trabalhos. Já os trabalhos oriundos da co-orientação de doutorado (orientador principal Prof. Wagner Ferraresi de Giovani) se situam relativamente longe da minha linha de pesquisa, pois focam a investigação de flavonoides como potenciais ligantes para alguns metais, como o Al(III). Inicialmente minha participação nos trabalhos seria pontual, para contribuir com a caracterização estrutural por RMN dos complexos em questão. Essa participação acabou por se tornar maior, dada a convivência com a doutoranda, o que me levou a supervisionar seu projeto de pós-doutoramento. O trabalho 4b é fruto direto de seu pós-doutorado.

CAPÍTULO 5

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS: LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DA LINHA DE PESQUISA

Conforme ficou caracterizado neste texto, por força da minha contratação inicial na Faculdade de Farmácia, deixei a pesquisa com vistas ao desenvolvimento de sistemas supramoleculares, para me dedicar à investigação de sistemas com possíveis aplicações biológicas.

A literatura mais recente, principalmente a partir da década de 90 do século passado, mostra que os complexos de rutênio têm-se apresentado como alternativas interessantes e promissoras no planejamento de metalo-fármacos. Isso amplia a pesquisa mais “tradicional” nessa área que, de modo geral, foca o estudo de candidatos com metais essenciais ou menos estranhos a um organismo vivo, como ferro, cobalto, cobre e zinco. No caso específico da pesquisa conduzida em meu grupo, procurei manter como eixo principal o estudo de carboxilatos de rutênio.

No caso dos carboxilatos mononucleares de rutênio combinados aos antibióticos da família das fluoroquinolonas, como o norfloxacin e o ciprofloxacina, os alunos envolvidos nos respectivos projetos (os dados reportados aqui correspondem a dois mestrados) enfrentaram muita dificuldade no que diz respeito ao isolamento de complexos homoléticos. Um sem número de sínteses foram testadas, ponderando variáveis como tempo de reação, quantidade relativa de reagentes, solvente, temperatura e pH de soluções aquosas como meio reacional. Em todos os casos foram obtidos sólidos constituídos de misturas complexas e os produtos de interesse apresentaram rendimentos muito baixos após a purificação.

De fato, complexos homoléticos de metais do primeiro período de transição com fluoroquinolonas não são usualmente descritos na literatura. Muito mais comuns são os complexos de esfera de coordenação mista, tanto em estado de oxidação +2 quanto +3, com uma ou duas moléculas de fluoroquinolonas e água ou ligantes piridínicos completando a esfera de coordenação do centro metálico. Muito provavelmente podemos explicar esses fatos a partir da teoria de Pearson: as fluoroquinolonas apresentam um grupo carboxilato e uma função cetona como grupamentos coordenantes. Este ligante, portanto, é um ligante duro e seria um bom ligante para o íon Ru^{+3} . O fato do rutênio estar localizado no segundo período de transição faz com seja relativamente maior e mais mole do que os

metais do primeiro período, fato que nos levou a achar viável a obtenção de complexos homolépticos. O que ocorre, no entanto, é que mesmo dentro da lógica de afinidade termodinâmica duro-duro, o íon Ru^{+3} não apresenta densidade eletrônica suficiente para comportar três ligantes duros. Daí a dificuldade de obtenção de tais complexos: certamente não são as espécies termodinamicamente mais favorecidas. Já quando se coordena um co-ligante como a 2,2'-bipiridina esta, que tem natureza de intermediária à mole, compensa a densidade eletrônica pobre do centro metálico, conferindo estabilidade termodinâmica a complexos heterolépticos.

Posto isto, em trabalhos futuros pretende-se retomar essa vertente, porém objetivando-se a obtenção de complexos de rutênio com esferas de coordenação mista. Ainda não há na literatura muitos exemplos de espécies de rutênio combinado às fluoroquinolonas com as quais se tenha realizado testes de atividade biológica. Este fato motiva a intenção de retomar essa frente de trabalho. Além disso, pretende-se utilizar esta classe de complexos como modelo e obter-se análogos de cobalto visando fazer um contraponto que permita avaliar de maneira realista se há vantagens no uso do rutênio.

No que tange os complexos binucleares com ponte μ -oxo de fórmula geral $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{carb})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$, os resultados apresentados no Capítulo 2 deste texto foram tão inusitados e promissores no que diz respeito à atividade antialérgica do complexo contendo o fármaco cetoprofeno, que este trabalho rendeu o depósito de uma patente já em 2015 (BR1020150190131). Deste modo, julguei importante estender a série de complexos para podermos testar a atividade de uma variedade maior de compostos e então investigar quais aspectos estruturais são determinantes para a atividade. Propus duas novas séries de complexos visando a combinação de outros FAINES, como o flurbiprofeno (um ácido aril-propiónico) ou o ácido acetilsalicílico. Cada série idealizada transformou-se em um projeto de doutorado, que compreendia cerca de seis complexos cada um. Neste caso, tanto quanto no caso dos complexos mononucleares e apesar do trabalho publicado, não fomos bem sucedidos na obtenção das novas séries. Foram tentadas cerca de 60 sínteses sem sucesso, nas quais até conseguíamos obter a unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$. Porém, no momento em que se tentava completar a esfera de coordenação com os ligantes piridínicos, os complexos eram dissociados, com formação de espécies mononucleares. Alternativamente, em alguns casos até obtivemos os complexos de interesse, mas invariavelmente com baixíssimos rendimentos e sem a pureza adequada.

A experiência adquirida com esses dois trabalhos de doutorado me permite fazer as seguintes ponderações: a rota sintética que tentamos seguir é baseada na literatura e

envolve sempre a formação da unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$ e, a partir dela, a formação do complexo de interesse. Embora não tenhamos feito estudos mecanísticos, muito provavelmente há um componente estérico e um componente eletrônico que comprometem a obtenção dos complexos. Em princípio pode haver um impedimento estérico importante entre as duas moléculas de FAINES coordenadas à unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$. Essa possibilidade ganha força quando se considera o fato de que é possível obter estes complexos a partir do precursor chamado “gaiola”, de fórmula geral $[\text{Ru}_2(\text{carb})_4]^n$ (carb=carboxilato que pode ser um FAINE), que é um complexo menos impedido estericamente. É conhecido que, quando se adiciona um ligante piridínico aos complexos gaiola, estes sofrem um rearranjo estrutural e convergem para a respectiva espécie $[\text{Ru}_2\text{O}]$. Portanto, um caminho para a continuidade dos trabalhos, levando em consideração o quão promissor esses sistemas são, é a mudança de rota sintética, passando pela síntese do precursor gaiola. O outro aspecto relevante diz respeito à estrutura eletrônica da unidade $[\text{Ru}_2\text{O}]$. Em 2014 foram realizados cálculos de DFT que modelaram esta unidade buscando compatibilidade com o diagrama de orbitais moleculares proposto na literatura e buscando também uma descrição mais detalhada de suas propriedades. O que ficou demonstrado foi que essa unidade é extremamente ácida. Quando se combina o ligante cianeto (que tipicamente retira densidade eletrônica de complexos por fazer retrodoação), a unidade metálica funciona como aceptora de densidade eletrônica e o ligante cianeto como doador de densidade eletrônica. De posse desta informação, verificamos que o uso do ligante 4-aminopiridina ao invés da piridina permite que obtenhamos os complexos combinados aos FAINES. A combinação da unidade metálica ácida com um ligante mais básico parece ser mais favorável na medida em que se proporciona uma compensação de densidades eletrônicas. No entanto, até o momento, o grupo não produziu complexos com pureza adequada.

Outros direcionamentos estão encaminhados. Atualmente o grupo está trabalhando com os acetatos, $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$, combinados a ligantes piridínicos, azanaftalenos e fenantrolinas modificadas. Resultados preliminares de atividade antialérgica para os complexos com fenantrolinas mostram que, mesmo na ausência do FAINE, a atividade é mantida. Os novos complexos sob investigação farão um contraponto excelente aos dois sistemas que descrevemos recentemente na literatura (Capítulo 2), a fim de verificar a importância relativa da presença do FAINE na composição dos complexos.

Quando testamos a atividade biológica de complexos de coordenação com variações de ligantes, para um leitor desavisado aparentemente os testes tem um alto grau de aleatoriedade. Ou seja: eventualmente parece que temos uma gama de complexos

disponíveis e simplesmente os testamos, sem nenhum planejamento. No entanto, isso não é verdadeiro. Temos observado em nossos estudos que, de um modo geral, os fragmentos que correspondem aos esqueletos metálicos $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ não são citotóxicos nem tão pouco apresentam as atividades ensaiadas. Os ligantes orgânicos isolados algumas vezes apresentam atividade biológica mas, via de regra, menor do que os respectivos complexos. Nesses complexos, a combinação dos ligantes com o esqueleto metálico melhora a atividade, provavelmente em função do arranjo espacial conferido aos ligantes quando coordenados e, mais importante, as interações com os alvos biológicos relevantes deve ser melhorada em função da modulação mútua de densidades eletrônicas no centro metálico e nos ligantes.

Essa mesma observação é válida quando tratamos dos complexos trinucleares de rutênio. Essa constatação é bastante evidente se levarmos em consideração os resultados de atividade tripanocida para a série de complexos de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$ nos quais L são os ligantes azanaftaleno. No caso dos complexos mais promissores (ou seja, que apresentam valores de IC_{50} inferiores aos do fármaco de referência e altos índices de seletividade) nem o esqueleto metálico sozinho nem o respectivo ligante azanaftaleno apresentam desempenho próximo ao do complexo. E mais, os complexos trinucleares apresentaram desempenho melhor que a maioria dos complexos de rutênio ensaiados para essa atividade, não só pelos seus baixos valores de IC_{50} e altos valores de SI, mas por se mostrarem ativos contra a forma amastigota do parasita causador da doença de Chagas, que é a forma intracelular presente na fase crônica da doença.

Neste ponto se torna necessário então comentar sobre a realização dos testes de atividade biológica. Grosso modo, realizamos ensaios de atividade anti-câncer (citotoxicidade) para células de melanoma murino; ensaios de citotoxicidade utilizando células saudáveis; ensaios de atividade tripanocida para as formas tripomastigota e amastigota do parasita *T. Cruzi* e ensaios de atividade antialérgica verificada a partir do evento de desgranulação de mastócitos. Não tenho conhecimento suficiente para discutir as variáveis dos modelos utilizados que impactam as conclusões que tiramos até o momento. Recorro aos colaboradores justamente por se tratarem de modelos que estão fora do meu domínio, tanto em termos da minha formação quanto de estrutura laboratorial. O que gostaria de ponderar aqui é o seguinte: surpreendentemente temos obtido resultados muito significativos, especialmente no que diz respeito à atividade tripanocida e antialérgica. Ao cabo de quatro anos (tempo no qual esses testes vêm sendo realizados), os resultados obtidos para uma variedade de estruturas (em alguns casos estruturas correlatas como os

complexos trinucleares e binucleares com variação de ligantes) me permitirão *começar* a traçar uma relação estrutura-atividade para os carboxilatos. Isso irá me instrumentalizar a planejar os sistemas que serão investigados no futuro. Naturalmente, a etapa de teste de atividade biológica *in vitro* é o primeiro passo na investigação da potencialidade de um material. No entanto, sinto que a fase da realização exclusiva de testes *in vitro* para demonstrar a potencialidade de um determinado complexo esta por se encerrar. O grupo precisará dar um salto e passar para um aprofundamento, que pode passar por ensaios visando à elucidação de mecanismos de ação, identificação de bio-alvos, etc. Para tanto, já há colaborações em andamento. Gostaria de ressaltar que o aprofundamento da parte biológica, por assim dizer, é uma necessidade intrínseca dos trabalhos já iniciados. No entanto a vocação do grupo, como dito no início deste texto, é o trabalho voltado para a química de coordenação. Portanto, o grupo sempre estará envolvido em projetos de síntese e caracterização de novos complexos.

Sobre as titulações espectrofotométricas que permitem inferir se um complexo interage ou não com as biomoléculas DNA e HSA. No caso da titulação com o DNA, o modelo utilizado para análise de dados é o de Benesi-Hildebrand, um modelo idealizado para descrever a formação de complexos de inclusão. No caso da interação com albumina, o modelo analítico utilizado para interpretar os dados de supressão de fluorescência é o Stern-Volmer, um modelo idealizado para descrever o fenômeno de supressão bimolecular em solução para espécies discretas. Sendo assim, os experimentos seguem, de modo geral, alguns procedimentos relacionados com as condições em que tais fenômenos ocorrem. Por exemplo: no caso do DNA titula-se o complexo (molécula hóspede) com DNA (molécula hospedeira) de modo a garantir no fim do experimento um excesso de hospedeiro, o que garantiria a condição de deslocamento do equilíbrio químico no sentido da formação do complexo de inclusão. No caso do experimento com albumina, titula-se a HSA com o complexo, de modo a verificar a dependência da magnitude da supressão com a concentração de supressor. Ambos os experimentos são amplamente reconhecidos e aceitos na literatura química como modelos conclusivos no que tange a interação de moléculas em geral com as respectivas biomoléculas.

Apesar disso, após trabalhar com os modelos e com um número suficiente de complexos é inevitável que as fragilidades de ambos, aplicados ao contexto de interação com macromoléculas, venha à tona.

No caso do DNA tem se tornado difícil dialogar com a literatura, na qual observamos distorções como o ensaio sendo realizado em soluções que contem às vezes

mais de 50% de DMSO. Resolve-se o problema de solubilidade dos complexos, mas dificilmente pode-se confiar nos resultados de tais análises. Pensando que o modelo leva em conta uma análise espectrofotométrica, sempre se pode verificar alteração nas bandas de absorção do DNA, pelo simples fato de que os cromóforos envolvidos continuam em solução! No entanto, em soluções com elevadas concentrações de solvente orgânico, a estrutura do DNA como macromolécula certamente não está mais íntegra, de modo que qualquer conclusão sobre modos de interação e constantes de formação de aduto DNA-complexo são dados vazios de sentido. Portanto, como muitos de nossos compostos têm baixa solubilidade em meio aquoso, ficamos impedidos de realizar este ensaio que é tão comum e bem aceito na literatura como modelo para interação complexo – DNA.

No que tange à titulação com HSA, um dos principais problemas é a transposição direta do modelo de Stern-Volmer, que é um modelo idealizado para descrever a supressão bimolecular em solução entre duas espécies *discretas*. Este cenário não é realista quando se trata da interação com uma proteína. Um dos principais aspectos relacionados a esse fato é que o modelo, tal qual aplicado, não leva em consideração nenhum efeito de cooperatividade entre os diferentes sítios da proteína na interação com o complexo, nem tão pouco mudanças em sua conformação, que possam levar a variações nas condições de interação albumina-complexo em diferentes faixas de concentração.

Num certo sentido, são excelentes experimentos para que os alunos aprendam os modelos. São tantas variáveis físico-químicas que devem ser pensadas que, em termos formativos, eu vejo inúmeras vantagens em manter esses protocolos experimentais operando em meu laboratório. Contudo, em termos de resultados de pesquisa, acredito que devamos ser extremamente cautelosos no sentido de não tirarmos conclusões sobre a interação de complexos com DNA e com HSA que estejam além do que o escopo dos experimentos permite. A meu ver, esses experimentos permitem apenas inferir se há ou não a *possibilidade* de interação de uma determinada molécula com o DNA e com a albumina. Havendo interação, permitem também *inferir* uma hierarquia, no sentido de afinidade preferencial: um determinado complexo pode ter mais afinidade por DNA do que por proteínas, por exemplo. E permitem por fim, *inferir* a natureza das interações complexo-biomolécula (hidrofóbica, ligação de hidrogênio, etc, verificadas através dos valores de parâmetros termodinâmicos obtidos através da relação de Van't Hoff) que devem, necessariamente, ser compatíveis com a estrutura do complexo em questão. E é neste ponto que temos observado mais consistência em nossos resultados: com todas as limitações que reconheço nos métodos, de modo geral ao fim de um experimento obtemos

parâmetros termodinâmicos que sinalizam para interações sempre compatíveis com a estrutura dos complexos. Por exemplo, no caso dos clusters com ligantes azanaftalenos, observamos predominantemente interação hidrofóbica com a HSA; no caso de cluster assimétrico com moléculas de água em sua estrutura, observamos ligações de hidrogênio, e assim por diante. Essa consistência é o segundo fator que tem me encorajado a continuar com tais experimentos. No entanto, não podemos a partir deles tirar conclusões muito definitivas como: o DNA não será o alvo em um mecanismo de atividade anti-câncer se a partir da titulação observarmos uma baixa constante de formação de aduto DNA-complexo. Em suma, para de fato chegarmos a resultados mais robustos sobre a interação complexo-biomolécula, as titulações devem ser apenas o primeiro passo de uma série de experimentos que permitam cercar um número maior de condições e de variáveis.

De tudo que foi colocado acima, os dois trabalhos mais relevantes que o grupo produziu nos últimos anos certamente são os que dizem respeito aos aspectos químicos relacionados aos clusters trinucleares de rutênio e apresentados no Capítulo 1 deste texto. Estes trabalhos permitiram ao grupo incrementar a quantidade de dados disponíveis na literatura sobre a síntese e caracterização para duas classes de complexos, os simétricos e os carbonilos assimétricos. Também nos permitiram aprofundar nosso entendimento sobre o comportamento dessas espécies e até questionar certos pontos amplamente aceitos na literatura. Sem dúvida, esses trabalhos colocam o grupo em uma posição privilegiada no que tange o planejamento de novas espécies, seja qual for a aplicação pretendida. Esperemos agora pelo eventual impacto que esses trabalhos possam ter na literatura.

O próximo passo na continuidade desses trabalhos (que já está em andamento) é produzir uma análise em série dos complexos nitrosilos. Em se tratando de complexos trinucleares, essas são as espécies menos estudadas. Não temos ainda um conhecimento adequado da estrutura eletrônica das espécies de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2\text{NO}]\text{PF}_6$. No entanto sabemos que seu comportamento pode ser descrito como intermediário entre uma espécie oxidada, com deslocalização de densidade eletrônica na unidade metálica (como os clusters simétricos) e uma espécie reduzida, com localização de valência (como os carbonilos assimétricos). Até o momento temos conhecimento da descrição de apenas seis nitrosilos, dos quais três ($[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2\text{NO}]\text{PF}_6$, L = 3-metilpiridina; 4-acetilpiridina e 4-tercetilpiridina) são do meu grupo de pesquisa. A escassez de complexos reportados na literatura atesta a dificuldade de se desenvolver rotas de síntese e purificação eficazes. Além disso, os dados de fotólise coletados no meu grupo de pesquisa mostram ser impossível racionalizar a

fotolabilização do NO em termos dos níveis de energia atualmente aceitos como descritivos da estrutura eletrônica desses compostos. Outro ponto importante: ainda não há na literatura a descrição da estrutura, através de medidas de raio-X, para nenhum desses complexos. Portanto, há um longo caminho a ser percorrido no sentido de conhecer quimicamente essas espécies que têm se mostrado tão promissoras como agentes anti-câncer.

Os complexos conhecidos como NAMI-A e KP1019 são os únicos complexos de rutênio que avançaram para a fase de testes clínicos. A respeito destes complexos foram realizadas pesquisas intensivas sobre aspectos químicos, ensaios *in vitro* e *in vivo* envolvendo a fase de testes pré-clínicos em modelos animais e, finalmente, o composto KP1019 foi avaliado em testes clínicos fase I e o NAMI-A avançou até testes clínicos fase II.

Somente após cerca de 35 anos de pesquisas, conhecimento acumulado e muito dinheiro investido nesses dois complexos (de longe os mais estudados como candidatos a metalo-fármacos de rutênio), a comunidade científica começa ficar à vontade para fazer uma avaliação crítica e tentar, finalmente, responder à pergunta: “esses complexos são DE FATO promissores para aplicações biológicas?”

Faço essa ponderação para concluir que a investigação de carboxilatos de rutênio com ponte μ -oxo para esse fim (desenvolvimento de metalo-fármacos) está apenas começando. E, nesse contexto, nosso grupo tem protagonismo. Tais compostos são DE FATO promissores? O tempo dirá...

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 TOMA, Henrique E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século**. Oficina de textos, 2009. Cap. 2: As nanomáquinas biológicas, Oficina de Textos, São Paulo, 2004
- 2 ORVIG, Chris; ABRAMS, Michael J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 1999. Este volume da revista Chemical Reviews é inteiramente dedicado à ocorrência e aplicações de compostos inorgânicos em medicina.
- 3 a) ZHANG, Christiana Xin; LIPPARD, Stephen J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, n. 4, p. 481-489, 2003 e referências aí citadas. b) REEDIJK, Jan. Medicinal applications of heavy-metal compound. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 236-240, 1999. c) DENDRINOU-SAMARA, Catherine et al. Anti-inflammatory drugs interacting with Zn (II), Cd (II) and Pt (II) metal ions. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 171-179, 1998. d) FARREL, Nicholas, Biochemical uses and application of inorganic chemistry, an overview. **Coordination Chemistry Reviews.**, v.232, p. 1, 2002. e) CLARKE, Michael J.; ZHU, Fuchun; FRASCA, Dominic R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2511-2534, 1999. f) SHARMA, Vijay; PIWNICA-WORMS, David. Metal complexes for therapy and diagnosis of drug resistance. **Chemical reviews**, v. 99, n. 9, p. 2545-2560, 1999.
- 4 CLARKE, Michael J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1, p. 209-233, 2003.
- 5 a) DE LIMA, Renata Galvão et al. Antifungal activity of novel catecholamine ruthenium (III) complexes. **Transition metal chemistry**, v. 28, n. 3, p. 272-275, 2003. b) PIEPER, T.; KEPPLER, B. K. Tumor-inhibiting ruthenium complexes-formulation and analytical characterization. **Analisis**, v. 26, n. 6, p. 84-90, 1998. c) SMITH, Clyde A. et al. Binding of ruthenium (III) anti-tumor drugs to human lactoferrin probed by high resolution X-ray crystallographic structure analyses. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 424-431, 1996.
- 6 DE LIMA, Renata Galvão et al. Structure-activity relationship of coordinated catecholamine in the [Ru III (NH₃)₄ (catecholamine)]⁺ complex. **International journal of pharmaceutics**, v. 271, n. 1, p. 21-30, 2004. b) REIN, Francisca N.; ROCHA,

Reginaldo C.; TOMA, Henrique E. Catecholamine complexes of ruthenium–edta and their redox chemistry. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 85, n. 2, p. 155-166, 2001.

7 a) XIANG, H-J.; GUO, M.; LIU, J-G. Transition-Metal Nitrosyls for Photocontrolled Nitric Oxide Delivery. *European journal of inorganic chemistry*, p. 1586-1595, 2017. b) RAU, Sven; ZHENG, Shuaizhi. Therapeutic potential of photochemically active metal complexes based on interaction with enzymes. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 3, p. 197-209, 2012. c) SCHATZSCHNEIDER, Ulrich. Photoactivated biological activity of transition-metal complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2010, n. 10, p. 1451-1467, 2010.

8 LIANG, Xiangyang; CAMPOPIANO, Dominic J.; SADLER, Peter J. Metals in membranes. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 6, p. 968-992, 2007.

9 a) ZAKI, Mehvash; ARJMAND, Farukh; TABASSUM, Sartaj. Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action. **Inorganica Chimica Acta**, v. 444, p. 1-22, 2016.

10 DA HORA MACHADO, Antonio Eduardo. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

11 a) ROSENBERG, Barnett; VAN CAMP, Loretta; KRIGAS, Thomas. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965. b) ROSENBERG, Barnett; VANCAMP, Loretta. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

12 MESSORI, Luigi; MERLINO, Antonello. Cisplatin binding to proteins: a structural perspective. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 315, p. 67-89, 2016.

13 DYSON, Paul J.; SAVA, Gianni. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. **Dalton Transactions**, n. 16, p. 1929-1933, 2006.

14 ALLARDYCE, Claire S. et al. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. **Applied organometallic chemistry**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2005.

15 LOPES, Junai et al. Ruthenium (II) Complexes Containing Anti-Inflammatory Drugs as Ligands: Synthesis, Characterization and in vitro Cytotoxicity Activities on Cancer Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1838-1847, 2015.

- 16 ALLARDYCE, Claire S.; DYSON, Paul J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- 17 a) DE ALMEIDA, Andreia et al. Emerging protein targets for metal-based pharmaceutical agents: An update. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 19, p. 2689-2704, 2013. b) BAL, Wojciech et al. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 12, p. 5444-5455, 2013. c) SUN, Xuesong; TSANG, Cheuk-Nam; SUN, Hongzhe. Identification and characterization of metallodrug binding proteins by (metallo) proteomics. **Metallomics**, v. 1, n. 1, p. 25-31, 2009. d) TIMERBAEV, Andrei R. et al. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. **Chemical reviews**, v. 106, n. 6, p. 2224-2248, 2006. e) ESPÓSITO, Breno Pannia; NAJJAR, Renato. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1, p. 137-149, 2002.
- 18 CLARKE, Michael J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1, p. 209-233, 2003.
- 19 ZHANG, Pingyu; SADLER, Peter J. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1541-1548, 2017.
- 20 LEVINA, Aviva; MITRA, Anannya; LAY, Peter A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics**, v. 1, n. 6, p. 458-470, 2009.
- 21 SCOLARO, Claudine et al. Tuning the hydrophobicity of ruthenium (II)–arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy. **Dalton Transactions**, n. 43, p. 5065-5072, 2007.
- 22 a) TIMERBAEV, Andrei R. Role of metallomic strategies in developing ruthenium anticancer drugs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 547-554, 2016. b) MEDICI, Serenella et al. Noble metals in medicine: latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329-350, 2015. c) MJOS, Katja Dralle; ORVIG, Chris. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014. d) CASINI, Angela. Exploring the mechanisms of metalbased pharmacological agents via an integrated approach. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 109, p. 97-106, 2012. e) KOMEDA, Seiji; CASINI, Angela. Next-generation anticancer

metallo drugs. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 3, p. 219-235, 2012. f) EL KAZZOULI, S. et al. From metallo drugs to metallo dendrimers for nanotherapy in oncology: a concise overview. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 29, p. 4995-5010, 2012.

23 Alessio, Enzo. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 1549-1560, 2017.

24 a) ALBANI, Bryan A. et al. Marked improvement in photoinduced cell death by a new tris-heteroleptic complex with dual action: Singlet oxygen sensitization and ligand dissociation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 49, p. 17095-17101, 2014. b) TURRO, Claudia. To intercalate or semiintercalate, or both? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 43, p. 17573-17574, 2011.

25 SPENCER, A.; WILKINSON, G. μ -Oxo-triruthenium carboxylate complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 14, p. 1570-1577, 1972.

26 BAUMANN, John A. et al. Electronic structure and redox properties of the clusters $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_6\text{L}_3]^{n+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 3342-3350, 1978.

27 MOND, A. W. The acetates of ruthenium. **Journal of the Chemical Society**, p. 1247-1249, 1930.

28 TOMA, Henrique E. et al. Monomeric and extended oxo-centered triruthenium clusters. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 219, p. 187-234, 2001.

29 a) ZHILYAEV, A. N. et al. Synthesis, structure and properties of three-nuclear carboxylate complexes of ruthenium (3). **Zhurnal Neorganicheskoi Khimii**, v. 39, n. 6, p. 895-899, 1994. b) DAVIS, Shannon; DRAGO, Russell S. Synthesis, characterization, and oxidation catalysis by a novel μ_3 -oxo triruthenium carboxylate complex. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 26, p. 4759-4760, 1988. c) ABE, Masaaki et al. X-Ray Structure, Ligand Substitution, and Other Properties of Trinuclear Ruthenium Complex, $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-C}_6\text{H}_5\text{COO})_6(\text{py})_3](\text{PF}_6)$ (py= pyridine), and X-Ray Structure of Dinuclear Ruthenium Complex, $[\text{Ru}_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_5\text{COO})_4\text{Cl}]$. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 65, n. 6, p. 1585-1590, 1992. d) OHTO, Akihiro et al. Structure and Vibrational Spectra of Trinuclear Metal Cluster Complexes. A Question of Symmetry. **Chemistry letters**, v. 24, n. 2, p. 97-98, 1995.

- 30 a) FIGGIS, B. N.; ROBERTSON, G. B. Crystal-Molecular Structure and Magnetic Properties of $\text{Cr}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6\text{OCl}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 694-695, 1965. b) UEMURA, Sakae; SPENCER, Alwyn; WILKINSON, Geoffrey. μ_3 -Oxotrimetal acetato-complexes of chromium, manganese, iron, cobalt, rhodium, and iridium. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 23, p. 2565-2571, 1973. c) ARDON, Michael et al. A new type of trinuclear cluster compound: the incomplete bicapped (or hemicapped) structure in $[\text{W}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{ZnBr}_4\cdot 8\text{H}_2\text{O}$. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 20, p. 5394-5398, 1982. d) COTTON, F. Albert et al. Four compounds containing oxo-centered trivanadium cores surrounded by six. μ_3 , eta. 2-carboxylato groups. **Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 19, p. 3505-3512, 1986.
- 31 SASAKI, Yoichi et al. Mixed Chromium (III)-Ruthenium (III) Trinuclear Complex, $[\text{CrRu}_2(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{pyridine})_3]^+$. **Chemistry letters**, v. 22, n. 1, p. 69-72, 1993.
- 32 SASAKI, Yoichi et al. Preparation, structure, and properties of the bis (μ -acetato)(μ -oxo)ruthenium(III)dimers $[\text{Ru}_2(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\mu\text{-O})(\text{py})_6]^{2+}$ and $[\text{Ru}_2(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\mu\text{-O})(\text{bpy})_2(\text{py})_2]^{2+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 30, n. 26, p. 4903-4908, 1991.
- 33 a) ABE, Masaaki et al. Enhanced kinetic lability of Ru(III) centers in oxo-centered mixed-metal Ru_2M trinuclear complexes (M= Zn and Mg). **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 18, p. 4146-4148, 1999. b) VELAYUTHAM, M.; GOPINATH, C. S.; SUBRAMANIAN, S. Electronic structure of two heterotrinuclear metal complexes $[\text{Ru}_2\text{Co}(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{CO}_2)_6\text{L}_3](\text{L} = \text{H}_2\text{O}, \text{Py})$. **Chemical physics letters**, v. 249, n. 1-2, p. 71-76, 1996. c) KOBAYASHI, Hanako et al. Magnetic Properties of Some Triangular Trinuclear Complexes of $[\text{Ru}_2\text{M}(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\mu_3\text{-O})(\text{py})_3]^{n+}$ with a Paramagnetic Ion M. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 69, n. 11, p. 3163-3172, 1996. d) OHTO, Akihiro; SASAKI, Yoichi; ITO, Tasuku. Mixed-Metal Trinuclear Complexes Containing Two Ruthenium (III) Ions and a Divalent Metal Ion, $[\text{Ru}_2\text{M}(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]$ (M= Mg, Mn, Co, Ni, Zn; L= H_2O , Pyridine). **Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 1245-1246, 1994. e) SASAKI, Yoichi et al. Substitution of methanol-d4 for the coordinated water in the trinuclear complexes, $[\text{M}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($\text{M}_3 = \text{Ru}_3, \text{Rh}_3$ or Ru_2Rh) in methanol-d4. **Inorganica chimica acta**, v. 212, n. 1-2, p. 175-182, 1993. f) SASAKI, Yoichi et al. Mixed Chromium (III)-Ruthenium (III) Trinuclear Complex, $[\text{CrRu}_2(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{pyridine})_3]^+$. **Chemistry letters**, v. 22, n. 1, p. 69-72, 1993. g) SASAKI,

Yoichi; TOKIWA, Ayako; ITO, Tasuku. Mixed ruthenium-rhodium trinuclear complex $[\text{Ru}_2\text{Rh}(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$ (L= H_2O or pyridine). **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 21, p. 6341-6347, 1987.

34 COTTON, F. A.; NORMAN, J. G. Structural characterization of a basic trinuclear ruthenium acetate. **Inorganica Chimica Acta**, v. 6, p. 411-419, 1972.

35 Possato, B.; Deflon, V. M.; Naal, Z.; Formiga, A. L. B.; Nikolaou, S. Extended π -system and enhanced electronic delocalization on symmetric $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$ complexes combined to azanaphthalene ligands. **Dalton Transaction**, 2017, no prelo.

36 a) ABE, Masaaki et al. Oxo-Centered Mixed-Ligand Triruthenium Complexes Having Redox-Active N-Methyl-4, 4'-bipyridinium Ions (mbpy⁺). Reversible Multistep Electrochemical Properties of $[\text{RuIII}_2\text{RuII}(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{CO}_2)_6(\text{mbpy}^+)_2(\text{CO})]^{2+}$ and $[\text{RuIII}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{CO}_2)_6(\text{mbpy}^+)_2(\text{L})]^{3+}$ (L= H_2O and N-Heterocyclic Ligands). **Inorganic chemistry**, v. 35, n. 23, p. 6724-6734, 1996. b) OTA, Ken-ichiro et al. Syntheses and properties of a series of oxo-centered triruthenium complexes and their bridged dimers with isocyanide ligands at terminal and bridging positions. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 18, p. 4070-4078, 1999. c) YAMAGUCHI, Tadashi et al. A Strongly Coupled Mixed Valence State Between Ru_3 Clusters. Intramolecular Electron Transfer on the Infrared Vibrational Time Scale in a Pyrazine (pz) Bridged Dimer of Triruthenium Clusters, $[\{\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{CO}_2)_6(\text{CO})(\text{abco})\}_2(\mu\text{-pz})]$ (abco= 1-azabicyclo [2, 2, 2] octane). **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 73, n. 5, p. 1205-1212, 2000.

37 MOREIRA, Mariete B. et al. Revisiting oxo-centered carbonyl-triruthenium clusters: investigating CO photorelease and some spectroscopic and electrochemical correlations. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 42, p. 16799-16809, 2016.

38 a) TOMA, Sergio H. et al. Direct assembly of a metallodendrimer encompassing seven triruthenium clusters units. **Inorganica Chimica Acta**, v. 390, p. 148-153, 2012. b) ABE, Masaaki et al. Photoconversion of a Redox-Active Self-Assembled Monolayer: In Situ Probing of Photoinduced CO Dissociation from a Triruthenium Cluster Center on Gold. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 3, p. 416-419, 2005. c) KUBIAK, Clifford P. Inorganic electron transfer: sharpening a fuzzy border in mixed valency and extending mixed valency across supramolecular systems. **Inorganic chemistry**, v. 52, n. 10, p. 5663-5676, 2013. d) HENDERSON,

Jane et al. Electron-Transfer Reactions of Electronically Excited Zinc Tetraphenylporphyrin with Multinuclear Ruthenium Complexes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 24, p. 7473-7479, 2014. e) ITOU, Mitsunari et al. Carbon monoxide ligand-exchange reaction of triruthenium cluster complexes induced by photosensitized electron transfer: A new type of photoactive CO color sensor. **Inorganic chemistry**, v. 45, n. 16, p. 6114-6116, 2006. f) NIKOLAOU, Sofia; FORMIGA, André Luiz Barboza; TOMA, Henrique E. Probing the electronic delocalization in a cyclic pyrazine ruthenium cluster hexamer. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 13, n. 9, p. 1032-1035, 2010. g) MATSUSE, Rumiko et al. Metallopolymer Films Exhibiting Three-Color Electrochromism in the UV/Vis and Near-IR Region: Remarkable Utility of Trimetallic Clusters Bearing Thienyl Pendants and Their Mixed-Valent Charge Transfer Transitions. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 23, n. 1, p. 136-146, 2013.

39 DEMADIS, Konstantinos D.; HARTSHORN, Chris M.; MEYER, Thomas J. The localized-to-delocalized transition in mixed-valence chemistry. **Chemical reviews**, v. 101, n. 9, p. 2655-2686, 2001.

40 YE, Shen et al. In-situ FT-IR Spectroelectrochemical Study of the Trinuclear Complex $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{pyridine})_2]$ in Acetonitrile. **Inorganic Chemistry**, v. 34, n. 18, p. 4527-4528, 1995.

41 TOMA, Henrique E.; CUNHA, Carlos J.; CIPRIANO, Cecilia. Redox potentials of trinuclear μ -oxo ruthenium acetate clusters with N-heterocyclic ligands. **Inorganica chimica acta**, v. 154, n. 1, p. 63-66, 1988.

42 LIU, Mimi et al. Characterization of a Ruthenium (III)/NAMI-A Adduct with Bovine Serum Albumin that Exhibits a High Anti-Metastatic Activity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 9, p. 1661-1664, 2010.

43 TAUCHMAN, Jiří et al. Cationic triruthenium (III) oxo complexes of the type $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{OAc})_6\text{L}_3]^+$ containing imidazole, pyrazole, thiazole and oxazole ligands: Synthesis, molecular structure, and cytotoxicity. **Inorganica chimica acta**, v. 423, p. 16-20, 2014.

44 CARNEIRO, Zumira A. et al. Nitric oxide photorelease from a trinuclear ruthenium nitrosyl complex and its in vitro cytotoxicity against melanoma cells. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 134, p. 36-38, 2014.

- 45 CACITA, Natacha et al. Investigation of a novel trinuclear μ -oxo ruthenium complex as a potential nitric oxide releaser for biological purposes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 429, p. 114-121, 2015.
- 46 CACITA, Natacha; NIKOLAOU, Sofia. Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching. **Journal of Luminescence**, v. 169, p. 115-120, 2016.
- 47 Possato, B.; Carnerio, Z. A.; Albuquerque, S.; Nikolaou, S. New uses for old complexes: the very first report on the trypanocidal activity of symmetric trinuclear ruthenium complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2017, no prelo.
- 48 ALEXIOU, Anamaria, D P.; TOMA, Henrique, E. T. NMR Spectroscopic Correlations for a Series of Triangular-Oxoruthenium Acetate Clusters containing Substituted Pyridine Ligands. **Journal of Chemical Research, Synopses**, n. 9, p. 338-339, 1997.
- 49 POWELL, Glenmore; RICHENS, David T.; BINO, Avi. The nature of μ_3 -oxohexakis (μ -acetato) triaquatruthenium cationic complexes isolated from aqueous perchloric acid. Crystal and molecular structure of $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{O}_3\text{CCH}_3)_6(\text{OH}_2)_3](\text{ClO}_4).2\text{H}_2\text{O}$. **Inorganica chimica acta**, v. 232, n. 1-2, p. 167-170, 1995.
- 50 GOELTZ, John C.; BENSON, Eric E.; KUBIAK, Clifford P. Electronic structural effects in self-exchange reactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 45, p. 14729-14734, 2010.
- 51 ROBIN, Melvin B.; DAY, Peter. Mixed valence chemistry-a survey and classification. **Advances in inorganic chemistry and radiochemistry**, v. 10, p. 247-422, 1968.
- 52 OHTO, Akihiro et al. Structure and Vibrational Spectra of Trinuclear Metal Cluster Complexes. A Question of Symmetry. **Chemistry letters**, v. 24, n. 2, p. 97-98, 1995.
- 53 a) TOMA, Henrique E. et al. ^1H and ^{13}C NMR spectra of triangular μ -oxoruthenium acetate clusters revisited: HETCOR study of two pyridine and 4, 4'-bipyridine derivatives. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 37, p. 322-324, 1999. b) BERTINI, Ivano; LUCHINAT, Claudio; AIME, S. NMR of paramagnetic substances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 150, p. 29-75, 1996.

- 54 POUCHERT, Charles J.; BEHNKE, J. The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra, Aldrich Chemical Company. **Inc., USA**, v. 3, p. 338, 1993.
- 55 HANSCH, Corwin; LEO, A.; TAFT, R. W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. **Chemical Reviews**, v. 91, n. 2, p. 165-195, 1991.
- 56 a) TOMA, Henrique E.; ALEXIOU, Anamaria DP; DOVIDAUSKAS, Sergio. Extended Electronic Interactions in a Triangular μ -Oxotruthenium Acetate Cluster Containing Nitric Oxide. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2002, n. 11, p. 3010-3017, 2002. b) PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy; Brooks/Cole, Cengage Learning, USA**. ISBN 0-495-11478-9, 2009. c) JOHNSON, M. K.; POWELL, D. B.; CANNON, R. D. Vibrational spectra of carboxylato complexes—III. Trinuclear ‘basic’ acetates and formates of chromium (III), iron (III) and other transition metals. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 37, n. 11, p. 995-1006, 1981.
- 57 ZANELLO, Piero. **Inorganic electrochemistry: theory, practice and applications**. Royal Society of Chemistry, 2003.
- 58 NIKOLAOU, Sofia; TOMA, Henrique E. Mutual effects on the spectroscopic and electrochemical properties of μ 3-oxo-trinuclear ruthenium complexes modified with a bridged $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(\text{CN})]$ moiety. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 3, p. 352-359, 2002.
- 59 NIKOLAOU, Sofia; TOMA, Henrique E. Synthesis, spectroscopy and electrochemistry of a μ -oxo-triruthenium cluster containing a bridged bis (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) moiety. **Polyhedron**, v. 20, n. 3, p. 253-259, 2001.
- 60 NIKOLAOU, Sofia; TOMA, Henrique E. A Convergent Approach for the Generation of Dendrimers Containing the $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ Electroactive Core. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 2266-2271, 2008.
- 61 ABE, Masaaki; INATOMI, Atsushi; HISAEDA, Yoshio. Electroactive chain-like compounds constructed from trimetallic clusters and 4, 4'-bipyridine spacers: one-pot synthesis, characterization and surface binding. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 10, p. 2289-2298, 2011.

- 62 CANZI, Gabriele; KUBIAK, Clifford P. Mixed-Valence Nanoclusters: Fast Electron Transfer in Mixed-Valence Systems with a Gold Nanoparticle as the Bridge. **Small**, v. 7, n. 14, p. 1967-1971, 2011.
- 63 DAI, Feng-Rong et al. Syntheses, characterization and redox properties of oxo-centred triruthenium cluster dimers and trimers linked by ortho-metallated polypyridyl ligands. **Dalton Transactions**, n. 11, p. 1492-1502, 2008.
- 64 ZHANG, Hua-Xin et al. Synthesis and properties of the cyano complex of oxo-centered triruthenium core $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6(\text{pyridine})_2(\text{CN})]$. **Inorganic chemistry**, v. 53, n. 3, p. 1288-1294, 2013.
- 65 Spencer, A.; Wilkinson, G. Reactions μ -oxo-triruthenium carboxylates with n-Acid Ligands. **Journal of Chemical Society, Dalton Transactions**, p.786 -792, 1974.
- 66 INATOMI, Atsushi; ABE, Masaaki; HISAEDA, Yoshio. Carboxylato-Modified New Oxo-Centred Triruthenium Cluster Compounds with CO and Solvent Ligands: The X-ray Structure of $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2)_6(\text{CO})(\text{THF})_2]$. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 4830-4836, 2009.
- 67 AKASHI, Daisuke et al. Photodissociation of CO from $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-OOCCH}_3)_6(\text{CO})\text{L}_2]$ in acetonitrile, where L= pyridine, 4-cyanopyridine and methanol. **Dalton Transactions**, n. 18, p. 2883-2889, 2004.
- 68 YE, Heng-Yun et al. Low-Valence Triruthenium Compounds via Substitution of a Bridging Acetate in the Parent $\text{Ru}_3\text{O}(\text{OAc})_6$ Cluster Core by 2,2'-Azobispyridine (abpy) or 2,2'-Azobis (5-chloropyrimidine)(abcp). **Inorganic chemistry**, v. 46, n. 15, p. 6129-6135, 2007.
- 69 K. Nakamoto, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, John Wiley & Sons Inc., 5th edition, 1997
- 70 ZHOU, Wei et al. Oxidation States and CO Ligand Exchange Kinetics in a Self-Assembled Monolayer of a Triruthenium Cluster Studied by In Situ Infrared Spectroscopy. **Chemistry-a European Journal**, v. 11, n. 17, p. 5040-5054, 2005.

- 71 TOMA, Henrique E. et al. A nitric oxide releaser based on the μ -oxo-hexaacetate-bis (4-methylpyridine) triruthenium nitrosyl complex. **Inorganica chimica acta**, v. 358, n. 10, p. 2891-2899, 2005.
- 72 BAUMANN, John A. et al. The onset of band-like properties in the ligand-bridged, trimeric cluster $\{[(py)_2Ru_3O(OAc)_6(pyr)]_2[Ru_3O(OAc)_6(CO)]\}$. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 11, p. 2916-2920, 1979.
- 73 ABE, Masaaki et al. Reversible Multi-Step and Multielectron Redox Behavior of the Oxo-Centered Trinuclear Ruthenium Complex with Redox-Active Ligand, $[Ru_3(\mu_3-O)(\mu-CH_3CO_2)_6(mbpy^+)_3]^{4+}$ ($mbpy^+$ = N-Methyl-4, 4'-bipyridinium Ion) and Its Trirhodium and Diruthenium-Rhodium Derivatives. **Inorganic Chemistry**, v. 34, n. 17, p. 4490-4498, 1995.
- 74 a) DE LIMA, Renata Galvão et al. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorganica chimica acta**, v. 358, n. 9, p. 2643-2650, 2005. (b) WESTCOTT, BARRY L.; ENEMARK, JOHN H. Transition metal nitrosyls. **Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy**, v. 2, p. 403-450, 1999. (c) FORD, P. C. et al. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coordination chemistry reviews**, v. 171, p. 185-202, 1998.
- 75 a) BEZERRA, Cícero WB et al. Water π -donation in trans-tetraammineruthenium (II): effect on coordinated-water properties induced by a trans NO ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 25, p. 5660-5667, 1999. b) BENTO, Maria Lucia; TFOUNI, Elia. Spectra, reduction potentials, and coordinated pyrazine basicities in the ruthenium (II) complexes $trans-Ru(NH_3)_4LL^{n+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 19, p. 3410-3413, 1988. c) TFOUNI, Elia; FORD, Peter C. Thermal and photochemical properties of some trans-disubstituted tetraammineruthenium (II) complexes of aromatic nitrogen heterocycles, $trans-Ru(NH_3)_4LL^{n+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 72-76, 1980. d) TFOUNI, Elia et al. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination chemistry reviews**, v. 236, n. 1, p. 57-69, 2003.

- 76 SCHATZSCHNEIDER, Ulrich. Photoactivated biological activity of transition-metal complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2010, n. 10, p. 1451-1467, 2010.
- 77 a) KOSHIYAMA, Tomomi et al. Post-Crystal Engineering of Zinc-Substituted Myoglobin to Construct a Long-Lived Photoinduced Charge-Separation System. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 21, p. 4849-4852, 2011. b) MORRIS-COHEN, Adam J. et al. Controlling the rate of electron transfer between a quantum dot and a tri-ruthenium molecular cluster by tuning the chemistry of the interface. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 40, p. 13794-13801, 2012.
- 78 STEWART, Bernard W. et al. (Ed.). **World cancer report**. Lyon: IARC press, 2003.
- 79 Filho, G. B. Distúrbios do crescimento e difusão celular. Belo Horizonte; Guanabara - Koogan S.A, 5 ed., p.144-186, 1994.
- 80 a) ALMEIDA, VL De et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005. b) HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. c) HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- 81 GARNIS, Cathie; BUYS, Timon PH; LAM, Wan L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**, v. 3, n. 1, p. 9, 2004.
- 82 a) OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997. b) SINHA, Rajni et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1909-1917, 2006.
- 83 a) MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. b) MSHANA, Robert N. et al. Use of 3-(4, 5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1214-1219, 1998. c) FALQUEIRO, A. M. et al. In vitro cytotoxicity of Selol-loaded magnetic nanocapsules against neoplastic cell lines under AC magnetic field activation. **Journal of Applied Physics**, v. 111, n. 7, p. 07B335, 2012.

84 TRYNDA-LEMIESZ, Lilianna; KEPPLER, Bernhard K.; KOZŁŁOWSKI, Henryk. Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis(imidazol)ruthenate(III)]. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 123-128, 1999.

85 TRYNDA-LEMIESZ, Lilianna et al. Studies on the interactions between human serum albumin and *trans*-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate (III). **Journal of inorganic biochemistry**, v. 78, n. 4, p. 341-346, 2000.

86 a) CUMMINGS, Scott D. Platinum complexes of terpyridine: interaction and reactivity with biomolecules. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 9, p. 1495-1516, 2009. b) GALLORI, Enzo et al. DNA as a possible target for antitumor ruthenium (III) complexes: a spectroscopic and molecular biology study of the interactions of two representative antineoplastic ruthenium (III) complexes with DNA. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 376, n. 1, p. 156-162, 2000.

87 a) PETERS, Theodore. Serum albumin. **Advances in protein chemistry**, v. 37, p. 161-245, 1985. b) KRAGH-HANSEN, Uirich. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. **Pharmacological Reviews**, v. 33, n. 1, p. 17-53, 1981.

88 a) SHAW, Ajay Kumar; PAL, Samir Kumar. Spectroscopic studies on the effect of temperature on pH-induced folded states of human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 90, n. 1, p. 69-77, 2008. b) LIU, Ronghua et al. Study on the interaction between salvianic acid A sodium and bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 5, p. 1535-1539, 2011. c) DA SILVEIRA, Vivian Chagas et al. Oxindole-Schiff base copper (II) complexes interactions with human serum albumin: Spectroscopic, oxidative damage, and computational studies. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1331-1341, 2009. d) LI, Daojin et al. Characterization of the baicalein-bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or

Fe³⁺ by spectroscopic approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 588-599, 2011.

89 HE, Xiao Min; CARTER, Daniel C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. 1992.

90 a) CARTER, Daniel C.; HO, Joseph X. Structure of serum albumin. **Advances in protein chemistry**, v. 45, p. 153-203, 1994. b) NI, Yongnian; SU, Shaojing; KOKOT, Serge. Spectrometric studies on the interaction of fluoroquinolones and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 2, p. 547-552, 2010.

91 a) PETERS JR, Theodore; BRENNAN, Stephen O. All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 11, p. 451-451, 1996. b) XIE, Meng-Xia; XU, Xiao-Yun; WANG, Ying-Dian. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1724, n. 1, p. 215-224, 2005.

92 a) TAYYAB, Saad et al. Effect of lysine modification on the conformation and indomethacin binding properties of human serum albumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 26, n. 2, p. 173-180, 1999. b) KHAN, Mateen A.; MUZAMMIL, Salman; MUSARRAT, Javed. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. **International journal of biological macromolecules**, v. 30, n. 5, p. 243-249, 2002. c) MIN, Jiang et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 692, n. 1, p. 71-80, 2004. d) JOSEPH, R. Lakowicz; LAKOWICZ, R. Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic Publisher, NewYork, 2006.

93 LIU, Ronghua et al. Study on the interaction between salvianic acid A sodium and bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 5, p. 1535-1539, 2011.

94 DEWEY, Thomas Gregory (Ed.). **Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1991.

95 BIJARI, Nooshin et al. Spectroscopic study of interaction between osthole and human serum albumin: Identification of possible binding site of the compound. **Journal of Luminescence**, v. 143, p. 328-336, 2013.

96 a) HU, Yanyan et al. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 74, n. 2, p. 526-531, 2009. b) XU, Hui et al. Spectroscopic studies on the interaction of vitamin C with bovine serum albumin. **Journal of Solution Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 15-25, 2009.

97 ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.

98 MONCADA, S. R. M. J.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, EA_. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

99 WHO Vector-borne diseases, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/index9.html>.

100 GUALDESI, M. S.; ORTIZ, C. S.; RAVIOLO, M. A. Synthesis and pharmaceutical properties of N-acyloxymethyl prodrugs of Allop with potential anti-trypanosomal activity. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 42, n. 4, p. 602-610, 2016.

101 FARRELL, N. P.; WILLIAMSON, J.; MCLAREN, Diane JM. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. **Biochemical pharmacology**, v. 33, n. 7, p. 961-971, 1984.

102 a) O'NEILL, Paul M. et al. 4-Aminoquinolines—Past, present, and future; A chemical perspective. **Pharmacology & therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 29-58, 1998. b) FOLEY, Michael; TILLEY, Leann. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology & therapeutics**, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998. c) ACHAN, Jane et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 144, 2011. d) CARVER, A. E. Quinine Therapy and Hydrotherapy in the Treatment of Malaria. **The Lancet**, v. 190, n. 4912, p. 623-624, 1917. e) BUCKNER, Frederick S. et al. Efficient technique for

screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

f) GOBLE, Frans C. Chemotherapeutic activity of certain 8-aminoquinolines, particularly pentaquine, in experimental Chagas' disease. **The Journal of parasitology**, v. 35, n. 4, p. 375-378, 1949. g) BYLER, Kendall G. et al. Identification of benzoylisoquinolines as potential anti-Chagas agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2587-2594, 2012.

103 a) BENÍTEZ, Julio et al. A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-protozoa and anti-tumor agent. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1386-1394, 2009. b) NAVARRO, Maribel et al. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23, p. 1070-1078, 2010. c) URQUIOLA, Carolina et al. Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N 1, N 4-dioxide derivatives by complexation with vanadium. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 16, p. 5503-5509, 2006. d) BENÍTEZ, Julio et al. Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 609-616, 2009. e) OTERO, Lucía et al. Nitrofurylsemicarbazone rhenium and ruthenium complexes as anti-trypanosomal agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1231-1239, 2006. f) OTERO, Lucía et al. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 74-79, 2007.

104 a) SILVA, Jean Jerley N. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4414-4421, 2009. b) SILVA, J. J. N. et al. 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.

105 NAVARRO, Maribel. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 11, p. 1619-1626, 2009.

106 SESTI-COSTA, Renata et al. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3207, 2014.

107 WOOD, Alexander W. et al. Mutagenicity and cytotoxicity of benzo (a) pyrene benzo-ring epoxides. **Cancer research**, v. 36, n. 9 Part 1, p. 3358-3366, 1976.

108 CHATELAIN, Eric. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

109 (a) VINCENT, John B.; OLIVIER-LILLEY, Gay L.; AVERILL, Bruce A. Proteins containing oxo-bridged dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 8, p. 1447-1467, 1990. (b) FUKUMOTO, Tatsuma et al. Preparation and properties of a series of (μ -oxo) di(μ -acetato) diruthenium (III) complexes, $[\text{Ru}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\text{pyridine})_4(\text{L})_2]^{2+}$ and $[\text{Ru}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\text{AA})_2(\text{L})_2]^{2+}$, where AA is 2, 2'-bipyridine or 1, 10-phenanthroline, and L is a monodentate ligand. **Inorganica chimica acta**, v. 283, n. 1, p. 151-159, 1998. (c) HE, Chuan; LIPPARD, Stephen J. Synthesis and electrochemical studies of Diiron complexes of 1, 8-naphthyridine-based dinucleating ligands to Model features of the active Sites of non-heme Diiron enzymes. **Inorganic chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1414-1420, 2001.

110 (a) ABE, Masaaki et al. A kinetic study on pyridine exchange reactions at a bis (μ -acetato)(μ -oxo)diruthenium (III) center: effects of monodentate and bidentate N-heterocyclic ligands cis to the oxo bridge. **Inorganica chimica acta**, v. 331, n. 1, p. 158-167, 2002. (b) ZHANG, Hua-Xin et al. Cyano-and Aqua-Coordinated Diruthenium (III) Complexes with Oxo-Bis (acetato) Bridge: Preparation and Steric and Electronic Structures. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2011, n. 33, p. 5132-5143, 2011.

111 a) SASAKI, Yoichi et al. Preparation, structure, and properties of the bis (μ -acetato)(μ -oxo)ruthenium (III) dimers $[\text{Ru}_2(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\mu\text{-O})(\text{py})_6]^{2+}$ and $[\text{Ru}_2(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\mu\text{-O})(\text{bpy})_2(\text{py})_2]^{2+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 30, n. 26, p. 4903-4908, 1991. b) SANTOS, Joana Mara et al. NMR study of the leaving ligand and solvent effects on the solvolysis of (μ -oxo)bis(μ -acetato)diruthenium (III) complexes. **Chemical physics**, v. 306, n. 1, p. 143-151, 2004. c) IDO, Yohei et al. A Kinetic Study on the Substitution for Acetonitrile at the

trans-to- μ -Oxido Sites in a bis(μ -acetato)(μ -oxido)diruthenium (III) Dipositive Complex: Dissociative–Associative Transition of the Activation Mode for the Substitution of Pyridine Derivatives. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, n. 21, p. 3641-3650, 2013.

112 MONTEIRO, Elaine Cristina Almeida et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de reumatologia clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

113 SUN, Yen et al. Simultaneous determination of arylpropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 30, n. 5, p. 1611-1619, 2003.

114 KELLY, Margaret M. et al. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 349-356. e13, 2010.

115 GOODMAN, Louis Sanford et al. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, Vol. 75, p. 1839, 1996.

116 THUN, Michael J.; HENLEY, S. Jane; PATRONO, Carlo. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 4, p. 252-266, 2002.

117 TAMASI, Gabriella et al. Synthesis, spectroscopic and DFT structural characterization of two novel ruthenium (III) oxicam complexes. In vivo evaluation of anti-inflammatory and gastric damaging activities. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 134, p. 25-35, 2014.

118 SEUANES, Gabriela Campos et al. Novel binuclear μ -oxo diruthenium complexes combined with ibuprofen and ketoprofen: Interaction with relevant target biomolecules and anti-allergic potential. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 153, p. 178-185, 2015.

119 HAAHTELA, Tari; VON HERTZEN, Leena; CUSTOVIC, Adnan. Prevention of allergic diseases. **WAO White Book on Allergy**, p. 145, 2013.

120 WERNERSSON, Sara; PEJLER, Gunnar. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478-494, 2014.

121 KAMBAYASHI, Taku; KORETZKY, Gary A. Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 3, p. 544-552, 2007.

122 STEVENS, Richard L.; AUSTEN, K. Frank. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. **Immunology today**, v. 10, n. 11, p. 381-386, 1989.

123 KELLY, Margaret M. et al. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 349-356. e13, 2010.

124 BAX, Heather Jane; KEEBLE, Anthony Howard; GOULD, Hannah Jane. Cytokinerigic IgE action in mast cell activation. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 229, 2012.

125 a) BARSUMIAN, Edward L. et al. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. **European journal of immunology**, v. 11, n. 4, p. 317-323, 1981. b) POSNER, Richard G. et al. Aggregation of IgE-receptor complexes on rat basophilic leukemia cells does not change the intrinsic affinity but can alter the kinetics of the ligand-IgE interaction. **Biochemistry**, v. 31, n. 23, p. 5350-5356, 1992.

126 a) NAAL, Rose Mary ZG et al. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors and bioelectronics**, v. 20, n. 4, p. 791-796, 2004. b) METZGER, Henry. The receptor with high affinity for IgE. **Immunological reviews**, v. 125, n. 1, p. 37-48, 1992. c) DE SOUZA SANTOS, Marcela et al. In vitro anti-allergic activity of the fungal metabolite pyridovericin. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 532-538, 2013. DE SOUZA SANTOS, Marcela et al. In situ screening of 3-arylcoumarin derivatives reveals new inhibitors of mast cell degranulation. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 6, p. 731-738, 2013.

127 DE SOUZA SANTOS, Marcela et al. In situ screening of 3-aryl coumarin derivatives reveals new inhibitors of mast cell degranulation. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 6, p. 731-738, 2013.

128 a) TANASE, Tomoaki et al. (μ -Oxo or hydroxo) bis(μ -carboxylato) diruthenium(III) complexes with tris (1-pyrazolyl) borate face-capping ligand, affording versatile oxidation states via a protonation/deprotonation couple. **New journal of chemistry**, v. 22, n. 9, p. 927-929, 1998. b) TANASE, Tomoaki et al. Diruthenium complexes with hydrotris (1-pyrazolyl) borate face-capping ligands involving $\{Ru_2(\mu-O \text{ or } \mu-OH)(\mu-carboxylato)_2\}$ cores. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 15, p. 2293-2302, 2001.

129 WEAVER, Tom R. et al. Chemically significant interactions between ruthenium ions in oxo-bridged complexes of ruthenium (III). **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 11, p. 3039-3048, 1975.

130 a) LAMBIASE, Alessandro; MICERA, Alessandra; BONINI, Stefano. Multiple action agents and the eye: do they really stabilize mast cells?. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 9, n. 5, p. 454-465, 2009. b) SERNA, H.; PORRAS, M.; VERGARA, P. Mast cell stabilizer Ketotifen prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental T. spiralis inflammation in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 319, n. 3, p. 1104-1111, 2006.

131 HUNDLEY, Thomas R.; PRASAD, Anjana R.; BEAVEN, Michael A. Elevated levels of cyclooxygenase-2 in antigen-stimulated mast cells is associated with minimal activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 3, p. 1629-1636, 2001.

132 a) MITCHELL, Jane A.; LARKIN, Simon; WILLIAMS, Timothy J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. **Biochemical pharmacology**, v. 50, n. 10, p. 1535-1542, 1995. b) KIM, Myungsuk et al. Aceriphyllum rossii extract and its active compounds, quercetin and kaempferol inhibit IgE-mediated mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 17, p. 3750-3758, 2014.

133 BENADIBA, Marcel et al. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, $[Ru_2Cl(Ibp)_4]$, in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic

glioma in vivo. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1025-1035, 2014.

134 HIGGINS, P. G.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Fluoroquinolones: structure and target sites. **Current drug targets**, v. 4, n. 2, p. 181-190, 2003.

135 a) SMITHSON, A. et al. Prevalence and risk factors for quinolone resistance among *Escherichia coli* strains isolated from males with community febrile urinary tract infection. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 423-430, 2012. b) TAVARES, Walter. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. Atheneu, 1996.

136 a) HUANG, Liyi et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in surgery and medicine**, v. 44, n. 6, p. 490-499, 2012. b) PATRICK, Graham L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, CAP. 16, 2013.

137 a) WESTROPP, Joellen L. et al. Evaluation of the efficacy and safety of high dose short duration enrofloxacin treatment regimen for uncomplicated urinary tract infections in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 26, n. 3, p. 506-512, 2012. b) BLONDEAU, J. M. et al. In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. **Veterinary microbiology**, v. 155, n. 2, p. 284-290, 2012. c) GOVENDIR, M. et al. Susceptibility of rapidly growing mycobacteria isolated from cats and dogs, to ciprofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin. **Veterinary microbiology**, v. 147, n. 1, p. 113-118, 2011.

138 a) DE SOUZA, Marcus VN. New fluoroquinolones: a class of potent antibiotics. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1009-1017, 2005. b) CORNICK, J. E.; BENTLEY, S. D. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes and infection**, v. 14, n. 7, p. 573-583, 2012.

139 VIEIRA, Lígia Maria Mendonça et al. Síntese e caracterização de complexos de paládio (II), platina (II), zinco (II) e cobre (II) com ligantes do grupo das fluorquinolonas. 2007.

140 LOPEZ-GRESA, M. P. et al. Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin): Spectroscopic and X-ray structural characterization. Antibacterial studies. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 92, n. 1, p. 65-74, 2002.

141 a) UIVAROSI, Valentina. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11153-11197, 2013. b) PATEL, Mohan N.; JOSHI, Hardik N.; PATEL, Chintan R. Cytotoxic, DNA binding, DNA cleavage and antibacterial studies of ruthenium–fluoroquinolone complexes. **Journal of Chemical Sciences**, v. 126, n. 3, p. 739-749, 2014.

142 a) PARK, Hyoung-Ryun; KIM, Tae Heung; BARK, Ki-Min. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. **European journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 6, p. 443-460, 2002. b) ARAYNE, Saeed et al. Synthesis, characterization, antibacterial and anti-inflammatory activities of enoxacin metal complexes. **Bioinorganic chemistry and applications**, 2009. c) SHAIKH, Anwar et al. Metalloantibiotics: Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of bismuth-fluoroquinolone complexes against *Helicobacter pylori*. **Acta pharmaceutica**, v. 59, n. 3, p. 259-271, 2009.

143 PALUMBO, Manlio et al. On the mechanism of action of quinolone drugs. **Trends in microbiology**, v. 1, n. 6, p. 232-235, 1993.

144 REFAT, Moamen S. Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 68, n. 5, p. 1393-1405, 2007.

145 a) SERAFIN, A.; STAŃCZAK, A. The complexes of metal ions with fluoroquinolones. **Russian Journal of Coordination Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 81-95, 2009. b) PSOMAS, George et al. The First Fused Dimer Metallocrown

Ni(II)₂(mcpa)₂(CH₃OH)₃(H₂O)[12-MCNi(II)N(shi)₂(pko)2-4][12-MCNi(II)N(shi)₃ (pko)-4]. **Inorganic chemistry**, v. 37, n. 26, p. 6556-6557, 1998.

146 XIAO, Dong-Rong et al. Rationally designed, polymeric, extended metal–ciprofloxacin complexes. **Chemistry–A European Journal**, v. 11, n. 22, p. 6673-6686, 2005.

147 TUREL, Iztok; LEBAN, Ivan; BUKOVEC, Nataša. Crystal structure and characterization of the bismuth (III) compound with quinolone family member (ciprofloxacin). Antibacterial study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 241-245, 1997.

148 TANIMOTO, Marcia Kiyoko et al. Tuning the reaction products of ruthenium and ciprofloxacin for studies of DNA interactions. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 1504-1517, 2012.

149 PSOMAS, George. Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: synthesis, characterization and DNA-binding properties. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 9, p. 1798-1811, 2008.

150 DE WITTE, Bavo et al. Critical points in the analysis of ciprofloxacin by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, n. 1, p. 126-130, 2007.

151 HENDERSON, William; MCINDOE, J. Scott. **Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds: Tools-Techniques-Tips**. John Wiley & Sons, 2005.

152 CALZA, Paola et al. Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 10, p. 1533-1552, 2008.

153 a) TUREL, Iztok; BUKOVEC, Peter. Comparison of the thermal stability of ciprofloxacin and its compounds. **Thermochimica acta**, v. 287, n. 2, p. 311-318, 1996. b) TUREL, Iztok et al. Synthesis, crystal structure, and characterization of three novel compounds of the quinolone family member (norfloxacin). **Journal of inorganic**

biochemistry, v. 61, n. 3, p. 197-212, 1996. c) TUREL, Iztok; LEBAN, Ivan; BUKOVEC, Nataša. Synthesis, characterization, and crystal structure of a copper (II) complex with quinolone family member (ciprofloxacin): bis (1)-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-piperazin-1ylquinoline-3-carboxylate) copper (II) chloride hexahydrate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 273-282, 1994. d) BADEA, Mihaela et al. Thermal decomposition of some biologically active complexes of ruthenium (III) with quinolone derivatives. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 735, 2009.

154 TUREL, Iztok et al. Compounds of antibacterial agent ciprofloxacin and magnesium—crystal structures and molecular modeling calculations. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2008, n. 23, p. 3718-3727, 2008.

155 a) TUREL, Iztok. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1, p. 27-47, 2002. b) AL-MUSTAFA, Jamil; TASHTOUSH, Bassam. Iron (II) and iron (III) perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 113-124, 2003.

156 SAHA, Dilip Kumar et al. Hydrothermal synthesis, crystal structure, spectroscopy, electrochemistry and antimycobacterial evaluation of the copper (II) ciprofloxacin complex: $[Cu (cf)_2 (BF_4)_2] \cdot 6H_2O$. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 5, n. 12, p. 1022-1027, 2002.

157 ZAKI, Mehvash; ARJMAND, Farukh; TABASSUM, Sartaj. Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action. **Inorganica Chimica Acta**, v. 444, p. 1-22, 2016.

158 a) MEIER, Samuel M. et al. Biomolecule binding vs. anticancer activity: Reactions of Ru(arene) [(thio)pyridone] compounds with amino acids and proteins. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 108, p. 91-95, 2012. b) BARNARD, Peter J.; VAGG, Robert S. A spectroscopic investigation of the self-association and DNA binding properties of a series of ternary ruthenium (II) complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1009-1017, 2005. c) GRAU, Jordi et al. New π -arene ruthenium (II) piano-stool complexes with nitrogen ligands. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 109, p. 72-81, 2012.

- 159 KING, Dana E.; MALONE, Robb; LILLEY, Sandra H. New classification and update on the quinolone antibiotics. **American family physician**, v. 61, n. 9, p. 2741-2748, 2000.
- 160 OVERGAARD, Jacob; TUREL, Iztok; HIBBS, David E. Experimental electron density study of a complex between copper (II) and the antibacterial quinolone family member ciprofloxacin. **Dalton Transactions**, n. 21, p. 2171-2178, 2007.
- 161 a) TSELEPI-KALOULI, E.; KATSAROS, N. The interaction of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]_{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ions with DNA. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 271-282, 1989. b) GHOSH, Kalyan Sundar et al. Studies on the interaction of copper complexes of (–)-epicatechin gallate and (–)-epigallocatechin gallate with calf thymus DNA. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 9, p. 1711-1718, 2008. c) ZEGLIS, Brian M.; PIERRE, Valerie C.; BARTON, Jacqueline K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007.
- 162 a) LIANG, Zhen-Hua et al. Ruthenium (II) complexes: synthesis, cytotoxicity in vitro, apoptosis, DNA-binding, photocleavage, and antioxidant activity studies. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 64, n. 19, p. 3342-3352, 2011. b) YANG, Xicheng et al. Spectroscopy studies on DNA binding of two ruthenium complexes $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{L})]^{2+}$ (L= iip and tip). **Journal of Coordination Chemistry**, v. 64, n. 9, p. 1491-1502, 2011.
- 163 WANG, Yue et al. Synthesis, structure, DNA binding and cleavage ability of a new copper ciprofloxacin complex. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 63, n. 20, p. 3662-3675, 2010.
- 164 REIS, Felipe Costa Claro et al. A new homoleptic coordination compound of ruthenium and norfloxacin and its interaction with human serum albumin. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 63, p. 96-100, 2016.
- 165 CHATTAH, Ana K. et al. NMR and IR characterization of the aluminium complexes of norfloxacin and ciprofloxacin fluoroquinolones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 850-859, 2007.
- 166 a) ZAMPAKOU, Marianthi et al. Structure, antimicrobial activity, DNA-and albumin-binding of manganese (II) complexes with the quinolone antimicrobial agents oxolinic acid and enrofloxacin. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 121, p. 88-99, 2013. b)

PROTOGERAKI, Catherine et al. Cobalt (II) complexes with the antimicrobial drug enrofloxacin: Structure, antimicrobial activity, DNA-and albumin-binding. **European journal of medicinal chemistry**, v. 86, p. 189-201, 2014. c) SKYRIANOU, Kalliopi C. et al. Nickel–quinolones interaction: Part 5—Biological evaluation of nickel (II) complexes with first-, second-and third-generation quinolones. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 10, p. 1273-1285, 2011. d) FERNANDES, Patrícia et al. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper (II) lomefloxacin ternary complex. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 131, p. 21-29, 2014. e) FEIO, Maria J. et al. Fluoroquinolone–metal complexes: A route to counteract bacterial resistance? **Journal of inorganic biochemistry**, v. 138, p. 129-143, 2014.

167 WEDER, Jane E. et al. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1, p. 95-126, 2002.

168 NEUGEBAUER, U. et al. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 7, p. 1505-1517, 2005.

169 a) PATEL, Mohan N.; GANDHI, Deepen S.; PARMAR, Pradhuman A. DNA interaction and in-vitro antibacterial studies of fluoroquinolone based platinum (II) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 15, p. 248-251, 2012. b) SUN, Jing et al. Ruthenium (II) complexes interact with human serum albumin and induce apoptosis of tumor cells. **Biological trace element research**, v. 163, n. 1-2, p. 266-274, 2015. c) LI, Junfen et al. Spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of jatrorrhizine with human serum albumin (HSA). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 48-54, 2014. d) TSILIKI, Paulina et al. Structure, DNA-and albumin-binding of the manganese (II) complex with the non-steroidal antiinflammatory drug niflumic acid. **Polyhedron**, v. 53, p. 215-222, 2013. e) LAMMERS, Ivonne et al. Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 67-73, 2013.

170 a) ZHANG, Li-Wei; WANG, Kun; ZHANG, Xin-Xiang. Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis

and fluorescence method. **Analytica chimica acta**, v. 603, n. 1, p. 101-110, 2007. b) SEEDHER, Neelam; AGARWAL, Pooja. Complexation of fluoroquinolone antibiotics with human serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence**, v. 130, n. 10, p. 1841-1848, 2010. c) BAKAEEAN, Behnaz et al. Binding effect of common ions to human serum albumin in the presence of Norfloxacin: Investigation with spectroscopic and zeta potential approaches. **Journal of solution chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1777-1801, 2012. d) ŽIVEC, Petra et al. Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA-and albumin-binding. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 117, p. 35-47, 2012.

171 HILL, Terrell L. **Cooperativity theory in biochemistry: steady-state and equilibrium systems**. Springer Science & Business Media, 2013.

172 OLSON, Richard E.; CHRIST, David D. Plasma Protein Binding of Drugs. **Annual reports in medicinal chemistry**, v. 31, p. 327-336, 1996.

173 a) SHEEHAN, David. **Physical biochemistry: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2013.

174 a) KALANUR, Shankara S.; SEETHARAMAPPA, J.; KALALBANDI, Veerendra Kumar A. Characterization of interaction and the effect of carbamazepine on the structure of human serum albumin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 53, n. 3, p. 660-666, 2010. b) YU, Xianying et al. Study on the interaction between NCP-(4-hydroxycoumarins) and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, p. 113-117, 2012.

175 ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.