



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Complexos trinucleares simétricos de rutênio com ligantes azanaftalenos
como bons candidatos a metalofármacos: síntese, caracterização e estudos
biológicos”

Bruna Possato

Orientadora: Profa. Dra. Sofia Nikolaou

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Possato, Bruna

Complexos trinucleares simétricos de rutênio com ligantes azanaftalenos como bons candidatos a metalofármacos: síntese, caracterização e estudos biológicos

249 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Nikolaou, Sofia.

1. Complexos trinucleares de rutênio. 2. Azanaftalenos. 3. Espectroscopia. 4. Doença de Chagas. 5. Câncer. 6. Óxido Nítrico

Dedicatória

Dedico essa Tese de Doutorado à Terezinha e ao João, meus amados pais, que NUNCA duvidaram que, no final das contas, eu realizaria meus sonhos. Eles estiveram comigo para me amparar e me dar suporte, investiram seu amor, tempo, energia e dinheiro para que não faltasse nada para mim. E nunca faltou. Quando eu chorei, quando me desesperei, quando quis ir embora, eles sempre estiveram dispostos a me socorrer, me sacudir e me amar. À Aparecida, Vó Cida, porque ela continua esperando pacientemente que eu volte para casa depois da minha longa jornada, mesmo sem entender porque eu precisei ir embora. Ao Misaac, por ser a melhor parte de mim, por me encontrar, me aceitar, me amar e permanecer, mesmo em meio aos meus sentimentos caóticos. E por nunca me abandonar no meio de uma choradeira.

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Sofia Nikolaou pelos anos de dedicação, empenho e preocupação com a minha formação profissional e pessoal. Eu sei que não foi uma tarefa fácil, principalmente pelo tamanho da minha teimosia e resistência em obedecê-la. Todas as conversas e lições de química (ou de vida) foram de extrema importância para que houvesse o meu crescimento. Muito obrigada por tratar o doutorado como uma fase de passagem para mim. Professora, eu espero que todo o esforço tenha sido válido e que eu nunca a decepcione como profissional. Esses anos foram muito preciosos e necessários para o meu desenvolvimento.

Aos meus colegas de laboratório, primeiramente por me aguentarem ao longos dos quatro anos, lidando da melhor maneira possível com o meu excesso de entusiasmo e toda a bagunça que eu causei. Depois, pelas ricas discussões científicas e esforço em me ajudar. Por tudo isso, agradeço à Dra. Mariete B. Moreira pelos anos de parceria; à Dra. Lilian Franco por ser paz em meio à tormenta; à Me. Natacha Cacita pela ajuda com os ensaios de HSA, mas, principalmente, por ser meu braço direito na manutenção de tudo do laboratório; ao Me. Felipe Reis por sempre ter uma palavra para me puxar de volta para o chão; à Me. Camila F. N. da Silva pela incrível quantidade de tempo que permanecemos trabalhando insanamente; à Gabriele Hagashijima e Natália Marcomini que, apesar do pouco tempo de convivência, sempre se mostraram muito solícitas e fiéis; ao Ricardo Júnior por todos os momentos de descontração e à Samya Souza pela atenção e carinho sempre.

À Bel. Luandra A. U. Takahashi, por participar de todas as "*Eureka!*", por me acompanhar aos sábados, domingos e feriados, por ser minha fiel escudeira, por deixar minha loucura fluir sem se incomodar com isso, por aguentar todas as broncas e, finalmente, por deixar eu entrar na sua vida. Lu, eu só posso agradecer por tudo que você fez por mim.

Aos colegas do laboratório do Prof. Roberto Santana, por me receberem sinceramente e de braços abertos, por me inserirem em suas rotinas e me fazerem ser parte de um todo. Aos técnicos Dra. Juliana e Clóvis Júnior pelo auxílio na fase

inicial do desenvolvimento desse trabalho e por não me deixarem colocar fogo no laboratório (brincadeira, todo mundo sabe que eu sou muito cuidadosa). Eu agradeço aos queridos Dra. Lucimara Argawaal, Dra. Juliana Uzueli, Dra. Loyanne Ramos, Dra. Laena Permonian, Me. Laísa Negri - principalmente disponibilidade em realizar os ensaios de atividade anticâncer, Me. Tássia Joi, Me. Ana Gaspari, que me acompanha desde 2011, Prof. Me. Leandro Máximo, presente desde os tempos da IC, Renata da Silveira, Bel. Alexia Marques e Cássia Dias. Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva por sempre ceder seu espaço para nos acolher e seus equipamentos para a realização dos trabalhos, e por nos ajudar tão ativamente com ideias e sugestões.

À Dra. Jaqueline Querino pela intensa contribuição na parte das interações com biomoléculas e por estar presente em todas as etapas de confecção desta Tese. Jacque, muito obrigada por perder a semana do recesso e quase perder a noite de Ano Novo para que a gente conseguisse terminar os experimentos com DNA.

Aos colegas alunos do Prof. Maurício Caiut, pelos anos de companheirismo e boa convivência e por estarem sempre dispostos e animados! Por isso, agradeço ao Me. João Gonçalves, especialmente por conviver comigo há 25 anos; ao Me. André Riul pelas incansáveis discussões e os queridos Caroline, Larissa, Roberta, Eloísa, Fernando, Renata por fazerem parte da minha história. Agradeço ao próprio Prof. Dr. Maurício Caiut pela disposição e boa vontade em me ajudar e por ceder um pouco da sua infraestrutura para contribuir com esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque e à Dra. Zumira Carneiro pela incrível disponibilidade em realizar os ensaios de atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*, e por me ajudar e sanar as dúvidas sobre o universo da Doença de Chagas.

Ao Prof. Dr. Zeki Naal pelo empenho em empolgação com a eletroquímica, que contagiou também a Me. Laila Deliberto e o Me. David Sawazaki nos estudos com complexos de rutênio. Agradeço também à Profa. Dra. Rose Mary Naal por sempre me receber com disposição e solicitude. Aos queridos Prof. Me. Miquéias Gomes e Profa. Me. Pamela O. Gomes por me oferecerem muito mais que ajuda com os voltamogramas cíclicos. (abro aqui um espaço para agradecer também meu pai, João Possato, por ficar comigo durante as madrugadas de Voltametria Cíclica)

Ao Prof. Dr. André Formiga pela incrível contribuição com os cálculos teóricos, feitos com tanto carinho, dedicação e rapidez.

Ao Prof. Dr. Victor Deflon por me receber inúmeras vezes no IQSC-USP com os potinhos contendo “monocristais”, e por conseguir encontrar um cristal adequado para a resolução da estrutura por Difração de Raios-X. À Dra. Rafaela Pesci por passar pelo menos uma tarde toda tentando fazer os cristais difratarem.

Ao Prof. Koiti Araki por ceder a célula de espectroeletrólítica para a realização dos experimentos desta Tese.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, primeiramente por não deixar que eu desistisse do curso em 2008; depois, por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para a realização das análises de ITC, nas várias tentativas realizadas pacientemente pela Dra. Maitê Bolean.

Ao Prof. Dr. Arthur H. C. de Oliveira pelas intensas discussões e ensinamentos sobre DNA e pela disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas e inseguranças sobre a realização dos experimentos. À Profa. Me. Elise Marques por dedicar tanto tempo à preparação e realização dos experimentos com DNA plasmidial.

Ao Prof. Anderson Rodrigo de Moraes pela colaboração com os ensaios de metabolismo *in vitro* e à Bel. Maísa Habenschus, Me. Daniel Carrão e Me. Júlia Martins pela execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Antonio E. Miller Crotti e ao Dr. Eduardo Crevelin por me aceitarem como colaboradora no artigo da *Analytical Chemistry*. Aos demais membros do Laboratório de Síntese Orgânica por sempre estarem dispostos a me ajudar com todos os tipos de questões (sintéticas ou não), especialmente aos Me. Daniel Previdi, Me. Hebert Dias e Me. Wesley Silva.

À Dra. Ivana Borin primeiro pela sua disponibilidade em nos ajudar nas tarefas do laboratório, sempre com boa vontade e dedicação. Depois, por trabalhar fora do horário vários dias para que as análises por AFM ficassem prontas antes do Natal, e por todo o apoio ao longo dos anos de graduação e pós-graduação.

Ao Me. Vinícius Palaretti pela prontidão em receber nossas amostras de RMN sempre tão cheias de peculiaridades e cuidados especiais, e pela paciência e esforço

em tentar entender nossas necessidades para nos ajudar da melhor maneira possível.

Ao José Carlos Tomaz, Dra. Jacqueline Mendonça e Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelas análises de Espectrometria de Massas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tonon pelas análises elementares.

Ao Prof. Dr. Grégoire Jean-François Demets pela orientação e supervisão nos estágios PAE, pela disponibilidade em sempre nos ajudar e dar boas ideias e pelas dicas importantes no exame de qualificação. Ao Dr. Evandro Castaldelli pela colaboração no desenvolvimento de novos complexos e ao Prof. Me. Francisco Araújo pelos anos de discussões de nível elevadíssimo, companheirismo e amizade.

A todos os queridos amigos do grupo da Profa. Dra. Rogéria Gonçalves, especialmente Me. Wesley Muscelli, Me. Fábio Caixeta e Bel. Fernanda Hedinger. À Profa. Dra. Rogéria Gonçalves por ser uma professora espetacular, pelos anos de preciosos ensinamentos, infindável paciência e extrema dedicação, nos quais sempre se colocou à disposição para ricas discussões, imprescindíveis aconselhamentos e amizade sincera.

Aos integrantes do Laboratório de Terras Raras, por toda ajuda com reagentes e equipamentos, discussões científicas e anos de amizade. Agradeço especialmente à Profa. Dra. Juliana Fonseca de Lima e ao Dr. Paulo César Souza Filho pela amizade que começou durante a graduação, passou pelas tormentas da pós-graduação (quando eles sempre estiveram prontos para me ajudar) e persiste apesar do tempo e da distância. Ao Prof. Dr. Osvaldo A. Serra pelos ensinamentos durante a supervisão do estágio de docência.

Aos integrantes do Laboratório de Bioinorgânica pela disponibilidade para auxiliar na rotina da pesquisa. Agradeço especialmente ao Dr. Isaltino Barbosa, Me. Lucas Zanatta e Me. Fabrício Zanardi pelos seis anos de amizade e pela prontidão em sempre me auxiliar nas questões pessoais e profissionais. Agradeço à Profa. Dra. Yassuko Yamamoto por disponibilizar a infraestrutura do laboratório para a execução de partes desse trabalho.

À Profa. Dra. Joicy Santamalvina, que teve razão desde o começo, e ao Prof. Dr. Lucas Bolzon por me resgatarem e me colocarem de volta nos trilhos da oração e da dedicação acadêmica exclusiva.

À Profa. Dra. Aline Bruni (a.k.a. Boss) pelos aconselhamentos sobre a docência durante a supervisão do meu primeiro estágio PAE em 2011 e, novamente em 2013, por todo o conhecimento transmitido ao longo dos anos e **por ser muito mais do que as pessoas são capazes de enxergar e compreender.**

A todos os funcionários do Departamento de Química e Serviço de Pós-graduação da FFCLRP pela dedicação e atenção.

Às senhoras que cuidam da limpeza, especialmente Hélia, Rose e Solange, por sempre me cederem um espacinho na geladeira, na mesa e no coração.

Aos meus amigos:

Queridos, eu já disse em outro momento que Deus não me deu irmãos de sangue, mas me concedeu a graça de encontrar pessoas excepcionais e maravilhosas ao longo do meu caminho. Eu não posso nomeá-los porque, graças a Ele, eu precisaria de outra tese para elencar todos e contar as histórias de companheirismo e amizade. Aproveito para me desculpar pela ausência (também chamada de sumiço), mas eu ainda não aprendi a não sumir. Vocês me deram sobrinhos, lições de vida e de superação, amor, carinho, me apresentaram a fé, multiplicaram minhas amizades, me fizeram ser parte de algo grande e maravilhoso (família). Eu me senti sozinha durante anos, até conhecer vocês e minha vida mudar. Hoje eu compreendo o sentido da amizade e tudo o que ela proporciona. Eu sei que posso contar com vocês PARA ABSOLUTAMENTE QUALQUER COISA. Deus me deu amigos capazes de entrar em batalhas por mim, e isso é muito precioso. Saibam que eu sou capaz de tudo isso por vocês também. Uma vez meu professor de cultura religiosa pediu para a turma definir o que é amor fraternal, e eu, timidamente, levantei a mão e disse que não era capaz de fazer essa definição, porque eu não conhecia esse amor. Hoje eu sei exatamente o que amor de irmão quer dizer. E por isso, fica registrado aqui o meu MUITO OBRIGADA.

Christo Nihil Praeponere

*“⁴Mas tu, Iahweh, és o escudo que me protege,
minha glória e o que me ergue a cabeça.*

*⁵Em alta voz eu grito a Iahweh,
e ele me responde do seu monte sagrado.*

⁶Eu me deito e logo adormeço.

Desperto, pois é Iahweh quem me sustenta.”

Salmo 3, 4-6

“[...]Não estou querendo provar nada, a propósito. Sou um cientista e sei muito bem o que pode ser chamado de prova. Mas o motivo pelo qual desejo ser chamado pelo meu apelido de infância é exatamente esse: *me lembrar de que um cientista deve, acima de tudo, ser como uma criança*. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independentemente daquilo ser o que ele imaginava ver ou não. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão, você só vai ver o que você espera ver. A maioria dos cientistas se esquece disso. [...] Não dá para ser um cientista se você for ficar se preocupando se as pessoas vão ou não te achar bobo.[...]”

Adams, Douglas. *Até mais, e obrigado pelos peixes*. p. 116, Editora Arqueiro, 2010, São Paulo.

“I don’t wanna be someone who walks away so easily
I’m here to stay and make the difference that I can make [...]
[...] I had to learn what I’ve got, and what I’m not and who I am.”

I won’t give up - Jason Mraz - *in Love is a four letter word*, 2012, Atlantic

Resumo

Neste trabalho, uma nova série de complexos trinucleares simétricos de rutênio com ligantes azanaftalenos foi descrita. As atividades tripanocida e anticâncer foram investigadas, assim como a interação com biomoléculas. Foram sintetizados seis complexos com fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$ (L = **(1)** quinazolina (qui), **(2)** 5-nitroisoquinolina (5-nitro), **(3)** 5-bromoisoquinolina (5-briq), **(4)** isoquinolina (iq), **(5)** 5-aminoisoquinolina (5-amiq), e **(6)** 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (thiq)). A caracterização foi feita por espectrometria de massas, espectroscopias de RMN, infravermelho e UV-visível, voltametria cíclica e espectroeletrólise. A estrutura cristalina do complexo 1, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6$, foi determinada por difração de raios-X, e confirmou sua estrutura triangular. Os ligantes azanaftalenos estenderam o sistema π ao longo do complexo. Como consequência, a coplanaridade dos três ligantes quinazolina com a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ sugere que o acoplamento eletrônico é mais pronunciado através dos orbitais moleculares que interagem nessa direção. A extensão do sistema π foi confirmada por espectroeletrólise. Foram encontradas correlações entre os valores de pK_a dos azanaftalenos como ligantes livres e os dados espectroscópicos e eletroquímicos. As propriedades dos complexos dependem da basicidade dos ligantes periféricos. Essa dependência foi racionalizada em termos dos orbitais moleculares da deslocalização eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, bem como da estrutura dos ligantes. Em relação às potenciais aplicações biológicas da série, houve uma considerável atividade tripanocida *in vitro* contra ambas as formas tripomastigota e amastigota do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos para o complexo 6 (1,39 e 1,06 μM respectivamente) foram suficientemente bons para permitir a continuidade dos estudos *in vivo*. A avaliação da atividade anticâncer mostrou resultados satisfatórios. Exceto para os complexos 3 e 6, as atividades anticâncer foram maiores que a da cisplatina. Os complexos 4 e 5 mostraram os menores resultados de viabilidade celular da série, ambos com 18% em 15 μM . Os resultados biológicos mostraram que devia-se investigar o comportamento com biomoléculas alvo. Os complexos tiveram uma grande afinidade pela Albumina de Soro Humano, uma vez foram encontradas constantes de supressão de fluorescência (K_{sv}) em torno de 10^7 , e constantes de ligação (K_b) em torno de 10^5 - 10^6 . O complexo 5 também mostrou o melhor perfil de interação. Com o DNA, as melhores interações foram para os complexos 5 e 6. Ambos possuem constantes de ligação em torno de 10^4 , enquanto os outros complexos tiveram valores em torno de 10^3 . Além dos resultados biológicos, uma nova rota sintética foi proposta para obter nitrosilo complexos trinucleares de rutênio de uma maneira mais fácil e menos perigosa. Finalmente, os resultados mostram que estudos para elucidar os mecanismos de ação dos novos complexos podem ser conduzidos.

Abstract

In this work, a new series of symmetric trinuclear ruthenium complexes combined with azanaphthalene ligands was reported. Trypanocidal and anticancer activities were investigated, as well as the interaction with biomolecules. We synthesized six complexes with general formula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$ (L = **(1)** quinazoline (qui), **(2)** 5-nitroisoquinoline (5-nitro), **(3)** 5-bromoisoquinoline (5-briq), **(4)** isoquinoline (iq), **(5)** 5-aminoisoquinoline (5-amiq), and **(6)** 5,6,7,8-tetrahydroisoquinoline (thiq)). The characterization was performed by mass spectrometry, NMR, infrared and UV-visible spectroscopies, cyclic voltammetry and spectroelectrochemistry. The crystal structure of complex 1, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6$, was determined by X-ray diffraction, confirming its triangular structure. Azanaphthalene ligand extends the electronic π -system to the whole compound. As a consequence, the co-planarity of the three quinazoline ligands with the $[\text{Ru}_3\text{O}]$ unit suggests that electronic coupling is more pronounced through the molecular orbitals that interact in this orientation. The extension of π -system was confirmed by spectroelectrochemistry. We found a correlation between the pK_a values of the azanaphthalene ligands and spectroscopic and electrochemical data. The properties of the $[\text{Ru}_3\text{O}]$ -azanaphthalene core depended on the basicity of the peripheral ligands. This dependence was rationalized in terms of the molecular orbital of the delocalized $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ unit as well as the structure of the ligands. Regarding the potential biological applications of the series, it presented considerable *in vitro* trypanocidal activity against both the trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. The results obtained to complex 6 (1.39 and 1.06 μM respectively) were good enough to allow continuing *in vivo* studies. All anticancer evaluations showed satisfactory results. Except for complexes 3 and 6, the anticancer activities were higher than cisplatin. Complexes 4 and 5 showed smaller results for the cellular viability, with 18% with 15 μM . The biological results show that is reasonable to investigate the behavior against target biomolecules. The complexes have a great affinity for albumin, since we found a fluoresced quenching constant (K_{sv}) around 10^7 , and bonding constants (K_{b}) around 10^5 - 10^6 . The complex 5 also showed the best interaction profile. The DNA interaction was better for complexes 5 and 6. Both have bonding constants around 10^4 , whereas the others complexes have values around 10^3 . Beyond the biological results, a new synthetic route was proposed to obtain nitrosyl trinuclear ruthenium complexes in an easier and harmless way. Finally, results are able to drive studies forward to elucidate the mechanisms of action for the new complexes.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{PPh}_3)_3]^+$ resolvida por Cotton e Norman através de dados cristalográficos para os complexos trinucleares de rutênio	3
Figura 2. Diagrama de orbitais moleculares proposto por Meyer e colaboradores para complexos trinucleares de rutênio sob simetria D_{3h}	3
Figura 3. Esquema representando a formação dos complexos trinucleares de rutênio	5
Figura 4. Estruturas dos complexos (a) <i>Ruthenium red</i> , (b) NAMI-A e (c) KP1019	7
Figura 5. A. Estrutura do quinino. B. Estrutura da cloroquina.....	7
Figura 6. Dois medicamentos utilizados no tratamento da Doença de Chagas	9
Figura 7. Foto tirada por Carlos Chagas da menina Berenice, a primeira paciente diagnosticada com a Doença de Chagas. A seta vermelha indica o sintoma mais comum na fase aguda da doença: o sinal de Romaña, um inchaço nas pálpebras de um olho ..	10
Figura 8. Mapa dos movimentos populacionais latinos relacionando o número de casos à presença de imigrantes	10
Figura 9. Bases nitrogenadas presentes no DNA.....	12
Figura 10. A. Esquema representando a cisplatina ligando-se covalentemente ao N_7 da Guanina e Adenina. B. Modos de ligação da cisplatina no DNA.....	13
Figura 11. Tipos de interação não-covalente e exemplos de compostos que se ligam ao DNA por meio delas. A. Intercalação B. <i>Groove Binding</i> C. Ligação externa.....	13
Figura 12. Estrutura da HSA, obtida por difração de raios-X.....	15
Figura 13. Estrutura proposta para os complexos apresentados nesta tese.....	25
Figura 14. Variação espectral, causada pela protonação da 5-bromoisoquinolina, observada na faixa de pH 2,29 a 8,89	29
Figura 15. Da esquerda para a direita: a. curva da titulação espectrofotométrica do ligante 5-bromoisoquinolina; b. primeira derivada de (a); c. segunda derivada de (a)	29
Figura 16. Esquema representando a classificação dos ligantes utilizados	30
Figura 17. Espectro de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 2 antes da purificação	31
Figura 18. Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6 \cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$, mostrando a desordem do solvente.....	32

Figura 19. (superior) Diagrama ORTEP para o cátion $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$. (inferior) Vista lateral explicitando a coplanaridade dos ligantes.	33
Figura 20. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1064,95.....	37
Figura 21. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1064,95	37
Figura 22. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1096,89.....	38
Figura 23. Espectro <i>full scan</i> por MALDI+ do íon de m/z 1020,93, referente ao complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-nitro})_2]^+$	38
Figura 24. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1297,61.....	39
Figura 25. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1297,54	39
Figura 26. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1061,96.....	40
Figura 27. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1062,01	40
Figura 28. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1106,93.....	41
Figura 29. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1107,03	41
Figura 30. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1073,99.....	42
Figura 31. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1074,11	42
Figura 32. Esquema ilustrando a frustração de spin.....	45
Figura 33. Diagrama de orbitais moleculares proposto para complexos trinucleares de rutênio com simetria D_{3h}	46
Figura 34. Ilustração do mecanismo de pseudocontato	47
Figura 35. Ilustração do mecanismo de contato de Fermi	48
Figura 36. A. Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_0]^0$ obtido em clorofórmio- d_3 . B. Espectro de ^1H -RMN do complexo 3 , $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_3]^+$ obtido em acetona- d_6	49
Figura 37. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo 1 , obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3	52
Figura 38. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo 2 , obtidos de uma solução 1 mM em acetonitrila- d_3	53
Figura 39. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo 3 , obtidos de uma solução 10 mM em acetona- d_6	54
Figura 40. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo 4 , obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3	55

Figura 41. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo 5 , obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3	56
Figura 42. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo 6 , obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3	57
Figura 43. Dependência dos valores de $\Delta\delta$ (ppm) dos hidrogênios dos ligantes 5-nitroisoquinolina, 5-bromoisoquinolina e 5-aminoisoquinolina com o e parâmetro de Hammett σ_p , e dependência dos valores de deslocamento químico dos ligantes livres com o pK_a	61
Figura 44. Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios da ponte acetato com o pK_a dos ligantes livres para os complexos 1-6	62
Figura 45. Espectro de infravermelho do complexo 1 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-	64
Figura 46. Espectro de infravermelho do complexo 2 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-	64
Figura 47. Espectro de infravermelho do complexo 3 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-	65
Figura 48. Espectro de infravermelho do complexo 4 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-	65
Figura 49. Espectro de infravermelho do complexo 5 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-	66
Figura 50. Espectro de infravermelho do complexo 6 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-	66
Figura 51. Dependência da energia do estiramento $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ com o pK_a dos ligantes azanaftalenos livres para os complexos 1-6	69

Figura 52. Espectros de infravermelho do complexo 1 antes da secagem (A), depois da secagem (B) e ATR (C).....	70
Figura 53. A. Espectro de absorção na região UV-vis do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_3]^+$, apresentando a deconvolução das bandas; B. diagrama de orbitais moleculares para complexos sob simetria D_{3h} , mostrando as transições eletrônicas referentes ao espectro.....	71
Figura 54. A-F.....	73
Figura 55. Variação da energia da transição IC dos complexos 1-6 com o pK_a dos ligantes azanaftalenos.....	75
Figura 56. Combinação entre os orbitais $dy'z'$ do metal e p_z do oxigênio, dando origem aos orbitais a_2'' e a_2'' antiligante e e''	76
Figura 57. A-F. Voltamogramas cíclicos dos complexos 1-6, registrados em benzonitrila. $[\text{TBABF}_4] = 0,1 \text{ M}$, $[\text{complexos } 1, 3, 4, 5] = 1 \text{ mM}$, $[\text{complexo } 2] = 0,1 \text{ mM}$, $[\text{complexo } 6] = 10 \text{ mM}$	77
Figura 58. Dependência dos valores de $E_{1/2}$ com o pK_a dos ligantes periféricos.....	78
Figura 59. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 1, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$	81
Figura 60. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 2, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$	81
Figura 61. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 3, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$	82
Figura 62. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 3, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo oxidativo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/+2}$	82
Figura 63. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 4, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$	83

Figura 64. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 5, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$	83
Figura 65. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 6, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$	84
Figura 66. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 4, obtidos em acetonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$	84
Figura 67. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 5, obtidos em acetonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{+1/0}$	85
Figura 68. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 5, obtidos em acetonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[Ru_3O]^{0/-1}$	85
Figura 69. Células B16F10 com 80% de confluência.....	92
Figura 70. Atividade tripanocida <i>in vitro</i> dos ligantes (superior) e dos respectivos complexos trinucleares (inferior) contra a fase tripomastigota do <i>T. cruzi</i> . A porcentagem da atividade tripanocida foi normalizada com o controle negativo.....	93
Figura 71. Atividade tripanocida <i>in vitro</i> dos ligantes (superior) e dos respectivos complexos trinucleares (inferior) contra a fase amastigota do <i>T. cruzi</i> . A porcentagem da atividade tripanocida foi normalizada com o controle negativo.....	94
Figura 72. Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos ligantes (superior) e dos respectivos complexos trinucleares (inferior). O meio de cultura foi utilizado como controle negativo e Tween 20 como controle positivo.....	95
Figura 73. Estudo da parasitemia dos camundongos tratados com o complexo 6 e com benzonidazol	98
Figura 74. Resultados da PCR para o tecido cardíaco dos camundongos tratados com benzonidazol (100 mg/kg) e com o complexo com thiq (25 mg/kg)	99

Figura 75 A-F. Efeito citotóxico, em células B16F10, da cisplatina (50 μM), dos ligantes livres (100 μM) e dos complexos 1-6 com concentrações de 5-20 μM , tempo de incubação de 24 h e ausência de estímulo luminoso	101
Figura 76. Efeito citotóxico, na linhagem celular L929, do complexo 4 numa faixa de concentrações de 2-10 μM	104
Figura 77. Mica utilizada como porta-amostras na Microscopia de Força Atômica	110
Figura 78. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 1 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-92,5 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas.....	114
Figura 79. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 2 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-93,5 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas ...	115
Figura 80. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 3 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-64,1 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas.....	116
Figura 81. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 4 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-85,9 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas.....	117
Figura 82. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 5 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do	

titulante de 0-53,1 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas.....	118
Figura 83. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 6 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-59,6 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas.....	119
Figura 84. Titulação espectrofotométrica acompanhada por espectros de fluorescência do complexo EB-DNA na presença de quantidades crescentes de cisplatina	121
Figura 85. Titulação espectrofotométrica, a 37 °C, do complexo 1 com <i>fs</i> -DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. <i>Inset</i> . Ampliação da variação espectral na região de 700 nm	122
Figura 86. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 258 nm do complexo 1 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	123
Figura 87. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 1 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	124
Figura 88. Titulação espectrofotométrica do complexo 2 com <i>fs</i> -DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. <i>Inset</i> . Ampliação da variação espectral na região de 350 nm.....	125
Figura 89. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo 2 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	126

Figura 90. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 340 nm do complexo 2 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	127
Figura 91. Titulação espectrofotométrica do complexo 3 com <i>fs</i> -DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. <i>Inset</i> . Ampliação da variação espectral na região de 700 nm.....	128
Figura 92. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 257 nm do complexo 3 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	129
Figura 93. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 3 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	130
Figura 94. Titulação espectrofotométrica do complexo 4 com <i>fs</i> -DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. <i>Inset</i> . Ampliação da variação espectral na região de 320 e 700 nm.....	131
Figura 95. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo 4 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	132
Figura 96. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 320 nm do complexo 4 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	133
Figura 97. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 4 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	134

Figura 98. Titulação espectrofotométrica do complexo 5 com <i>fs</i> -DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. <i>Inset</i> . Ampliação da variação espectral na região de 350 e 700 nm.....	135
Figura 99. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 259 nm do complexo 5 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	136
Figura 100. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 5 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	137
Figura 101. Titulação espectrofotométrica do complexo 6 com <i>fs</i> -DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. <i>Inset</i> . Ampliação da variação espectral na região de 700 nm.....	138
Figura 102. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo 6 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	139
Figura 103. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 6 durante a titulação com o <i>fs</i> -DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas.....	140
Figura 104. A-F. Comparação entre a intensidade da última curva da titulação espectrofotométrica e a concentração equivalente de <i>fs</i> -DNA livre	144
Figura 105. Interação dos complexos 1-6 e cisplatina com o DNA plasmidial (2 horas).148	
Figura 106. Interação dos complexos 1-6 e cisplatina com o DNA plasmidial (24 horas)	148
Figura 107. A-H. Imagens obtidas através de AFM. A. Controle negativo (1% de DMSO); B. Cisplatina ($r=5$, 2h de incubação); todos os complexos.....	150
Figura 108. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o complexo 1 , acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-	

Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação.....	153
Figura 109. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o complexo 2 , acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação.....	153
Figura 110. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o complexo 3 , acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação.....	155
Figura 111. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o complexo 4 , acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação.....	156
Figura 112. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o complexo 5 , acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação.....	157
Figura 113. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o complexo 6 , acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação.....	158
Figura 114. Esquema ilustrando como o NO é produzido endogenamente.....	163
Figura 115. Esquema representando a janela terapêutica da Terapia Fotodinâmica.....	165

Figura 116. Esquema representando as etapas de obtenção de um nitrosilo complexo trinuclear de rutênio pelo método convencional	166
Figura 117. Esquema representando a obtenção de um nitrosilo complexo trinuclear de rutênio através do método proposto nesse trabalho	166
Figura 118. Esquema ilustrando o aparato utilizado para a geração do óxido nítrico	168
Figura 119. Fotografias feitas durante a reação para obtenção do CMNO, ilustrando a mudança de cor do meio	169
Figura 120. Espectro de absorção do $K_3[RuCl_6]$. (a medida foi realizada em desacordo com a Lei de Lambert-Beer para ressaltar a transição <i>d-d</i>)	170
Figura 121. A. Espectros de absorção na região UV-vis do “cluster mãe” purificado e do obtido pela rota sintética nova. B. (Figura retirada do relatório 2) Espectros de absorção na região UV-vis do “cluster mãe” purificado e do impuro.....	171
Figura 122. Espectros de absorção do “cluster mãe” antes e depois da reação com NO. As bandas marcadas (**) foram atribuídas como transições transferência de carga e as bandas marcadas por (*), transições intracluster.....	172
Figura 123. Espectro de infravermelho do CMNO destacando o estiramento do NO em 1880 cm^{-1}	173
Figura 124. Espectro COSY para o complexo 3 na forma reduzida.....	212
Figura 125. Atividade anticâncer contra alinhagem B16F10 para os complexos 1-6 obtida na incubação por 4 h.....	213
Figura 126. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. A banda marcada refere-se ao <i>ct</i> -DNA degradado após armazenamento feito posterior à utilização	214
Figura 127. Titulações espectrofotométricas do complexo 1 com <i>fs</i> -DNA em 25 e 30 °C	214
Figura 128. Titulações espectrofotométricas do complexo 2 com <i>fs</i> -DNA em 25 e 30 °C	215
Figura 129. Titulações espectrofotométricas do complexo 3 com <i>fs</i> -DNA em 25 e 30 °C	215
Figura 130. Titulações espectrofotométricas do complexo 4 com <i>fs</i> -DNA em 25 e 30 °C	215
Figura 131. Titulações espectrofotométricas do complexo 5 com <i>fs</i> -DNA em 25 e 30 °C	216
Figura 132. Titulações espectrofotométricas do complexo 6 com <i>fs</i> -DNA em 25 e 30 °C	216

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista dos ligantes utilizados na síntese dos complexos trinucleares simétricos	18
Tabela 2. Reagentes utilizados durante a execução do projeto de pesquisa	19
Tabela 3. Comprimentos de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) utilizados para cálculo do pK_a de cada ligante	21
Tabela 4. Valores de pK_a referentes a cada ligante.....	30
Tabela 5. Dados cristalográficos obtidos pelo refinamento da estrutura do complexo....	34
Tabela 6. Comprimentos e ângulos das ligações na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ de $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$	34
Tabela 7. Resultados obtidos através dos espectros de massa (MS^2) dos complexos 1-6.	44
Tabela 8. Correlação entre os sinais nos espectros do complexo 3 nas formas reduzida e oxidada.....	50
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios nos espectros ^1H -RMN dos ligantes livres	51
Tabela 10. Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos nos espectros de ^1H -RMN	58
Tabela 11. Variação dos deslocamentos químicos $\Delta\delta$ dos hidrogênios nos espectros ^1H -RMN dos ligantes livres	60
Tabela 12. Atribuição das bandas dos espectros de infravermelho dos complexos 1-6 ...	67
Tabela 13. Atribuições tentativas das transições presentes nos espectros de absorção na região do UV-vis dos complexos 1-6	74
Tabela 14. Valores de $E_{1/2}$ obtidos para os complexos 1-6.....	78
Tabela 15. Comparação entre os valores calculados e os resultados obtidos para análise elementar dos complexos 1-6.....	87
Tabela 16. Dados obtidos da atividade tripanocida contra a fase tripomastigota e amastigota do <i>T. cruzi</i> (IC_{50}), valores da Dose Letal (DL_{50}) contra a linhagem LLC-MK ₂ e o Índice de Seletividade (SI) para os compostos 1-6	96
Tabela 17. Resumo dos valores de viabilidade celular apresentados pelos complexos 1-6, ligante livre e cisplatina.....	102
Tabela 18. Reagentes utilizados na etapa de interação com biomoléculas	106

Tabela 19. Resumo das constantes obtidas através do modelo de Stern-Volmer para o experimento do deslocamento do brometo de etídio.....	120
Tabela 20. Resumo das constantes obtidas através das curvas geradas pelo modelo de Benesi-Hildebrand e parâmetros termodinâmicos obtidos através da equação de van't Hoff.....	141
Tabela 21. Valores das constantes obtidos pelas equações de Stern-Volmer e van't Hoff para a interação dos complexos 1-6 com HSA.....	159
Tabela 22. Comprimentos de ligação obtidos para o complexo 1.....	195
Tabela 23. Ângulos de ligação obtidos para o complexo 1.....	197

Lista de Equações

Equação 1.....	21
Equação 2.....	107
Equação 3.....	108
Equação 4.....	109
Equação 5.....	109
Equação 6.....	111
Equação 7.....	111
Equação 8.....	111
Equação 9.....	152

Lista de Abreviaturas

ACN - Acetonitrila

AFM - *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)

ATR - *Attenuated Total Reflectance* (Reflectância Total Atenuada)

BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina de Soro Bovino)

DCM - Diclorometano

DL₅₀ - Dose Letal

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DRX - Difração de Raios-X

EB - Ethidium Bromide (Brometo de Etídio)

EPH - Eletrodo Padrão de Hidrogênio

ESI - *Electrospray Ionization* (Ionização por Spray Eletrolítico)

FS - Fish Sperm (Esperma de Peixe)

HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital

HSA - *Human Serum Albumin* (Albumina de Soro Humano)

IC - Intracluster

IC₅₀ - *Inhibitory Concentration* (Concentração de Inibição)

IL - Intraligante

ITC - *Isothermal Titration Calorimetry* (Calorimetria por Titulação Isotérmica)

LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MALDI- *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)

MeOH - Metanol

NAMI-A - *New Antitumor Metastasis Inhibitor* (Novo Inibidor Antitumoral de Metástase)

NIR - Near Infrared (Infravermelho próximo)

PBS - Phosphate Buffer Saline (Tampão Fosfato Salino)

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SI - *Selectivity Index* (Índice de Seletividade)

TCCL - Transferência de Carga do Cluster para o Ligante

TOF - *Time Of Flight* (Tempo de voo)

UV- Ultravioleta

Vis - Visível

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

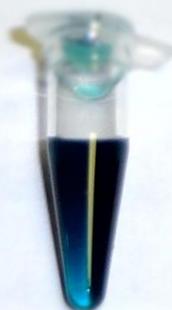
Sumário

Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Equações	xvi
Lista de Abreviaturas	xvii
Considerações iniciais	1
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	2
1. Introdução.....	2
1. Complexos Trinucleares de Rutênio	2
a) Desenvolvimento histórico	2
b) Obtenção dos complexos.....	4
c) Aplicações biológicas.....	5
2. Metalofármacos de rutênio.....	5
3. Azanaftalenos	7
4. Doença de Chagas	8
5. Câncer.....	11
6. Interação com Biomoléculas.....	12
a) DNA	12
b) Albumina de Soro Humano.....	14
2. Objetivos.....	16
CAPÍTULO 2 PROPRIEDADES QUÍMICAS, ELETROQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS.....	17
1. Materiais e Métodos	17
1. Reagentes.....	17
a) Listagem dos reagentes.....	17
b) Purificação.....	20
2. Cálculo do pK _a dos ligantes.....	20
3. Sínteses.....	21
a) [Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (CH ₃ OH) ₃]CH ₃ COO - “Cluster mãe”	21
b) Complexo 1 - [Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (qui) ₃]PF ₆	22
c) Complexo 2 - [Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (5-nitro) ₃]PF ₆	23
d) Complexo 3 - [Ru ₃ O(CH ₃ COO) ₆ (5-briq) ₃]PF ₆	23

e)	Complexo 4 - $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_3]\text{PF}_6$	24
f)	Complexo 5 - $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-amiq})_3]\text{PF}_6$	24
g)	Complexo 6 - $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{thiq})_3]\text{PF}_6$	24
4.	Instrumentação.....	25
a)	Difração de Raios-X em monocristal (DRX)	25
b)	Espectrometria de massas	25
c)	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	26
d)	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	26
e)	Espectroscopia de absorção na região UV-vis-NIR.....	26
f)	Voltametria cíclica	26
g)	Espectroeletrólise.....	27
h)	Análise elementar.....	27
2.	Resultados e discussão	28
1.	Cálculo do pK_a dos ligantes.....	28
2.	Sínteses	31
3.	Difração de Raios-X em monocristal (DRX)	32
4.	Espectrometria de massas.....	36
5.	Ressonância Magnética Nuclear	45
6.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	63
7.	Espectroscopia de absorção na região do UV-visível.....	71
8.	Voltametria cíclica	76
9.	Espectroeletrólise	80
10.	Análise elementar.....	87
3.	Conclusões parciais.....	88
CAPÍTULO 3 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS		89
1.	Materiais e métodos.....	89
1.	Atividade tripanocida.....	89
a)	Estudos in vitro da atividade tripanocida na fase tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> 89	
b)	Estudos in vitro da atividade tripanocida na fase amastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
c)	Citotoxicidade contra a linhagem LLC-MK ₂	90
d)	Estudos prévios da atividade in vivo do composto 6 contra a fase aguda da Doença de Chagas	90
2.	Atividade anticâncer	91

a) Avaliação preliminar da citotoxicidade contra a linhagem B16F10 (melanoma murino)	
91	
b) Avaliação preliminar da citotoxicidade do complexo 4 contra a linhagem L929	
(fibroblasto murino)	92
2. Resultados e discussão	92
1. Atividade tripanocida.....	92
a) Estudos in vitro	92
b) Estudos prévios da atividade in vivo	97
2. Atividade anticâncer	99
a) Avaliação preliminar da citotoxicidade contra a linhagem B16F10 (melanoma murino)	
99	
b) Avaliação preliminar da citotoxicidade do complexo 4 contra a linhagem L929	
(fibroblasto murino)	103
3. Conclusões parciais	105
CAPÍTULO 4 INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS.....	106
1. Materiais e métodos.....	106
1. Reagentes.....	106
2. Parte experimental.....	106
a) Interação com DNA - Deslocamento do brometo de etídio	106
b) Interação com DNA - Titulação espectrofotométrica na região UV-visível	107
c) Interação com plasmídeo pUC 19.....	109
d) Interação com albumina de soro humano (HSA)	110
3. Instrumentação.....	112
2. Resultados e discussão	112
1. Interação com DNA	112
2. Interação com Albumina de Soro Humano (HSA).....	151
3. Conclusões parciais	162
CAPÍTULO 5 NITROSILO COMPLEXOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO.....	163
3. Introdução.....	163
4. Materiais e métodos.....	166
a) Síntese do complexo $K_3[RuCl_6]$	166
b) Nova síntese do "cluster mãe" - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$	167
c) Síntese do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$	167
5. Resultados e discussão	169

a) Síntese do complexo $K_3[RuCl_6]$	169
b) Nova síntese do “cluster mãe” - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$	170
c) Síntese do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$	171
6. Conclusões parciais.....	174
Considerações finais	175
Referências Bibliográficas.....	180
ANEXO I.....	195
1. DRX.....	195
2. Espectrometria de massas.....	200
3. Ressonância Magnética Nuclear	212
ANEXO II.....	213
1. Atividade anticâncer	213
ANEXO III	214
2. DNA - Modelo de Benesi-Hildebrand	214



Considerações iniciais

As seções desta tese estão dispostas de uma maneira pouco usual, apresentadas na forma de capítulos compostos por sua própria metodologia, discussão e conclusões parciais. Isso porque, apesar de os complexos trinucleares de rutênio simétricos com ligantes azanaftalenos serem o objeto de estudo deste trabalho, a caracterização e correlações das propriedades espectroscópicas, as aplicações biológicas e interações com biomoléculas compõe blocos individuais com características próprias, e, portanto, a divisão em capítulos leva em consideração as semelhanças entre os assuntos, tornando a leitura mais fácil.

Cinco capítulos compõe esta tese: no capítulo 1 estão uma breve introdução dos assuntos tratados por este trabalho e os objetivos; no capítulo 2 as propriedades químicas, espectroscópicas e eletroquímicas dos complexos trinucleares simétricos estudados; no capítulo 3 encontram-se os experimentos de atividade biológica -atividade tripanocida e anticâncer - dos complexos; no capítulo 4 serão apresentadas suas interações com DNA e Albumina de Soro Humano; o capítulo 5 é o único que tem sua própria introdução, porque ele trata da síntese de um novo precursor para nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, e o assunto abordado não está diretamente ligado ao objeto de estudo deste trabalho; e, por fim, estão as considerações finais e as referências bibliográficas utilizadas para compor todos os capítulos.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

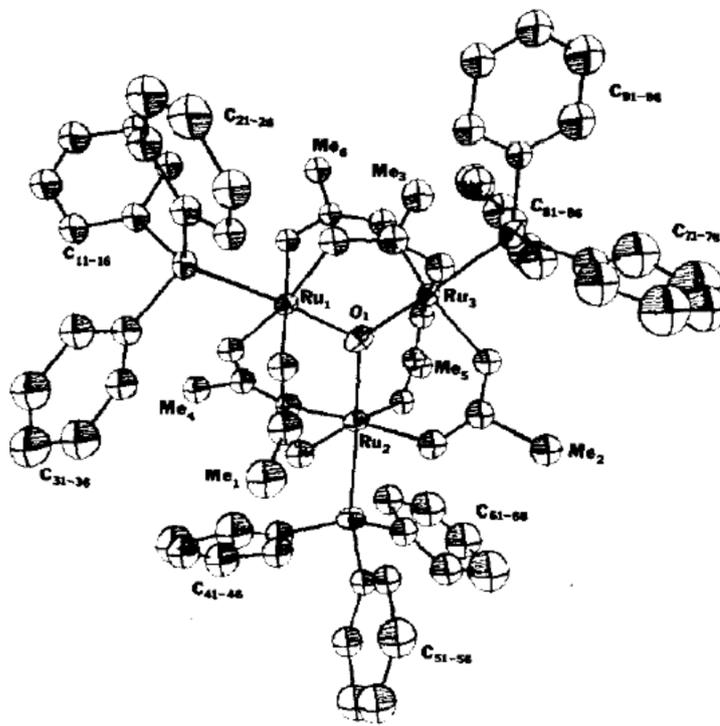
1. Introdução

1. Complexos Trinucleares de Rutênio

a) Desenvolvimento histórico

Os complexos trinucleares de rutênio começaram a ser estudados antes da década de 30 por Alfred William Mond, mas seu trabalho somente foi reportado na literatura após sua morte (MOND, 1930). Talvez esse tenha sido o principal motivo para o estudo dos complexos trinucleares de rutênio ter sido retomado somente na década de 50. Isso ocorreu quando F. S. Martin (MARTIN, 1952) motivado pelo trabalho de Mond, tentou propor uma estrutura para a espécie formada depois do aquecimento do cloreto ou hidróxido de rutênio com ácido acético glacial. Mas foi somente no final da década de 60 que Stephenson e Wilkinson (STEPHENSON; WILKINSON, 1966) trouxeram este assunto à tona novamente para, em 1971, a estrutura dos complexos trinucleares começar a ser elucidada (COTTON et al., 1971) e estudada de maneira sistemática por Spencer e Wilkinson (SPENCER; WILKINSON, 1972). Ainda em 1972, Cotton e Norman (COTTON; NORMAN, 1972) propuseram a estrutura trigonal com o oxigênio em ponte, por meio de difração de raios-X, como mostra a Figura 1:

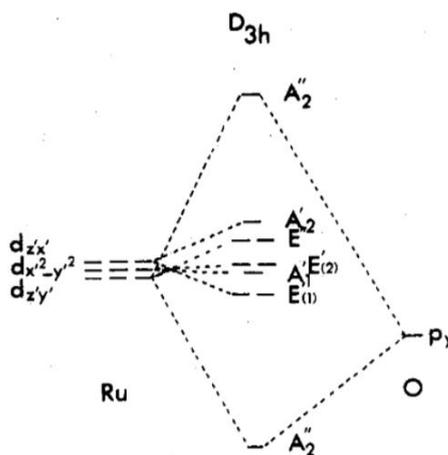
Figura 1. Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{PPh}_3)_3]^+$ resolvida por Cotton e Norman através de dados cristalográficos para os complexos trinucleares de rutênio



Fonte: (COTTON; NORMAN, 1972)

Alguns anos mais tarde, em 1978, Meyer e colaboradores (BAUMANN et al., 1978) realizaram o estudo seriado dessa classe de compostos, estabelecendo rotas sintéticas ainda utilizadas nos dias de hoje. Além disso, propuseram um diagrama de orbitais moleculares qualitativo para os complexos sob simetria D_{3h} (Figura 2) que, assim como as sínteses, ainda são amplamente aceitos na literatura.

Figura 2. Diagrama de orbitais moleculares proposto por Meyer e colaboradores para complexos trinucleares de rutênio sob simetria D_{3h}



Fonte: (BAUMANN et al., 1978)

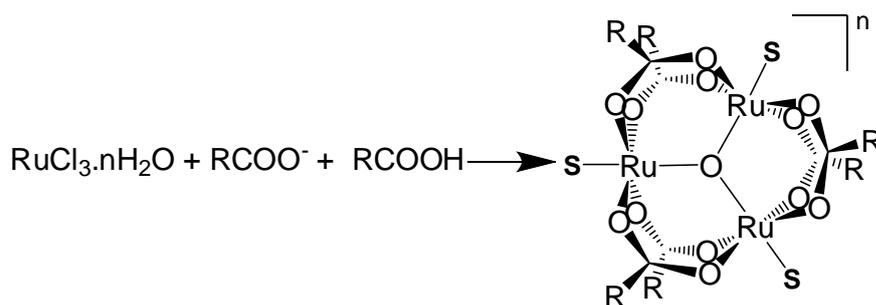
No Brasil, no final da década de 80, Toma e colaboradores (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988) realizam um estudo em série de complexos trinucleares de rutênio com pontes μ -oxo e μ -acetato - $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{N-Het})_3]\text{PF}_6$, onde N-Het são os N-heterociclos piridina, 4-aminopiridina, 4-tercbutilpiridina, isonicotinamida, 4-acetilpiridina, metilisonicotinamida, pirazina, 2-aminopirazina e 2,6-dimetilpirazina. Neste trabalho foram relacionadas as propriedades eletroquímicas ao pK_a dos ligantes livres, como uma maneira indireta de medir as capacidades σ -doadora e π -receptora dos ligantes.

Os complexos trinucleares de rutênio com pontes μ -oxo e μ -carboxilato, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{RCOO})_6(\text{L})_3]^n$ (onde R = H, CH_3 (TOMA et al., 2001), ou C_2H_5 ; L = CO (MOREIRA et al., 2016), NO (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002a; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015), ligantes piridínicos ou moléculas de solvente) apresentam propriedades muito interessantes; podem ser aplicados como unidades monoméricas para química supramolecular como metalo-dendrímeros (TOMA et al., 2012), na construção de dispositivos fotoativos (ABE et al., 2005), em transferência eletrônica fotoinduzida (KOSHIYAMA et al., 2011) e sistemas de valência mista (HENDERSON; KUBIAK, 2014). A deslocalização eletrônica na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^n$ é tão intensa que faz com que se comporte como um único íon metálico. Além disso, esse tipo de complexo pode alcançar um grande número de estados de oxidação, sendo que pelo menos três têm potencial para ocorrer em meio aquoso. Essas e outras propriedades podem ser moduladas pelos ligantes periféricos, como revisado por Toma e colaboradores em 2001 (TOMA et al., 2001).

b) *Obtenção dos complexos*

A formação da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^n$ ocorre de maneira espontânea quando íons de rutênio(III) são aquecidos na presença do carboxilato e do ácido carboxílico (Figura 3) correspondente, e, por esse motivo, classifica-se suas estruturas como sendo de automontagem (do inglês *self assembly*) (TOMA et al., 2001).

Figura 3. Esquema representando a formação dos complexos trinucleares de rutênio



Fonte: (TOMA et al., 2001)

c) Aplicações biológicas

Apesar de serem conhecidos há mais de 80 anos, o interesse pela utilização dos complexos trinucleares de rutênio em meio biológico é bastante recente. Nikolaou e colaboradores (CARNEIRO et al., 2014) publicaram, em 2014, o primeiro trabalho sobre atividade de um complexo trinuclear de rutênio, mostrando que o composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (4-pic = 4-metilpiridina) foi efetivo contra as células de melanoma B16F10. O complexo é capaz de liberar NO por meio de estímulo luminoso; na ausência de luz, a liberação ocorre por meio da ação de redutores endógenos. Mais tarde, no mesmo ano, Tauchman e colaboradores (TAUCHMAN et al., 2014) exploraram a citotoxicidade de uma série de complexos simétricos com ligantes imidazólicos e oxazólicos contra a linhagem A549 de câncer de pulmão. Nikolaou e colaboradores (CACITA et al., 2015) ainda avaliaram as propriedades de vasodilatação do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ (3-pic = 3-metilpiridina) que, como descrito para o complexo com 4-metilpiridina, libera óxido nítrico sob estímulo redutivo, causando o relaxamento do endotélio em aortas de rato pré-contraídas.

2. Metalofármacos de rutênio

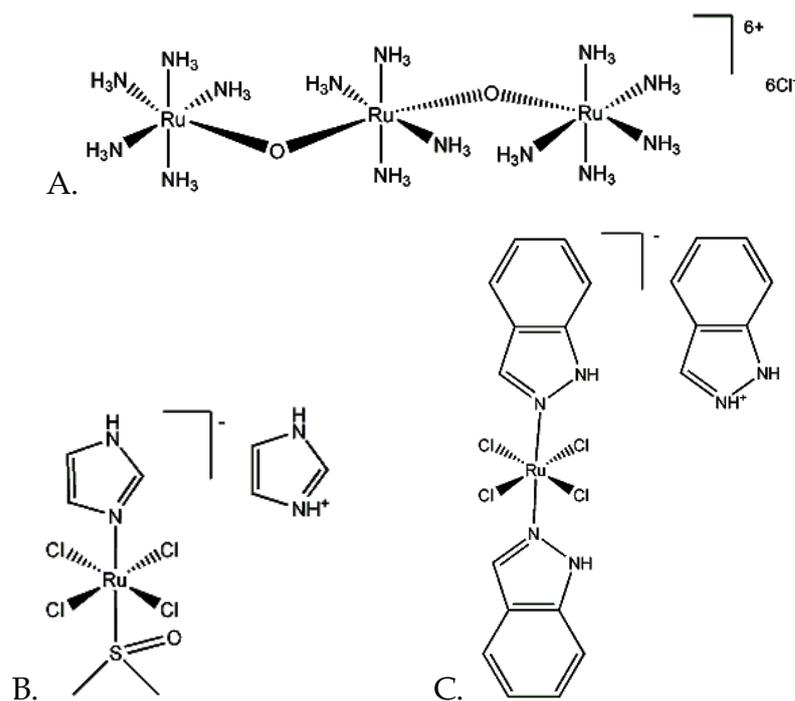
Embora o rutênio não seja um metal essencial no meio biológico como é o caso, por exemplo, do ferro, do magnésio e do cobalto, a química de coordenação de rutênio tem despertado interesse nos pesquisadores para sua utilização em aplicações biológicas.

Dentro da pesquisa sobre a atividade biológica de complexos metálicos, os complexos de rutênio são conhecidos e estudados por se tratarem de metalofármacos em potencial, uma vez que possuem propriedades importantes como estabilidade relativa em meio biológico e ativação por redução em potenciais acessíveis aos redutores

endógenos. A atividade anticâncer também é observada, apesar dos mecanismos pelos quais ela acontece ainda não terem sido completamente elucidados. Acredita-se que eles atuem dificultando a mobilidade das proteínas de transporte, mecanismo diferente do da cisplatina, que se liga ao DNA, causando um dano que não pode ser reparado, levando as células à apoptose. Devido a esta característica da atividade anticâncer, os complexos de rutênio podem ser, portanto, agentes antimetástáticos (CLARKE, 2003; LEVINA; MITRA; LAY, 2009).

Alguns exemplos clássicos de complexos de rutênio estudados devido à sua citotoxicidade e atividade anticâncer são: *Ruthenium red* (“vermelho de rutênio”), um complexo trinuclear de valência mista, conhecido por ligar-se à proteína transportadora de cálcio das células tumorais, impedindo o transporte de Ca^{2+} ; NAMI-A, o primeiro complexo de rutênio a entrar na fase de testes clínicos, cuja ativação ocorre por redução no meio biológico. Seu mecanismo de ação está relacionado à diminuição da mobilidade das proteínas do tipo da actina através da ligação a este tipo de proteínas e/ou ao colágeno da matriz extracelular, agindo contra a metástase; KP1019, um complexo mais estável frente à hidrólise e aquação do que o NAMI-A, pois traz consigo a vantagem de ter atividade contra tumores resistentes à cisplatina, porém sem atividade antimetástática conhecida; este complexo também já está em fase de testes clínicos (CLARKE, 2003; LEVINA; MITRA; LAY, 2009). A Figura 4 traz a estrutura desses compostos:

Figura 4. Estruturas dos complexos (a) *Ruthenium red*, (b) NAMI-A e (c) KP1019



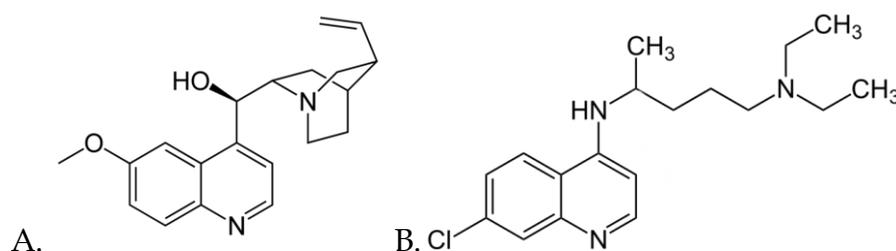
Fonte: Adaptado de (LEVINA; MITRA; LAY, 2009)

Além dos complexos já citados, podem-se destacar também os nitrosilo complexos de rutênio, nos quais a atividade como metalofármacos é relacionada à liberação do NO, cujas propriedades serão mencionadas no Capítulo 5.

3. Azanaftalenos

Os azanaftalenos são N-heterociclos que apresentam dois anéis de seis membros fundidos e um nitrogênio substituindo um dos carbonos dos anéis. Um dos azanaftalenos mais conhecidos talvez seja o quinino (Figura 5 A), que é um produto natural extraído da casca da quina, tendo a estrutura central da quinolina.

Figura 5. A. Estrutura do quinino. B. Estrutura da cloroquina



Fonte: Autora

O uso de quinino e seus derivados (Figura 5 B) no tratamento da malária é conhecido desde o começo do século 20 (CARVER, 1917). Contudo, fatos históricos

mostram que os jesuítas já sabiam do potencial do quinino para tratar malária e febre amarela na época do descobrimento das Américas (ACHAN et al., 2011). Sobre a atividade biológica dos azanaftalenos, é sabido que compostos que têm a estrutura central da quinolina podem agir contra doenças tropicais (CARVER, 1917; GOBLE, 1949; BUCKNER et al., 1996a; FOLEY, 1998; O'NEILL et al., 1998; ACHAN et al., 2011; BYLER et al., 2012). A literatura reportou, no final da década de 40, que derivados de quinolina poderiam representar um tratamento efetivo no tratamento da Doença de Chagas, combatendo a infecção causada pelo parasita *T. cruzi* (GOBLE, 1949).

4. Doença de Chagas

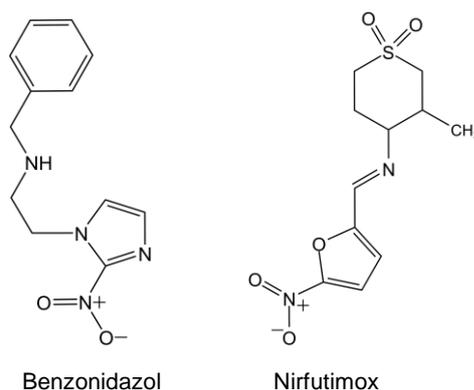
A Doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é uma doença transmitida por vetor, os insetos das famílias Hemiptera e Reduviidae, do gênero *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, que são popularmente chamados de *barbeiros*. O agente causador da doença é o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário que é encontrado no intestino do inseto que foi infectado ao alimentar-se do sangue de animais doentes. Estima-se que mais de 150 tipos de triatomíneos (vetores) e 100 tipos de mamíferos estejam contaminados na natureza. Acredita-se que os vetores dessa doença estejam transmitindo-a para os animais por quase 10 milhões de anos, uma vez que ela é uma doença enzoótica (de animais selvagens), sendo que a extensão de sua distribuição nas reservas naturais das Américas estende-se dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile, um total de 22 países. É possível que o desenvolvimento da agricultura e domesticação de animais, há 10 mil anos, tenha estimulado a infecção: o parasita foi encontrado em múmias chilenas de 9 mil anos e existem evidências da presença de vetores em habitações da era pré-colombiana. Com o desenvolvimento recente da agricultura e meios de transporte, e com desmatamento causado por isso, os vetores perderam sua fonte primária de alimentação, multiplicaram-se e a doença deixou de ser uma antropozoonose (infecção humana acidental) e passou a ser uma zoonose (COURA; VIÑAS, 2010).

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 8 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com a Doença de Chagas. Ela é endêmica na América Latina e integra o conjunto de enfermidades denominado Doenças Negligenciadas, uma vez que

ela atinge os mais pobres e a população rural. Estima-se que 25 milhões de pessoas têm risco de contrair a doença nos próximos anos, sendo que 10 mil pessoas morrem todo ano devido às complicações clínicas causadas por ela. A Doença de Chagas é dividida em duas fases: aguda, na qual a doença pode ser curável desde que diagnosticada a tempo, e crônica, quando os pacientes começam a apresentar as complicações citadas anteriormente, como problemas neurológicos, gastrointestinais e, principalmente, cardiológicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Infelizmente, a Doença de Chagas não tem um tratamento efetivo, estando limitada a duas drogas que apresentam grandes efeitos colaterais: o benzonidazol e o nirfutimox (Figura 6), que foi descontinuado primeiro no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai (GUALDESI; ORTIZ; RAVIOLO, 2015). Nenhum dos dois medicamentos é efetivo no tratamento da doença na sua fase crônica, e isso encoraja a busca por novos compostos com melhor atividade e menores efeitos colaterais.

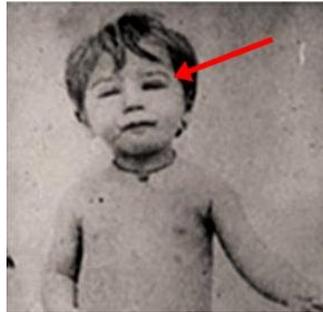
Figura 6. Dois medicamentos utilizados no tratamento da Doença de Chagas



Fonte: Autora

A Tripanossonomíase Americana foi descoberta em 1909 pelo médico sanitário brasileiro Carlos Chagas durante uma expedição a Lassance, no interior de Minas Gerais. No dia 14 de abril de 1909, ele diagnosticou o primeiro caso da Doença de Chagas em um humano (ele já havia observado em tatus e em um gato doméstico), a menina Berenice Soares de Souza (Figura 7), de dois anos. No dia 22 do mesmo mês, ele anunciou sua descoberta à Academia Brasileira de Medicina (COURA, 2013). O nome *T. cruzi* foi dado em homenagem ao também médico brasileiro Oswaldo Cruz.

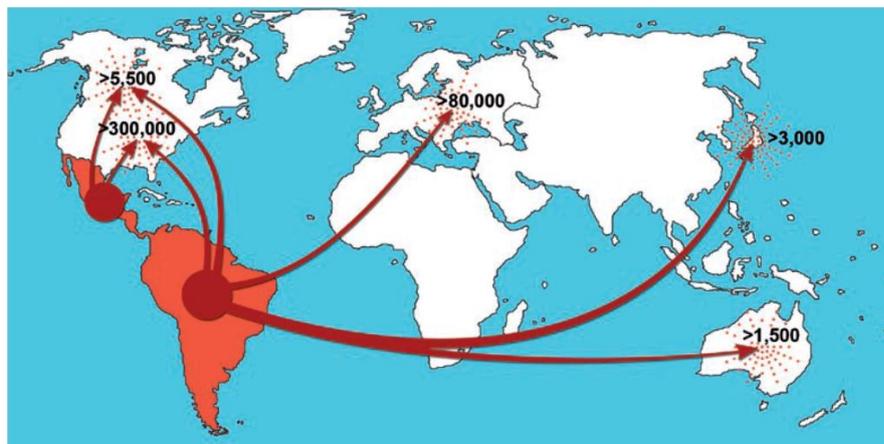
Figura 7. Foto tirada por Carlos Chagas da menina Berenice, a primeira paciente diagnosticada com a Doença de Chagas. A seta vermelha indica o sintoma mais comum na fase aguda da doença: o sinal de Romaña, um inchaço nas pálpebras de um olho



Fonte: Adaptado de (COURA, 2013)

O *T. cruzi* espalhou-se para países não-endêmicos durante movimentos migratórios oriundos da América Latina, e devido às transfusões de sangue e doações de órgãos que não passaram por análise, a Doença de Chagas também é encontrada nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Japão e Austrália, como o mostra o mapa da imigração latina apresentado pela Figura 8:

Figura 8. Mapa dos movimentos populacionais latinos relacionando o número de casos à presença de imigrantes



Fonte: (COURA; VIÑAS, 2010)

Com relação ao estudo de complexos inorgânicos como candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Chagas, pesquisadores como Gambino (OTERO et al., 2006, 2007; URQUIOLA et al., 2006; BENÍTEZ et al., 2009a, 2009b; NAVARRO et al., 2010), Franco (SILVA et al., 2007, 2009), Navarro (NAVARRO, 2009), e Silva (SESTI-COSTA et al., 2014), entre outros, buscaram novos complexos de metais de transição que tivessem a atividade tripanocida aumentada, i.e., que tivessem a capacidade de lutar contra a

infecção causada pelo *T. cruzi* de uma maneira mais eficiente que os fármacos citados anteriormente.

5. Câncer

As primeiras evidências de câncer em humanos foram encontradas nos ossos de múmias egípcias. De fato, a descrição mais antiga de câncer foi feita no Egito, aproximadamente em 3000 A.C. num conjunto de pergaminhos que compunham um livro de cirurgia, onde o autor descreveu oito casos de úlceras no peito, removidas cirurgicamente, mas “sem tratamento”. Na verdade, a palavra câncer é derivada de *Karkinos*, do grego, nomeado por Hipócrates, e *Cancer*, do latim, nomeada por Celsius, ambas com o mesmo significado: caranguejo, que está ligada à forma com que as células se espalham (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

O câncer se desenvolve quando células normais de uma parte do corpo começam a crescer descontroladamente. Segundo o INCA, Instituto Nacional do Câncer, “*câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo*” (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a segunda doença que mais mata no mundo, perdendo apenas para doenças cardiovasculares, e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. Uma em cada seis mortes são devidas ao câncer e estima-se que o número de novos casos cresça 70% nas próximas duas décadas. Além de tudo isso, o impacto econômico causado pelo câncer é enorme: US\$ 1,16 trilhões em 2010 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A estimativa para o número de novos casos de câncer no Brasil, para o biênio 2016-2017, é de 600 mil, sendo que o câncer de pele do tipo não-melanoma lidera a lista com 180 mil casos, seguido por próstata, 61 mil casos e mama, 58 mil casos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Ao redor do mundo, os tipos de cânceres que apresentam maiores índices de mortalidade são câncer de pulmão, de fígado, colorretal, de estômago e mama, sendo que de 30 a 60% dos casos poderiam ser prevenidos, evitando-se os fatores de risco (tabagismo, alcoolismo, obesidade, maus hábitos alimentares, entre outros) e tendo o

diagnóstico precoce (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

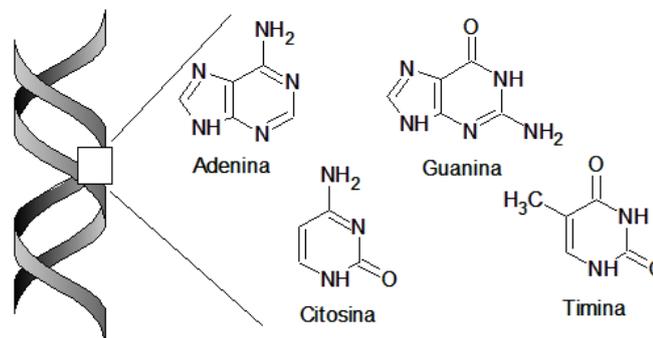
Os tratamentos para essa doença incluem quimioterapia, radioterapia e/ou remoção cirúrgica e, apesar de haver grandes chances de cura quando diagnosticada precocemente, os números apresentados acima demonstram que ainda existe muito o que ser feito sobre esse assunto (SUDHAKAR, 2010).

6. Interação com Biomoléculas

a) DNA

A molécula de DNA é composta por nucleotídeos, os quais são constituídos de um grupo fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada, que podem ser: Adenina (A), a Guanina (G), a Timina (T) e a Citosina (C) (Figura 9). Estas bases se ligam por meio de ligações de hidrogênio, de maneira complementar (A-T, C=G), dando origem à dupla fita do DNA (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

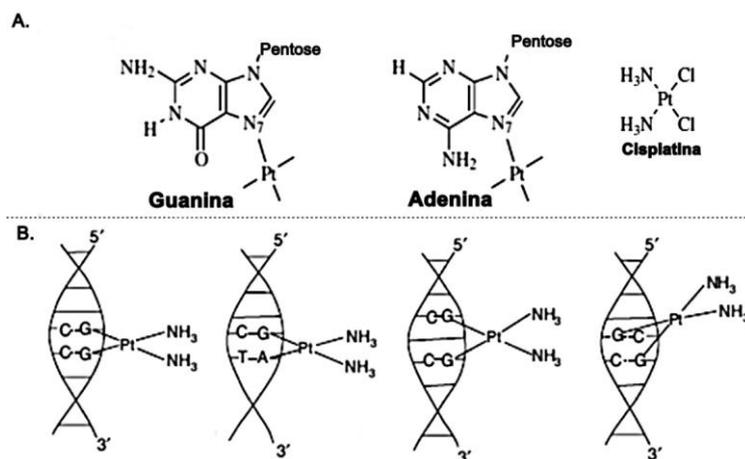
Figura 9. Bases nitrogenadas presentes no DNA



Fonte: Autora

Os estudos da interação dos compostos com o DNA podem elucidar se ele é o alvo e, em caso afirmativo, que tipo de interação ocorre. Existem dois tipos de interação: covalentes e não covalentes. Um exemplo clássico de composto que interage covalentemente ao DNA é o da cisplatina. Após perder os ligantes cloreto, a cisplatina liga-se às bases guanina e/ou adenina (Figura 10), impedindo mecanismos de reparo e replicação do DNA (PIZARRO; SADLER, 2009; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

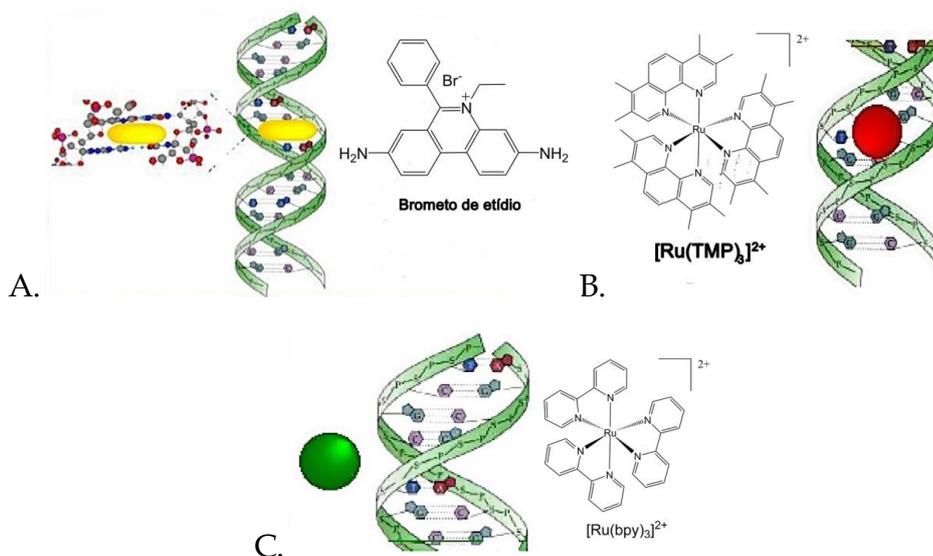
Figura 10. A. Esquema representando a cisplatina ligando-se covalentemente ao N₇ da Guanina e Adenina. B. Modos de ligação da cisplatina no DNA



Fonte: Adaptado de (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013)

As interações não-covalentes podem, por sua vez, serem divididas em três tipos: intercalação, *groove binding* (ligação aos sulcos) e ligação externa (Figura 11). Tais interações predominantemente mantidas por forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e eletrostáticas, e, justamente por apresentarem uma característica reversível, podem ser preferenciais com relação às interações covalentes, porque existe a possibilidade do composto em questão ser metabolizado mais facilmente, minimizando efeitos colaterais indesejados, por exemplo (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Figura 11. Tipos de interação não-covalente e exemplos de compostos que se ligam ao DNA por meio delas. A. Intercalação B. *Groove Binding* C. Ligação externa



Fonte: Adaptado de (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013)

Muitas vezes, não interagir com DNA não é de todo ruim, porque os compostos podem agir em linhagens resistentes à cisplatina, por exemplo. Como já citado anteriormente, os complexos NAMI-A e KP1019 têm sua eficácia ligada à diminuição da mobilidade das proteínas de transporte (LEVINA; MITRA; LAY, 2009) e a ação antimetastática está relacionada justamente a isso.

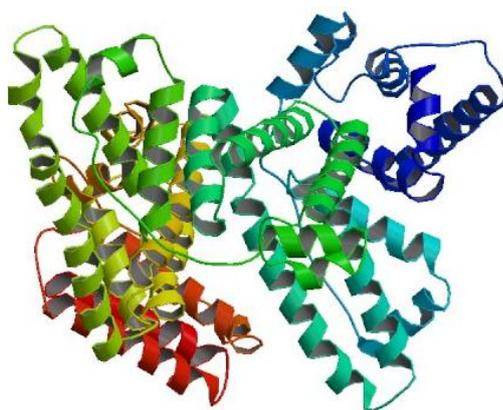
b) *Albumina de Soro Humano*

A palavra albumina é derivada de *Albumen*, do alemão, com sentido geral de proteínas, mas *albumen* tem origem no latim (*albus*=branco), e tem relação com a coloração da clara do ovo cozido. A proteína da clara do ovo faz parte da grande família das albuminas, que incluem a albumina do leite e a albumina de soro, como a Albumina de Soro Bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) e a Albumina de Soro Humano (HSA, *Human Serum Albumin*) (FANALI et al., 2012), sendo que a BSA apresenta 80% de similaridade com a HSA (MOREIRA et al., 2014).

A HSA é a proteína mais abundante do plasma, a principal determinante da pressão oncótica plasmática (pressão osmótica gerada pelas proteínas), bem como a principal moduladora da distribuição de fluidos no corpo. Além disso, ela tem uma capacidade de realizar ligações que a torna a principal carreadora de ácidos graxos, afeta a distribuição das drogas nos tecidos (FANALI et al., 2012), o que torna o estudo da interação de qualquer candidato a fármaco com HSA imprescindível.

A HSA contém um único resíduo de triptofano (Trp, posição 214), enquanto que os aminoácidos cisteína, leucina, glutamina e lisina são abundantes. Na verdade, cada molécula de HSA contém 35 resíduos de cisteína, que formam 17 pontes dissulfeto, e contribuem para a estabilidade dessa proteína. Ainda com relação às características estruturais, a HSA tem uma conformação globular em forma de coração, e a estrutura secundária dessa proteína é majoritariamente composta por α -hélices (68%), e nenhuma folha- β (Figura 12) (FANALI et al., 2012).

Figura 12. Estrutura da HSA, obtida por difração de raios-X



Fonte: *Protein Data Base (PDB)* (SUGIO et al., 1999)

O fato de a HSA conter um resíduo de triptofano confere a ela propriedades fluorescentes, o que torna a espectroscopia de fluorescência uma alternativa válida para a avaliação da interação dos compostos com a proteína, e o detalhamento experimental está contido no item “*Interação com albumina de soro humano (HSA)*” do capítulo 4.

No início da década de 80, a literatura reportou a relação dos parâmetros termodinâmicos com os diferentes tipos de interação com proteínas (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981), e, como dito anteriormente, ter essas informações para os candidatos a fármacos é de extrema importância, uma vez que a HSA vai ditar a distribuição desses compostos no corpo, podendo alterar eficácia, bem como metabolismo.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar formas de obtenção de uma nova classe de complexos trinucleares simétricos de rutênio e avaliar a atividade biológica desses compostos.

Para atingir o objetivo principal os seguintes objetivos específicos foram delineados:

→ Síntizar e purificar novos complexos trinucleares de rutênio simétricos com ligantes azanaftalenos, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$, sendo L quinazolina (Complexo 1), 5-nitroisoquinolina (Complexo 2), 5-bromoisoquinolina (Complexo 3), isoquinolina (Complexo 4), 5-aminoisoquinolina (Complexo 5) e 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (Complexo 6) a fim de estudar o comportamento em série;

→ Caracterizar os novos complexos por meio de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho, Espectroscopia de Absorção na região do UV-visível, Voltametria Cíclica e Espectroeletrólise;

→ Estudar a correlação das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas com a natureza do ligante periférico;

→ Proceder à estruturação por meio de Difração de Raios-X em monocristal, Espectrometria de Massas e Análise Elementar;

→ Avaliar a atividade biológica da nova classe de complexos frente à linhagem B16F10 (melanoma murino), ao parasita *Trypanosoma cruzi* nas formas tripomastigota e amastigota e à fase aguda da Doença de Chagas através de estudos *in vivo*;

→ Estudar a interação com biomoléculas alvo (DNA de esperma de peixe e Albumina de Soro Humano);

→ Obter um novo precursor para a síntese de nitrosilo complexos trinucleares de rutênio.

CAPÍTULO 2

PROPRIEDADES QUÍMICAS, ELETROQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS

1. Materiais e Métodos

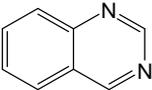
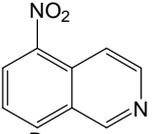
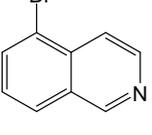
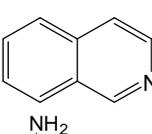
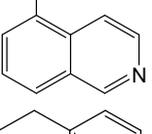
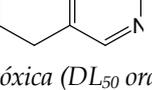
1. Reagentes

A seguir, serão apresentados os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Apesar de a maior parte deles ter um grau elevado de pureza, houve a necessidade de purificação de alguns, e o procedimento empregado está detalhado nesta seção.

a) Listagem dos reagentes

A Tabela 1 traz a lista dos ligantes empregados, bem como suas propriedades químicas, procedência, pureza e pesquisa do grau de periculosidade, quando existir. Todos os ligantes foram utilizados sem purificação prévia.

Tabela 1. Lista dos ligantes utilizados na síntese dos complexos trinucleares simétricos

Nome	Estrutura	Massa molar	Procedência	Pureza	Propriedades
Quinazolina C ₈ H ₆ N ₂		130,15 g mol ⁻¹	Aldrich	99%	PF=46-48 °C PE= 243 °C FP= 107 °C
5-nitroisoquinolina C ₉ H ₆ N ₂ O ₂		174,16 g mol ⁻¹	Aldrich	98%	PF=106-109°C
5-bromoisquinolina C ₉ H ₆ NBr		208,05 g mol ⁻¹	Aldrich	98%	PF=83-87 °C
Isoquinolina* C ₉ H ₇ N		129,16 g mol ⁻¹	Acros	97%	ρ=1,09 g cm ⁻³ PF=26-28 °C PE=242-243 °C FP=107 °C
5-aminoisoquinolina C ₉ H ₈ N ₂		144,17 g mol ⁻¹	Aldrich	99%	PF=125-127 °C
5,6,7,8-tetraidroisoquinolina C ₉ H ₁₁ N		133,19 g mol ⁻¹	Aldrich	95%	PE=106-108 °C FP= 100 °C ρ=1,03 g cm ⁻³

*A isoquinolina é considerada tóxica (DL₅₀ oral = 650 mg/kg ratazana; DL₅₀ dérmico = 180 mg/kg ratazana), devido a isso, sua manipulação foi feita seguindo as instruções de segurança e de uso de EPIs.

Fonte: Autora

A Tabela 2 traz a lista dos demais reagentes empregados durante o desenvolvimento do trabalho.

Tabela 2. Reagentes utilizados durante a execução do projeto de pesquisa

Nome, fórmula, pureza	Procedência
Acetato de sódio hidratado, $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	ECIBRA
Acetona, CH_3COCH_3 , P.A.	Neon
Acetona- d_6 , CD_3COCD_3 , 99,9%D	Aldrich
Acetonitrila, CH_3CN , ACN, grau espectroscópico	J.T.Baker
Acetonitrila- d_3 , CD_3CN , 99,8%D	Aldrich
Ácido acético glacial, CH_3COOH , P.A.	Sigma Aldrich
Ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$, P.A.	Panreac
Ácido clorídrico, 37% HCl , P.A.	Panreac
Alumina, Al_2O_3 , 150 mesh, 58 Å	Aldrich
Benzonitrila, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}$, 99%+	Aldrich
Brometo de potássio, KBr , grau espectroscópico	Aldrich
Cloreto de rutênio (III), $\text{RuCl}_3\cdot x\text{H}_2\text{O}$, 38-42% Ru	Aldrich
Clorofórmio- d , CDCl_3 , 99,8%	Aldrich
Diclorometano, Cl_2CH_2 , DCM, grau espectroscópico	Merck
Etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, EtOH, P.A.	Synth
Éter etílico, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, grau técnico	Chemco
Fosfato de sódio monobásico, NaH_2PO_4 , P.A.	Merck
Hexafluorofosfato de amônio, NH_4PF_6 , $\geq 95\%$	Sigma Aldrich
Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio, TBAPF_6	Aldrich
Metanol, CH_3OH , MeOH, grau espectroscópico	Vetec
Peneira molecular	Aldrich
Pentóxido de fósforo, P_5O_{10} , 97%	Aldrich
Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , 60%	Synth
Tetrafluoroborato de tetrabutilamônio, TBABF_4	Aldrich
Tris base, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, $\geq 99\%$	Merck

Fonte: Autora

b) Purificação

A purificação fez-se necessária no caso do éter etílico e da benzonitrila. Em ambos, o procedimento foi feito de acordo com o descrito na literatura (ARMAREGO; CHAI, 2009).

No caso do éter etílico, este foi deixado em refluxo na presença de hidróxido de sódio até que se observasse uma coloração alaranjada intensa no meio, quando iniciou-se a destilação. Ao destilado, adicionou-se sódio metálico, que foi mantido até que a produção de gás (H_2) cessasse.

A benzonitrila apresenta um ponto de ebulição de 191 °C, e, portanto, deve ser tratada utilizando-se um sistema de destilação a vácuo. Ao solvente em questão, adicionou-se pentóxido de fósforo e o sistema foi mantido em refluxo até que a coloração amarela intensa fosse atingida. Após a mudança da cor do meio, iniciou-se a destilação. Ao destilado, foram adicionadas peneiras moleculares previamente ativadas na mufla (600 °C, durante 2 horas).

2. Cálculo do pK_a dos ligantes

O pK_a dos ligantes 1-3, 5 e 6 foi calculado através do método espectrofotométrico, de acordo com o descrito na literatura (CUNHA, 1989; ZIELI; KUDELKO, 2005; PEREIRA et al., 2011). A faixa de pHs utilizada foi de 2,29-7,34 (Tampão Ácido Cítrico - Na_2HPO_4 ("Buffer Reference Center | Sigma-Aldrich")) e de 7,41-8,89 (Tampão Tris·HCl, $NH_2C(CH_2OH)_3$, faixa obtida pela titulação com ácido clorídrico). Para todos os compostos, utilizou-se 1 % de metanol como co-solvente devido aos problemas de solubilidade em meio aquoso apresentados pelos azanaftalenos (ZIELI; KUDELKO, 2005). As alterações espectrais foram monitoradas em um espectrofotômetro modelo HP8453, AGILENT, em comprimentos de onda máximo específicos para cada composto (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimentos de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) utilizados para cálculo do pK_a de cada ligante

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$
Quinazolina	264 nm
5-nitroisoquinolina	337 nm
5-bromoisoquinolina	343 nm
5-aminoisoquinolina	334 nm
5,6,7,8-tetraidroisoquinolina	260 nm

Fonte: Autora

Após observar a variação espectral nos comprimentos de onda supracitados, fez-se um gráfico de pH *versus* absorvância, e o valor de pK_a pôde ser determinado através do pI (ponto isoelétrico), pelo valor máximo da inflexão no gráfico da primeira derivada ou no ponto onde $y=0$ na segunda derivada. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 1), isso é possível pois

Equação 1

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

No ponto isoelétrico, $[A^-] = [HA]$, e, portanto, $\log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) = 0$, e $pH = pK_a$ (PEREIRA et al., 2011).

3. Sínteses

As sínteses descritas neste item foram realizadas de acordo com o descrito na literatura (BAUMANN et al., 1978), inserindo modificações ao método quando necessário.

a) $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$ – “Cluster mãe”

Em um balão de 500 mL, reagiu-se 4,95 g ($2,39 \times 10^{-3}$ mol) de cloreto de rutênio(III) com 10 g ($7,3 \times 10^{-3}$ mol) de acetato de sódio hidratado e 125 mL de ácido acético glacial, previamente dissolvidos em 125 mL de etanol. O sistema foi mantido sob refluxo durante 4 horas a, aproximadamente, 80 °C. A solução resultante foi mantida em repouso sob refrigeração durante 24 horas. Essa medida foi tomada para que o excesso de acetato de sódio precipitasse e decantasse, e, desta forma, sobrenadante e precipitado

pudessem ser separados. Após este procedimento, o volume do filtrado foi reduzido com o auxílio de um evaporador rotativo, até que se observasse a formação de um óleo, que foi dissolvido novamente em 100 mL de metanol e rotoevaporado. Este processo foi realizado três vezes. Após o término da terceira “lavagem”, adicionou-se 200 mL de acetona ao óleo resultante da rotoevaporação, e logo foi possível observar a formação de precipitado.

O sólido verde escuro foi isolado por filtração a vácuo e lavado com éter etílico. O composto foi transferido para um dessecador contendo sílica gel, e seco até massa constante.

Obteve-se 5,4 g (MM= 824,7g), um rendimento de 82%. Embora o rendimento seja considerado bom, a contaminação pelo excesso de acetato de sódio ainda presente não permite que saibamos qual foi o rendimento real.

b) Complexo 1 - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]PF_6$

Em um balão, misturou-se uma solução de 1,07 g ($1,3 \times 10^{-3}$ mol) de $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$ em 25 mL de metanol, e 0,95 g ($7,3 \times 10^{-3}$ mol) de quinazolina dissolvidos em 25 mL de metanol. A solução resultante foi agitada durante 24 horas e, após este período, foi possível observar a formação de precipitado roxo. O precipitado foi recolhido por filtração e lavado com metanol gelado. A massa obtida após secagem em dessecador com sílica gel foi 0,70 g e o rendimento, considerando que a espécie isolada está na forma reduzida, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^0$ (MM=1063,91 g mol⁻¹), foi de 51%.

Para a obtenção do complexo na forma oxidada, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^{1+}$, dissolveu-se o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(qui)_3]^0$ em acetonitrila, adicionou-se 3 gotas de peróxido de hidrogênio, e, imediatamente após a adição, o meio passou de roxo escuro para verde e, então, adicionou-se hexafluorofostado de amônio. O precipitado foi separado por filtração e purificado utilizando cromatografia em coluna (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), tendo alumina neutra como fase estacionária e acetonitrila como fase móvel (MM=1208,90 g mol⁻¹; massa obtida após a purificação: 0,30 g; 19% de rendimento).

c) *Complexo 2* - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-nitro)_3]PF_6$

Em um balão, misturou-se uma solução de 0,49 g ($5,9 \times 10^{-4}$ mol) de $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$ em 10 mL de metanol, e uma solução de 0,57 g ($3,3 \times 10^{-3}$ mol) de 5-nitroisoquinolina em 25 mL de metanol. O meio reacional foi agitado, sem aquecimento, durante 24 horas e, após este período, foi possível observar a formação de precipitado verde escuro. O precipitado foi separado por filtração e lavado com etanol gelado, depois dissolvido em acetonitrila, solução à qual adicionou-se hexafluorofostado de amônio.

Assim como o complexo 1, o complexo 2 também apresentou uma mistura de $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-nitro)_3]^+$ e $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-nitro)_3]^0$, fato detectado através de espectroscopia de absorção na região UV-vis-NIR, devido à coloração amarela apresentada pela forma reduzida. Mas, diferente do caso anterior, o composto reduzido foi separado diretamente do precipitado, obtido pela adição de NH_4PF_6 , por cromatografia em coluna (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), utilizando-se alumina neutra como fase estacionária e acetonitrila como fase móvel ($MM=1340,91$ g mol⁻¹; massa obtida após a purificação: 0,23 g; 30% de rendimento).

d) *Complexo 3* - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-briq)_3]PF_6$

Em um balão, misturou-se 0,48 g ($5,7 \times 10^{-4}$ mol) de $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3]CH_3COO$ a uma solução de 0,45 g ($2,2 \times 10^{-3}$ mol) do ligante 5-bromoisoquinolina dissolvidos em 30 mL de metanol. A solução resultante foi agitada durante 72 horas (sem aquecimento). Após este período, observou-se a formação de um precipitado com coloração roxa, que, assim como no caso do complexo 1, tratava-se de uma mistura dos complexos oxidado e reduzido, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-briq)_3](CH_3COO)$ (azul) e $[Ru_3O(CH_3COO)_6(5-briq)_3]^0$ (vermelho). Este precipitado foi recolhido por filtração, e a massa obtida foi 0,31 g, um rendimento de 42%, considerando-se o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(C_9H_6BrN)_3]^0$ como produto. O precipitado foi dissolvida numa mistura 4:1 DCM:MeOH, adicionaram-se 2 gotas de H_2O_2 . O sólido azul foi obtido pela adição de excesso de NH_4PF_6 , separado por filtração e, em seguida purificado através de cromatografia em coluna (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), tendo alumina neutra como fase estacionária e a fase móvel composta por uma mistura 9:1 DCM:ACN.

Nessas condições de fase móvel e fase estacionária, separam-se também os dois estados de oxidação do complexo (MM=1442,60 g mol⁻¹; massa obtida após a purificação: 0,17 g; 20% de rendimento para [Ru₃O(CH₃COO)₆(5-briq)₃]PF₆).

e) Complexo 4 - [Ru₃O(CH₃COO)₆(iq)₃]PF₆

Em um balão, misturou-se uma solução de 0,50 g (6,0x10⁻⁴ mol) de [Ru₃O(CH₃COO)₆(CH₃OH)₃]CH₃COO em 25 mL de metanol, e 0,43 mL (3,6x10⁻³ mol) de isoquinolina. A solução resultante foi agitada, sem aquecimento, durante 72 horas. Ao final da reação, hexafluorofosfato de amônio, NH₄PF₆, foi adicionado ao meio reacional. A solução foi mantida em temperatura ambiente até que se observasse a formação de precipitado (1 semana). O sólido foi separado por filtração e purificado utilizando-se cromatografia em coluna (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), tendo alumina neutra como fase estacionária e acetonitrila como fase móvel (MM=1208,01 g mol⁻¹; massa obtida após a purificação: 0,22 g; 30% de rendimento).

f) Complexo 5 - [Ru₃O(CH₃COO)₆(5-amiq)₃]PF₆

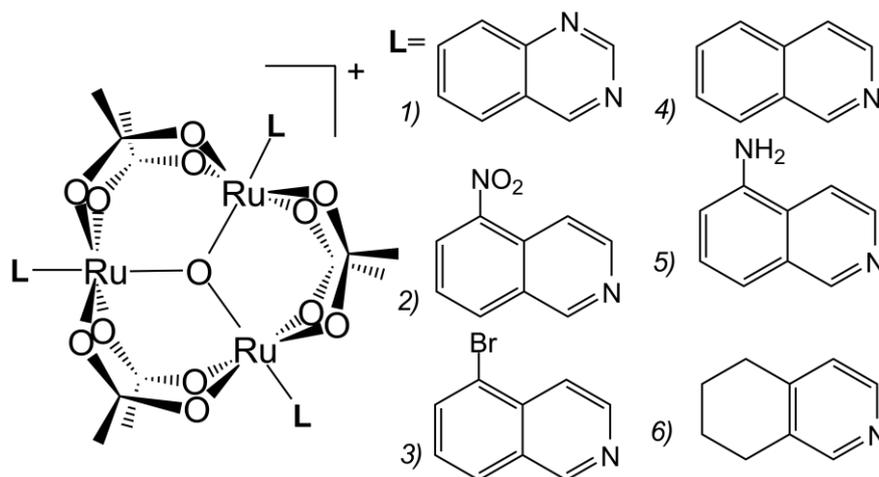
Em um balão, misturou-se uma solução de 0,50 g (6,0x10⁻⁴ mol) de [Ru₃O(CH₃COO)₆(CH₃OH)₃]CH₃COO em 10 mL de metanol, e uma solução de 0,25 g (1,7x10⁻³ mol) de 5-aminoisoquinolina em 25 mL de metanol. A solução foi mantida sob agitação durante 72 horas e, após este período, adicionou-se hexafluorofosfato de amônio à reação. Não havendo a formação de precipitado, o solvente foi retirado utilizando-se um evaporador rotativo e o extrato seco foi purificado através de cromatografia em coluna (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), sendo a fase estacionária alumina neutra e a fase móvel uma mistura composta de 9:1 ACN:DCM. Utilizando-se esta fase móvel, o excesso de ligante fica retido no topo da coluna (MM=1250,96 g mol⁻¹; massa obtida após a purificação: 0,23 g; 31% de rendimento).

g) Complexo 6 - [Ru₃O(CH₃COO)₆(thiq)₃]PF₆

Em um balão, dissolveu-se 0,50 g (6,0x10⁻⁴ mol) de [Ru₃O(CH₃COO)₆(CH₃OH)₃]CH₃COO em uma solução de 0,39 mL (3,0x10⁻³ mol) do ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina em 25 mL de metanol. A solução resultante foi agitada, sem aquecimento, durante 72 horas. Mesmo após a adição de excesso de NH₄PF₆ e resfriamento, não se observou a formação de precipitado. Então o solvente foi

retirado, e o extrato seco foi lavado sucessivas vezes com água gelada, a fim de retirar o excedente de NH_4PF_6 e de ligante livre. A purificação deste complexo foi feita através de cromatografia em coluna (10 cm de altura x 2 cm de diâmetro), tendo alumina neutra como fase estacionária e a fase móvel composta por uma mistura 9:1 ACN:DCM (MM=1218,01 g mol⁻¹; massa obtida após a purificação: 0,22 g; 29% de rendimento).

Figura 13. Estrutura proposta para os complexos apresentados nesta tese



Fonte: Autora

4. Instrumentação

a) Difração de Raios-X em monocristal (DRX)

As medidas de DRX foram realizadas pelo Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon (IQSC-USP) num difratômetro Bruker Kappa Apex II Duo a 296 K, usando radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$) monocromada de grafite. A correção de absorção *multi-scan* foi aplicada. A solução e refinamento da estrutura do complexo 1 foram feitos utilizando o programa SHELX (SHELDRICK, 2008). As posições dos átomos de hidrogênio foram calculadas empregando a opção *riding mode* do programa supracitado, e todos os outros átomos foram refinados com parâmetros de temperatura anisotrópicos.

b) Espectrometria de massas

Ionização por *spray eletrolítico* (ESI)

As análises ESI-Q-TOF-MS/MS foram realizadas sob as mesmas condições para todos os complexos utilizando o equipamento microTOF QII da Bruker, a partir de uma alíquota de 50 μL de uma solução dos complexos em acetato de etila, que foi, então,

diluída em uma mistura 80%:20% MeOH:H₂O. O modo de detecção foi positivo para todos os compostos.

Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI)

Nas análises MALDI-Q-TOF-MS/MS, faz-se uma cocristalização dos compostos com uma matriz, que, geralmente, trata-se de ácidos carboxílicos. Para o caso de todos os complexos presentes neste trabalho, a cristalização foi feita utilizando ácido 2,5-diidroxibenzóico (DHB) como matriz, e os experimentos foram realizados no equipamento MALDI-TOF UltrafleXtreme da Bruker.

c) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização estrutural dos complexos trinucleares de rutênio simétricos, propostos no projeto de pesquisa, foi feita através de medidas de ¹H-RMN. Os espectros de ¹H-RMN e COSY foram gerados no espectrômetro Bruker DRX-500 de 500 MHz, adquiridos em acetonitrila-d₃ em soluções 10 mM.

d) Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais dos compostos foram feitos no espectrofotômetro modelo IR Prestige 21 da SHIMADZU, em pastilhas de KBr, numa faixa de 4000-400 cm⁻¹. Para o complexo 1, utilizou-se também um acessório para ATR (Reflectância Total Atenuada), composto pelo porta-amostras PIKE Technologies MIRacle ATR, com cristal de germânio (índice de refração: 4,0; *cutoff* 576 cm⁻¹).

e) Espectroscopia de absorção na região UV-vis-NIR

Os espectros de absorção na região UV-vis-NIR, para o cálculo do coeficiente de absortividade molar (ϵ), foram adquiridos no Espectrofotômetro UV-visível-NIR - modelo HP8453, AGILENT, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm.

f) Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos dos complexos foram gerados em um potenciostato/galvanostato de EG & G Applied Research Princeton, modelo 273, utilizando-se eletrodos de platina (trabalho e auxiliar) e Ag/AgCl como eletrodo de

referência, em uma solução 0,1 M do eletrólito suporte tetrafluoroborato de tetrabutylamônio, TBA(BF₄), em benzonitrila.

g) *Espectroeletróquímica*

Os estudos de espectroeletróquímica foram realizados utilizando uma célula cedida pelo Prof. Koiti Araki (IQ-USP), que consiste em uma cubeta de quartzo com caminho óptico, originalmente, de 1,00 cm, um eletrodo de trabalho de ouro (*mini grid*) com dimensões 2,0x0,9 cm e espessura menor que 0,2 mm, e um cubo de quartzo polido, cuja função foi limitar o caminho óptico real a 0,2 mm, e, assim, a solução ficou em contato com o *grid*, evitando, processos relacionados à difusão. O eletrodo auxiliar utilizado foi de platina e o eletrodo de referência Ag/AgCl, ambos devidamente dimensionados para a miniaturização do sistema supracitado.

Para os complexos 4 e 5, foi possível a realização do experimento em acetonitrila (0,1 M de TBAPF₆), o que permitiu o monitoramento das bandas em uma região de 200-1000 nm. Para os complexos 1-3 e 6, a única opção foi a utilização, assim como nos estudos eletroquímicos, de benzonitrila (0,1 M TBABF₄), o que restringiu a janela de trabalho para 300-1000 nm, uma vez que a região de *cut-off* deste solvente é em torno de 290 nm.

Os espectros de absorção foram registrados no espectrofotômetro Prestige 21 da marca SHIMADZU e os processos eletroquímicos foram gerados no potenciostato/galvanostato marca AUTOLAB® modelo PGSTAT30.

h) *Análise elementar*

A análise elementar (CHN) dos complexos foi feita em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida, da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os dados obtidos foram gerados utilizando o Analisador Elementar da Leco, modelo TruSpec CHNS-O, tendo cistina e EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) como padrões internos de calibração do equipamento.

2. Resultados e discussão

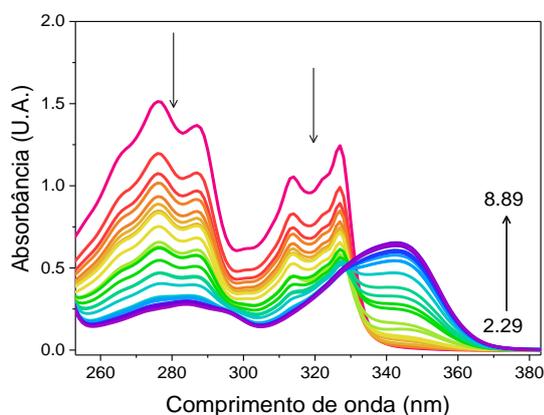
1. Cálculo do pK_a dos ligantes

O pK_a dos ligantes é utilizado como uma medida indireta da capacidade que estes têm de *receber mais* ou *doar mais* densidade eletrônica em um complexo metálico. Com base nos valores de pK_a , os ligantes são, comumente, divididos entre predominantemente π -receptores e predominantemente σ -doadores, o que, no caso dos ligantes piridínicos e azanaftalenos em complexos trinucleares de rutênio, é apenas uma generalização, já que a coordenação destes ligantes acontece na direção σ e todos eles têm orbitais π vazios com simetria e energia adequada para receber densidade eletrônica da unidade $[Ru_3O]^n$ (retrodoação) (MOREIRA et al., 2016). A correlação das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas com o pK_a dos ligantes terminais é um dado viável, importante e que diz muito sobre o efeito de deslocalização/localização eletrônica no complexo, tipos de interação orbital existentes, preferência de alguns estados de oxidação em detrimento de outros etc.

O pK_a dos ligantes azanaftalenos foi calculado pelo método espectrofotométrico, uma vez que as dificuldades de solubilidade e necessidade do uso de metanol como co-solvente tornaram o método potenciométrico inviável.

Escolheu-se os dados obtidos para o ligante 5-bromoisoquinolina como representativos do experimento realizado para todos os ligantes da série. Primeiramente, registrou-se a mudança espectral do composto nos diferentes pHs (Figura 14).

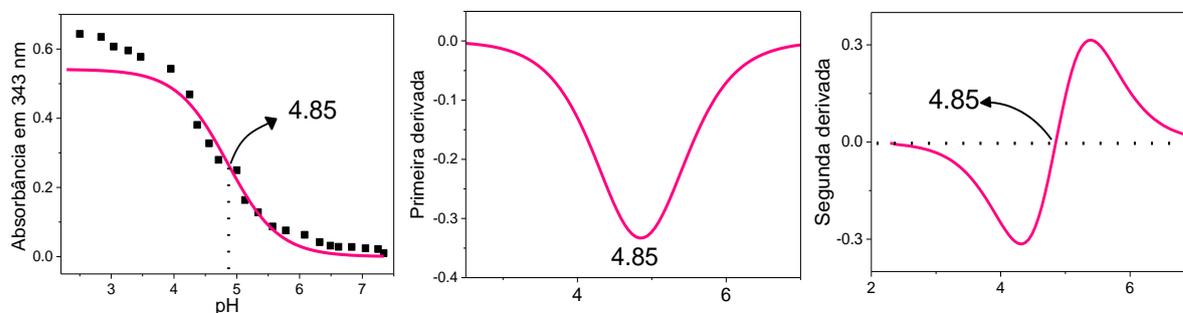
Figura 14. Variação espectral, causada pela protonação da 5-bromoisoquinolina, observada na faixa de pH 2,29 a 8,89



Fonte: Autora

Após verificar em qual região acontece a variação espectral, fez-se o gráfico de absorvância no comprimento de onda da variação *versus* pH. Em seguida, fez-se derivadas de primeira e segunda ordens, e o valor de pK_a foi extraído destes gráficos (Figura 15).

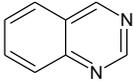
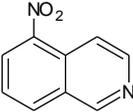
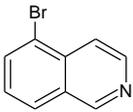
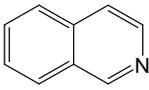
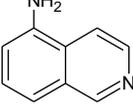
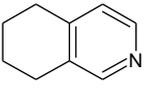
Figura 15. Da esquerda para a direita: a. curva da titulação espectrofotométrica do ligante 5-bromoisoquinolina; b. primeira derivada de (a); c. segunda derivada de (a)



Fonte: Autora

O mesmo procedimento foi feito para todos os compostos, exceto a isoquinolina, cujo pK_a é bastante conhecido (GOELTZ; BENSON; KUBIAK, 2010) e próximo ao da piridina. A Tabela 4 sumariza os resultados encontrados:

Tabela 4. Valores de pK_a referentes a cada ligante

Ligante		pK _a
Quinazolina		3,66
5-nitroisoquinolina		3,87
5-bromoisquinolina		4,85
Isoquinolina		5,17*
5-aminoisoquinolina		6,15
5,6,7,8-tetraidroisoquinolina		7,00

*Valor retirado de (GOELTZ; BENSON; KUBIAK, 2010)

Fonte: Autora

Para os complexos trinucleares com ligantes piridínicos, considera-se que ligantes que apresentam valores menores que 5,1 (pK_a da piridina) têm característica predominantemente mais π-receptora e aqueles com valores superiores a 5,1 têm característica predominantemente mais σ-doadora. O mesmo pode ser aplicado para o caso dos azanaftalenos uma vez que o pK_a da isoquinolina é 5,17. Desta forma, considera-se que quinazolina, 5-nitroisoquinolina e 5-bromoisquinolina são os ligantes com característica mais π-receptora, enquanto que isoquinolina, 5-aminoisoquinolina e 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina têm características mais σ-doadoras, como representado na

Figura 16:

Figura 16. Esquema representando a classificação dos ligantes utilizados



Fonte: Autora

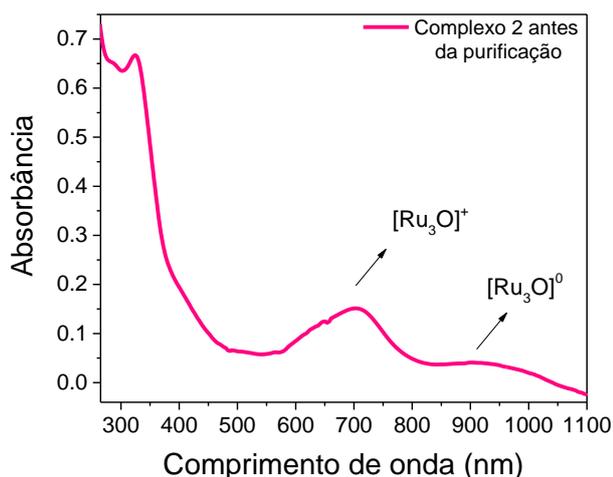
A discussão sobre influência do pK_a dos ligantes nas propriedades espectroscópicas e eletroquímicas será feita em termos de π -aceitação e σ -doação dos mesmos.

2. Sínteses

As sínteses apresentadas neste trabalho sofreram algumas modificações quando comparadas ao proposto por Baumann e colaboradores (BAUMANN et al., 1978). A principal mudança foi com relação ao aquecimento, presente anteriormente, e que deixou de ser utilizado para a nova série de complexos simétricos com ligantes azanaftalenos. Essa opção foi feita com base nos pontos de fusão e, no caso da quinazolina, isoquinolina e thiq, no ponto de fulgor (*vide* Tabela 1). Para evitar decomposição dos ligantes, o sistema foi mantido sob agitação sem aumento da temperatura, e, como consequência, o tempo de reação foi maior.

Além disso, para o caso dos complexos com ligantes mais π -receptores (1,2 e 3), observou-se, ao final da síntese, a coexistência entre dois estados de oxidação: $[Ru_3O]^0$ e $[Ru_3O]^+$ (Figura 17), e essa tendência de compostos com ligantes mais π -receptores serem isolados como $[Ru_3O]^0$ já foi relatada anteriormente na literatura (GOELTZ; BENSON; KUBIAK, 2010). Portanto, fez-se necessário o uso peróxido de hidrogênio para que todos os complexos fossem isolados na forma $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_3]PF_6$.

Figura 17. Espectro de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 2 antes da purificação

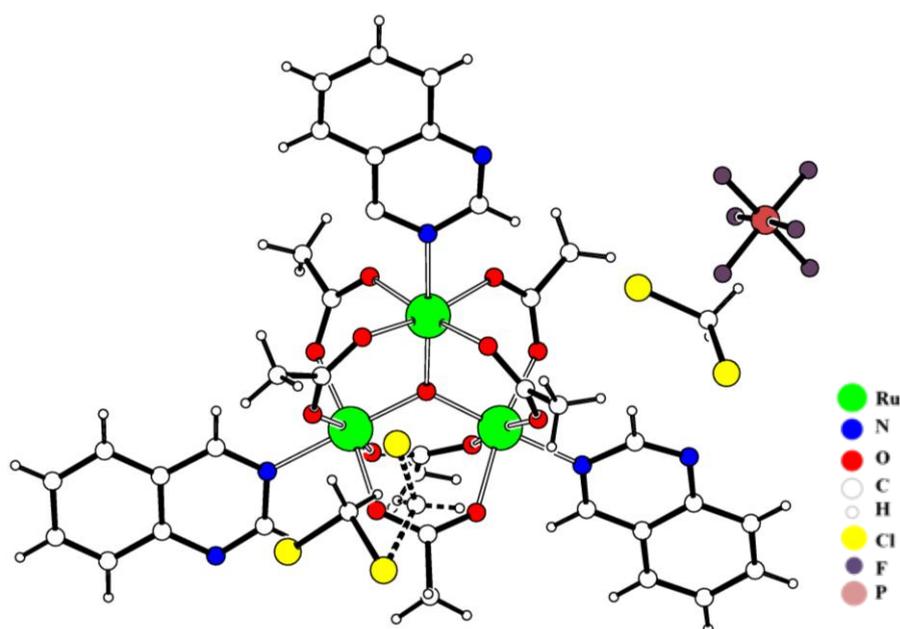


Fonte: Autora

3. Difração de Raios-X em monocristal (DRX)

Durante a execução do trabalho, observou-se a formação de cristais para todos os compostos da série, porém, apenas o complexo 1 apresentou cristais adequados para a análise de DRX. Na estrutura cristalina do complexo 1, é possível notar a desordem do solvente (CH_2Cl_2) (Figura 18), e é provável que esse seja o motivo pelo qual não foi possível obter bons cristais dos outros complexos: é a presença de solvente que mantém a cristalinidade do monocristal e, assim que o solvente evapora, o monocristal perde a cristalinidade, não difratando os raios-X.

Figura 18. Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6 \cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$, mostrando a desordem do solvente.



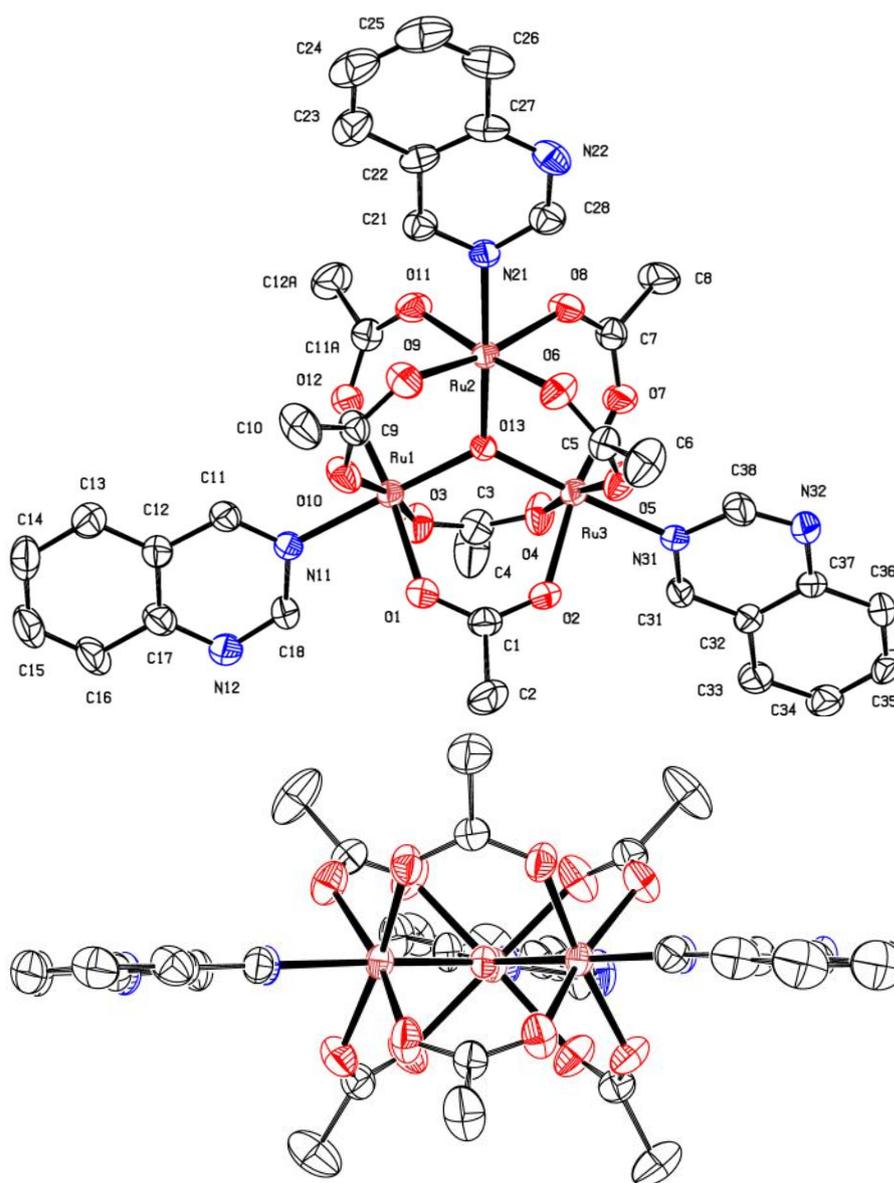
Fonte: Autora

O complexo 1 ($[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6 \cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$) cristalizou em um sistema monoclinico, grupo espacial Cc (Tabela 5) e os íons Ru^{3+} estão em um arranjo triangular no complexo.

A

Figura 19 traz o diagrama ORTEP do íon $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$:

Figura 19. (superior) Diagrama ORTEP para o cátion $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$
(inferior) Vista lateral explicitando a coplanaridade dos ligantes



Fonte: Autora

Tabela 5. Dados cristalográficos obtidos pelo refinamento da estrutura do complexo

$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]\text{PF}_6 \cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$	
Fórmula empírica	$\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{Cl}_4\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_{13}\text{PRu}_3$
Massa molecular	1377.73
Temperatura	296(2) K
Comprimento de onda da radiação	0.71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	Cc
Dimensões da célula unitária	a = 10.4495(2) Å
	b = 22.0539(5) Å
	c = 21.9358(4) Å
Volume	5039.37(18) Å ³
Z	4

Fonte: Autora

A Tabela 6 resume o comprimento das ligações e os ângulos de ligação que ocorrem na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$:

Tabela 6. Comprimentos e ângulos das ligações na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ de $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{qui})_3]^+$

Comprimento das ligações (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)

Fonte: Autora

Os dados observados para o complexo 1 estão de acordo com aqueles apresentados para esta classe de compostos (TOMA et al., 2001), como é o caso dos ângulos das ligações Ru-O-Ru de, aproximadamente, 120°, bem como das ligações Ru-Ru-Ru de 60° cada, o que é compatível com a estrutura triangular proposta para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$. Apesar de muito próximas a 1,9 Å, existe, no entanto, uma ligação Ru-O mais longa que as demais, o que indica que o triângulo formado não é perfeitamente equilátero, como

pensou-se inicialmente, mas este fato está de acordo com os dados de complexos análogos (ZHILYAEV et al., 1994; POWELL; RICHENS; BINO, 1995). A influência *trans* observada pela coordenação à ponte μ -oxo fica evidenciada pelo comprimento das ligações Ru-N ser maior que das ligações Ru-O: 2,1 Å contra 1,9 Å, como mostrado anteriormente. Além de todas as observações feitas, a estrutura resolvida do complexo 1 mostrou que o nitrogênio coordenado é aquele menos estericamente impedido, o que foi de grande valia, uma vez que questões acerca de isomeria de ligação surgiram ao longo do desenvolvimento do projeto. Além disso, ficou claro que os ligantes utilizados, derivados de isoquinolina, eram mais adequados aos complexos trinucleares do que os derivados de quinolina, poupando tempo e recursos na seleção dos complexos a serem estudados.

A coplanaridade dos ligantes em complexos trinucleares já foi observada por Kubiak e colaboradores (GOELTZ; BENSON; KUBIAK, 2010) para o caso do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{iq})_2(\text{CO})]$, quando isto não foi verificado para o complexo análogo com ligante piridina ($[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{CO})]$). Os autores desse trabalho justificam que a isoquinolina é capaz de aumentar a deslocalização eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ no sentido dos ligantes, através de uma extensão do sistema π do complexo. Mas, especialmente para os complexos com CO, é observada uma localização eletrônica em torno da ligação $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-CO}$ (MOREIRA et al., 2016).

Os ligantes quinazolina no complexo 1 têm um alto grau de coplanaridade, e esse é um fato que precisa ser ressaltado, porque, neste caso, a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ já se comporta como deslocalizada, a ponto de muitos autores alegarem que a deslocalização eletrônica é tão intensa que a unidade comporta-se como um único íon metálico (TOMA et al., 2001). Idealmente, sob simetria D_{3h} , o complexo tem orbitais a_2'' e e'' que têm simetria adequada para interagir com os orbitais π dos ligantes orientados paralelamente ao plano da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ (BAUMANN et al., 1978). Além disso, a quinazolina tem um nitrogênio não coordenado em sua estrutura que auxilia na extensão do sistema π do próprio ligante. Na ausência de outros efeitos dirigindo a estrutura do complexo, a intensa deslocalização eletrônica pelo sistema π estendido no complexo pode ter prevalecido, fazendo com que a estrutura descrita anteriormente seja favorável.

Esse comportamento contrasta com aquele apresentado pelo análogo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_3]^+$, onde um ligante aromático menor (piridina) não favorece o aumento da deslocalização pelo sistema π , ou seja, ele localiza a densidade eletrônica, o que influencia na estrutura do complexo ao ponto de um ligante piridina ser perpendicular ao plano formado pela unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, enquanto somente os outros dois são coplanares (ZHILYAEV et al., 1994). Como mencionado anteriormente, no caso do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2(\text{CO})]$, as duas piridinas são perpendiculares ao plano da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^0$, evidenciando novamente a influência do aumento da deslocalização eletrônica na estrutura do complexo.

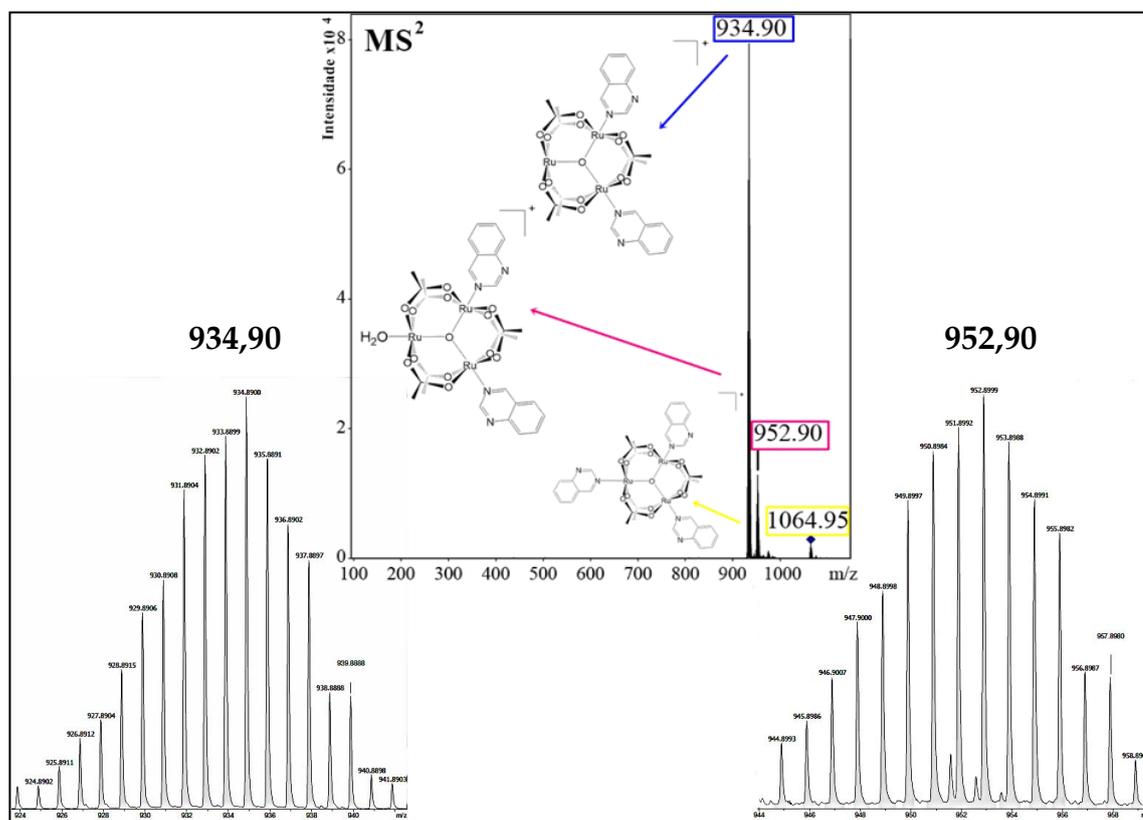
4. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta muito útil na caracterização de compostos de coordenação e organometálicos (HENDERSON; MCINDOE, 2005). No caso de complexos trinucleares de rutênio, a espectrometria de massas foi utilizada com sucesso por Toma e colaboradores (TOMA et al., 2004; EBERLIN et al., 2006; NIKOLAOU et al., 2008) e Nikolaou e colaboradores (MOREIRA et al., 2008) na caracterização estrutural dos compostos.

A fragmentação (MS^2) nos espectros de massas dos complexos trinucleares de rutênio pode fornecer informações completas sobre a estrutura dos compostos. Na análise feita em equipamentos de alta resolução, a forma da distribuição isotópica é bem definida para cada tipo de complexo, uma vez que se origina a partir de uma distribuição binomial que leva em conta o número de isótopos, a sua abundância relativa e de massa de todos os elementos envolvidos na ligação química (HENDERSON; MCINDOE, 2005). Esta é a primeira evidência sobre a estrutura dos complexos. Depois disso, utilizando a separação da razão m/z (massa/carga) entre os sinais na distribuição isotópica, é possível determinar a carga do íon (TOMA et al., 2004; EBERLIN et al., 2006; MOREIRA et al., 2008; NIKOLAOU et al., 2008). Por fim, a análise de alta resolução proporciona a massa exata e permite a estimativa da fórmula molecular do complexo (HENDERSON; MCINDOE, 2005).

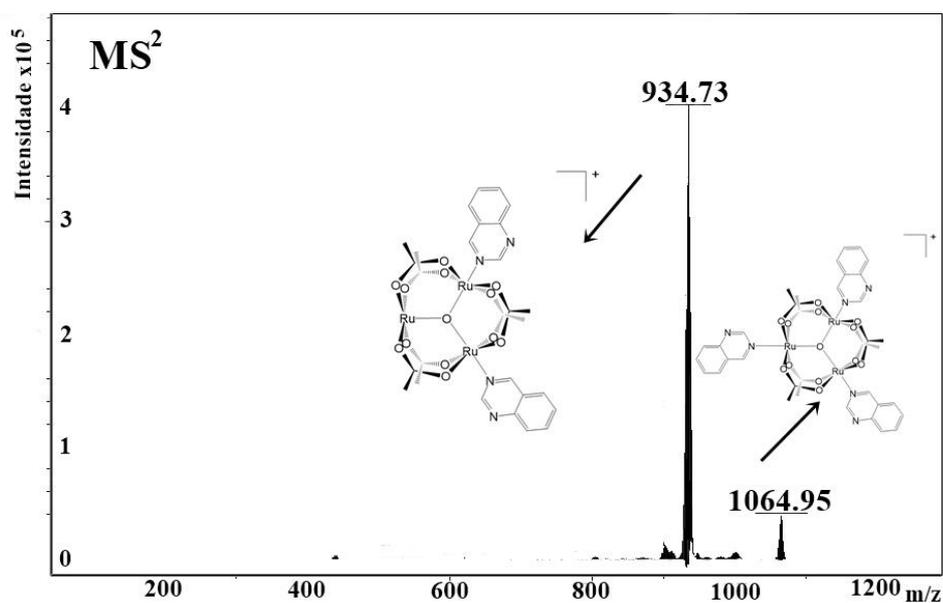
As imagens a seguir mostram os espectros obtidos na segunda fragmentação (MS²) (os espectros *full scan* estão no ANEXO I) dos compostos 1-6, utilizando tanto ESI quando MALDI como técnicas de ionização.

Figura 20. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1064,95



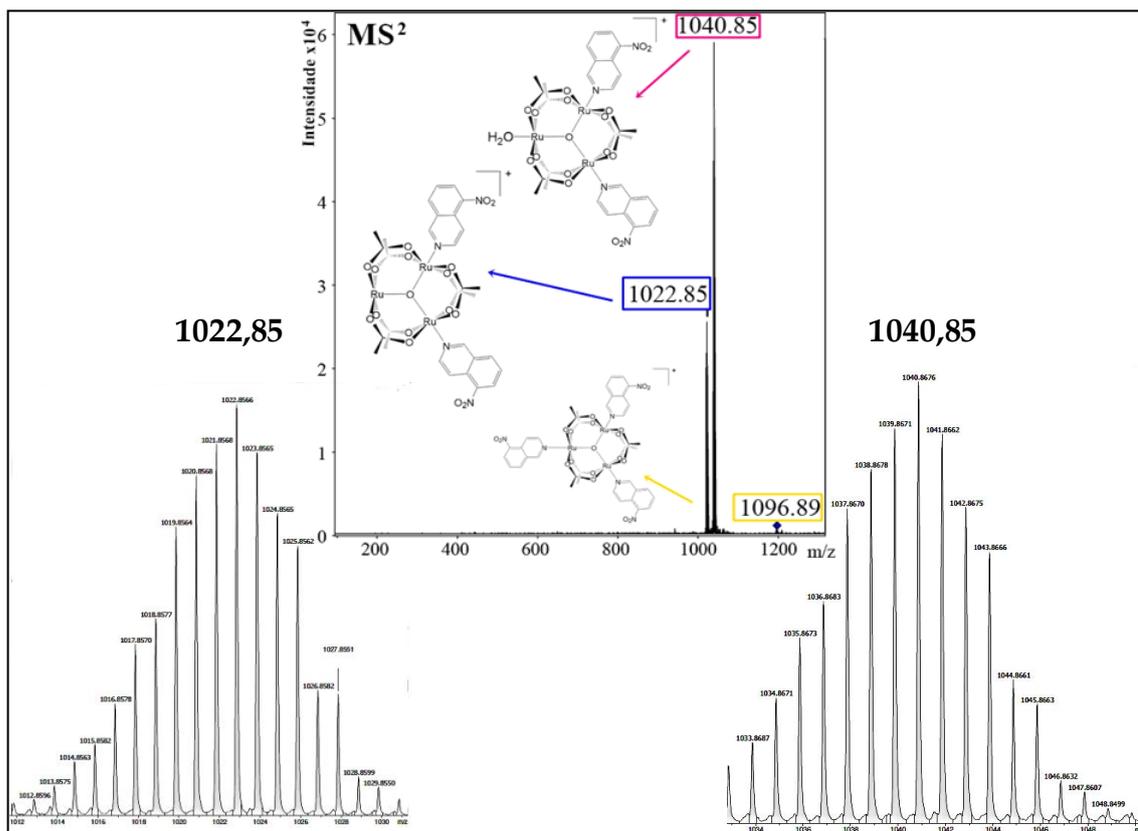
Fonte: Autora

Figura 21. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1064,95



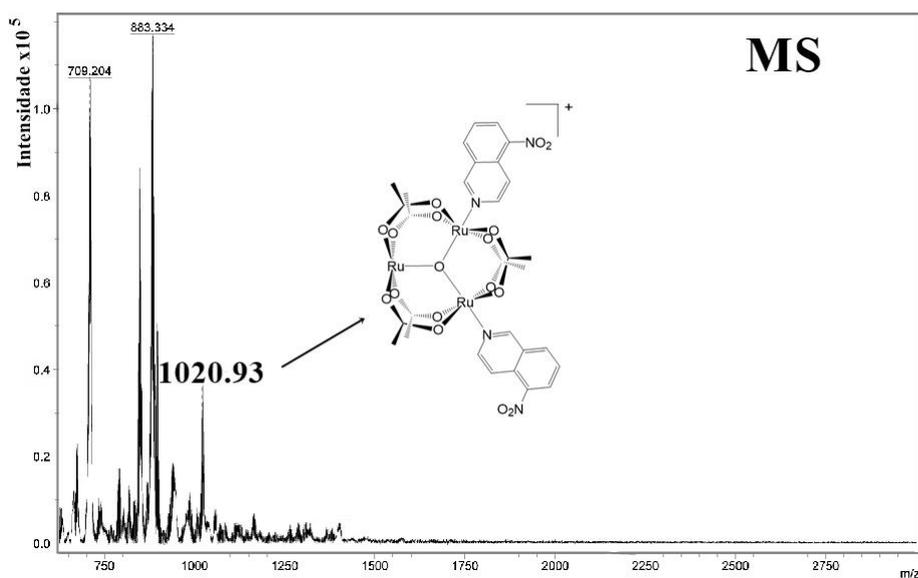
Fonte: Autora

Figura 22. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1096,89



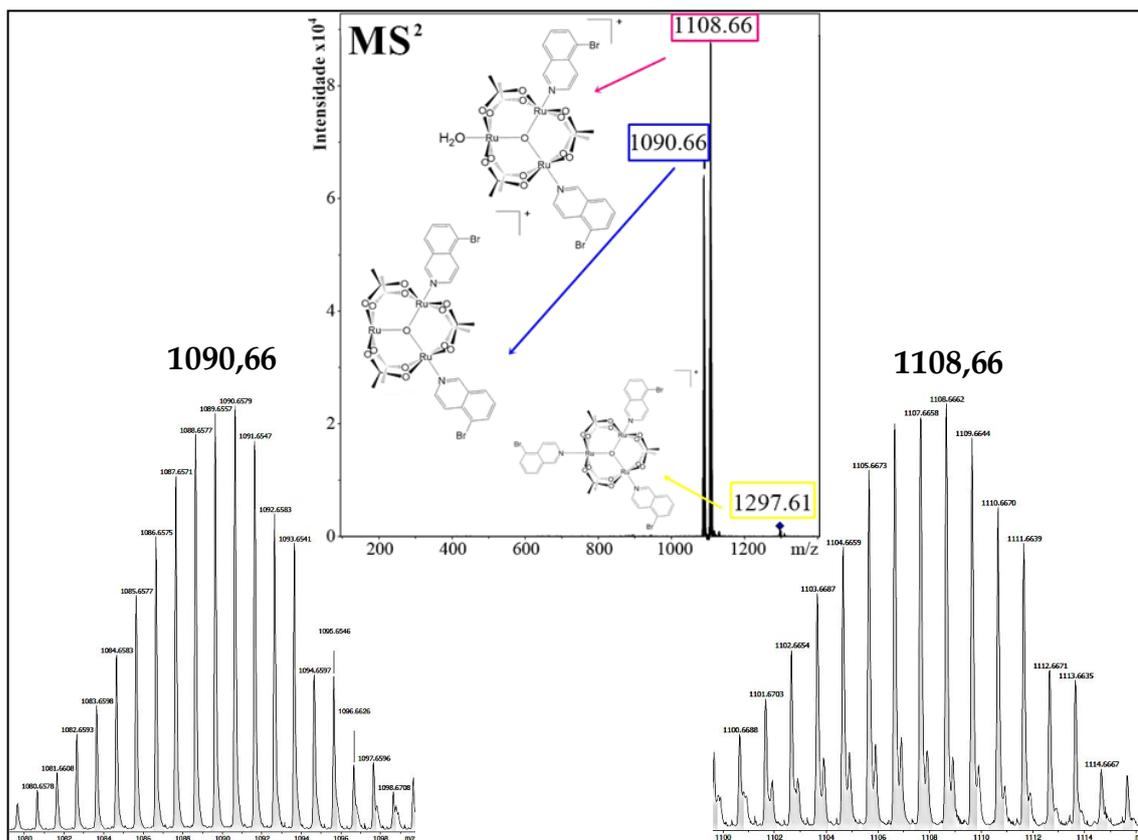
Fonte: Autora

Figura 23. Espectro *full scan* por MALDI+ do íon de m/z 1020,93, referente ao complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-nitro})_2]^+$



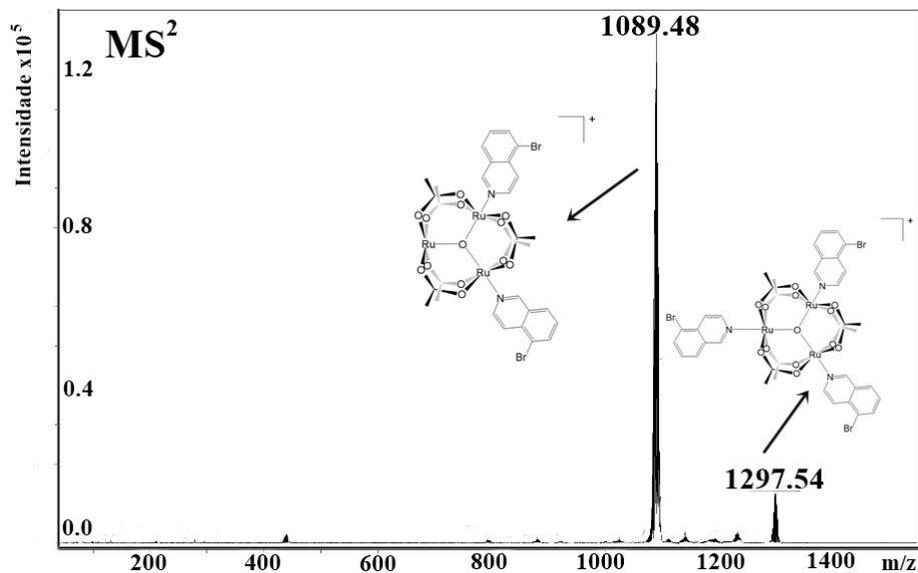
Fonte: Autora

Figura 24. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1297,61



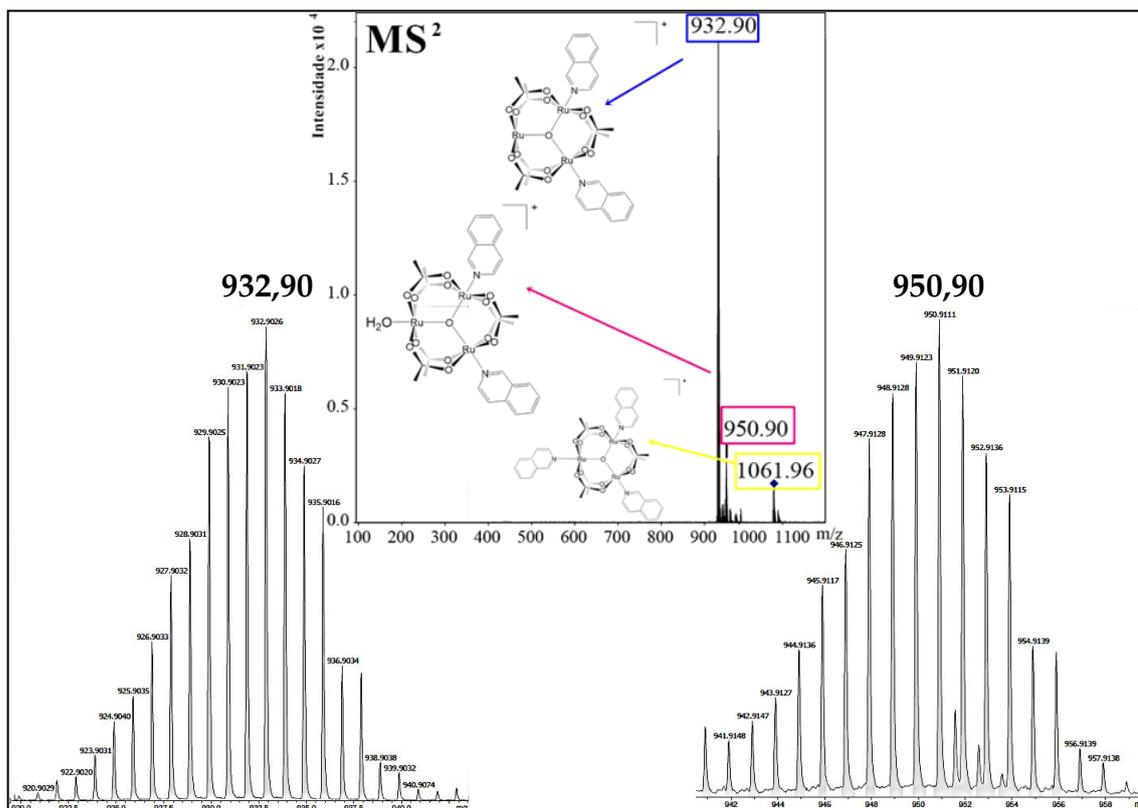
Fonte: Autora

Figura 25. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1297,54



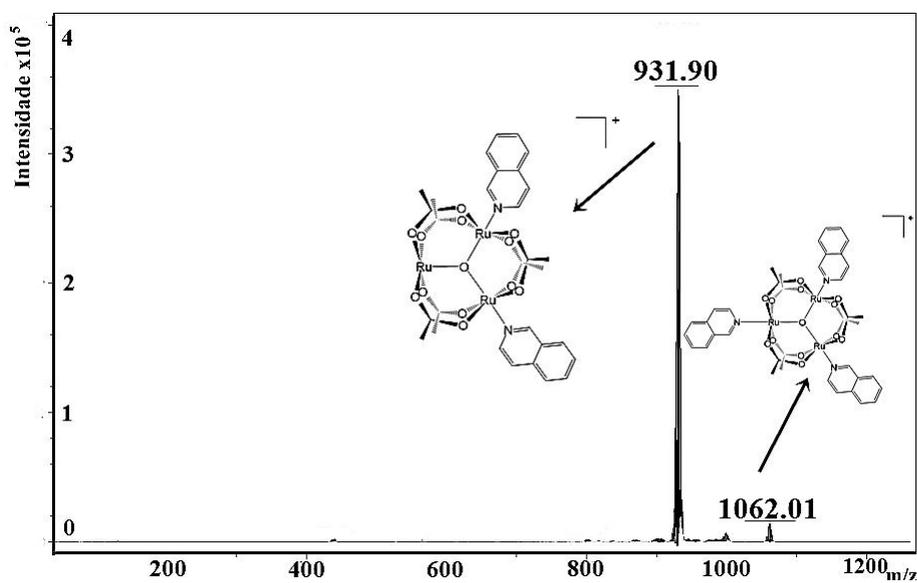
Fonte: Autora

Figura 26. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1061,96



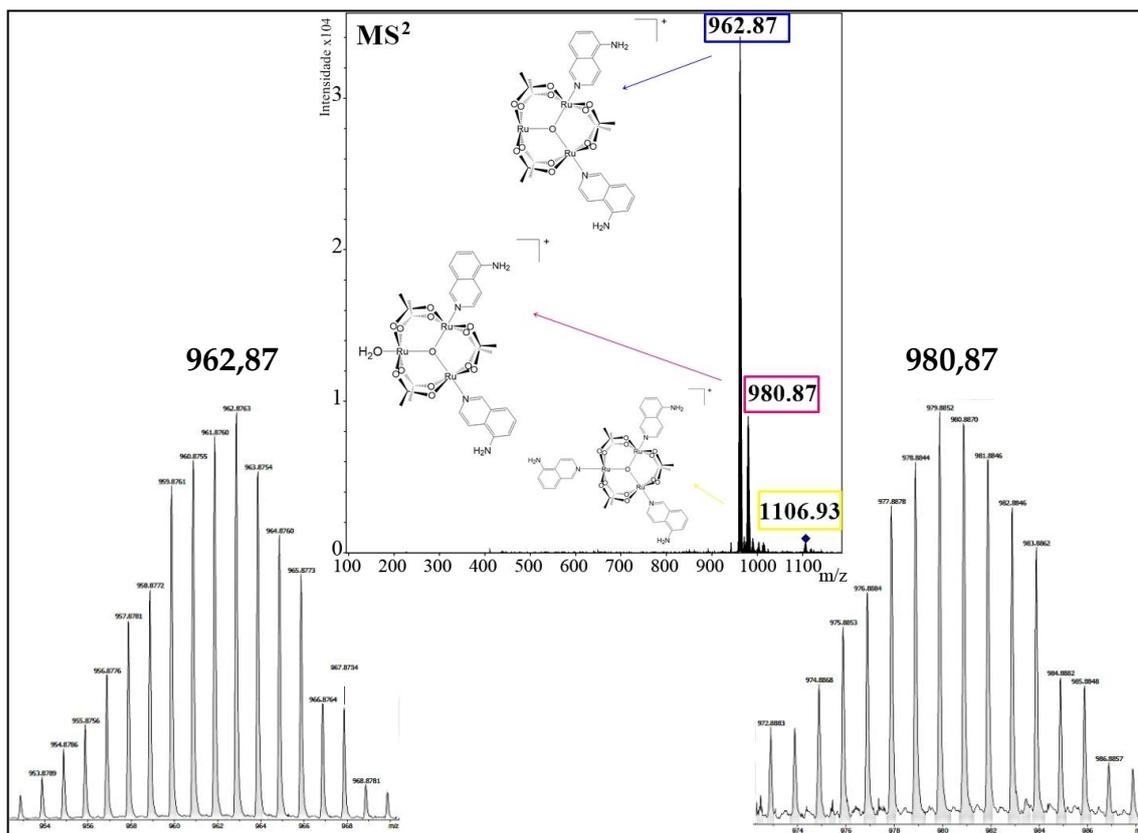
Fonte: Autora

Figura 27. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1062,01



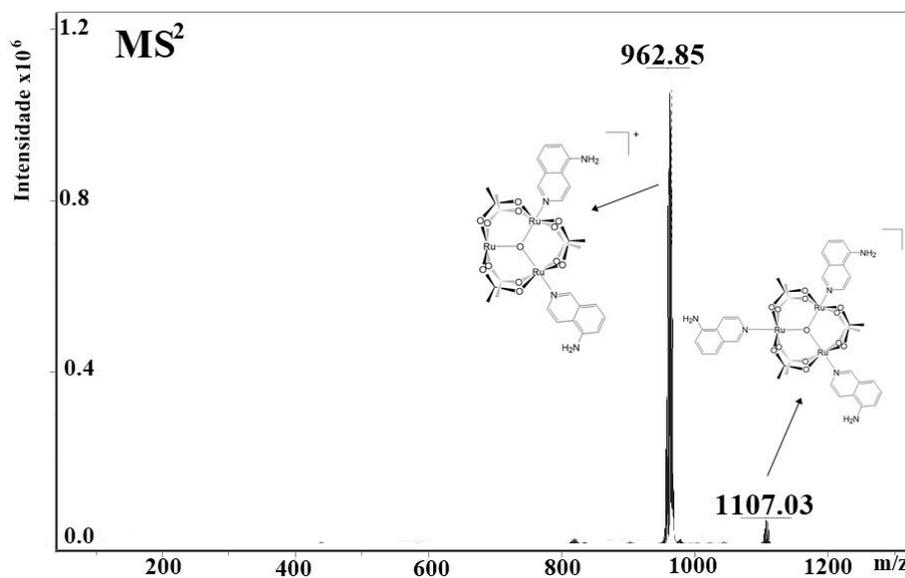
Fonte: Autora

Figura 28. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1106,93



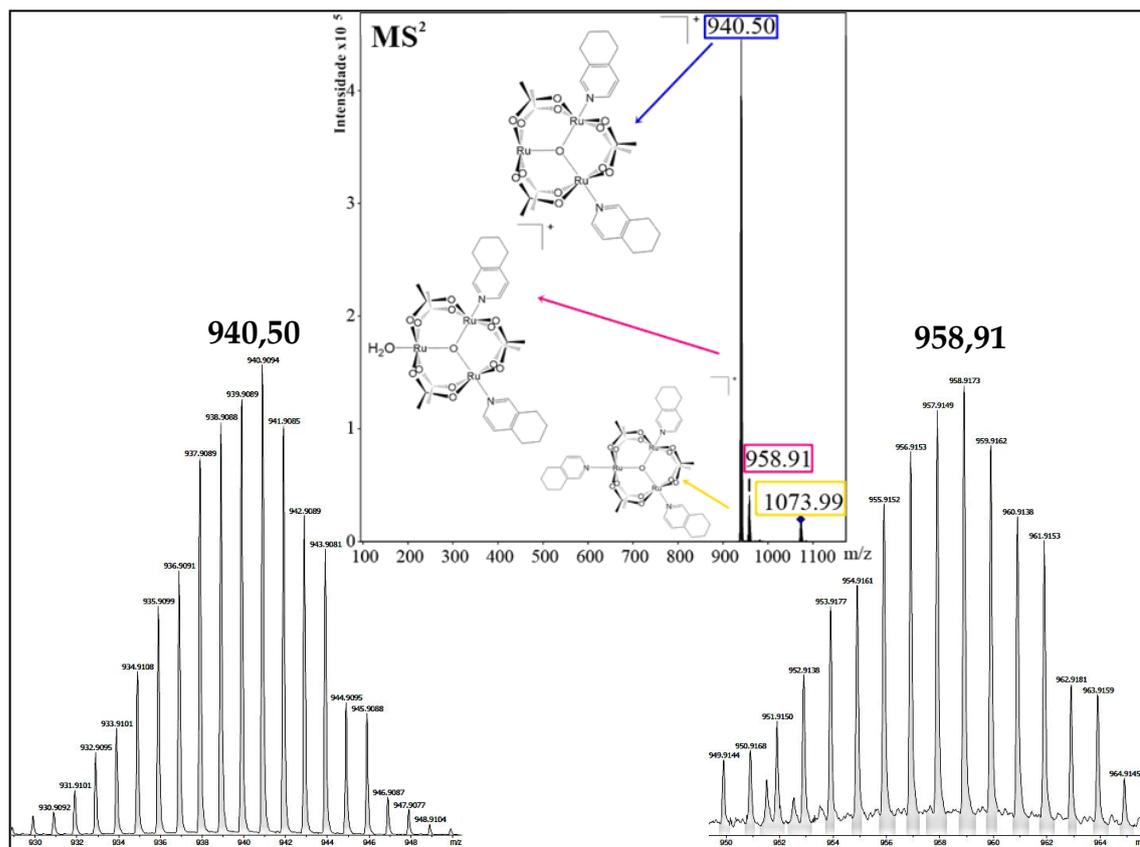
Fonte: Autora

Figura 29. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1107,03



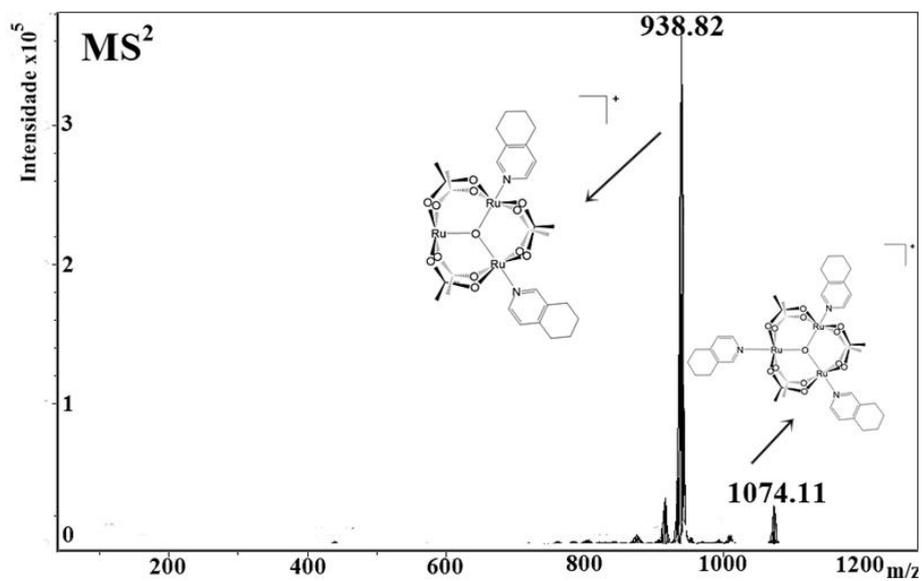
Fonte: Autora

Figura 30. Espectro de fragmentação por ESI+ do íon de m/z 1073,99



Fonte: Autora

Figura 31. Espectro de fragmentação por MALDI+ do íon de m/z 1074,11



Fonte: Autora

Além da grande correspondência entre o valor calculado e os resultados obtidos (Tabela 7), em ambas as técnicas de ionização utilizadas, ESI-Q-TOF e MALDI-Q-TOF, observou-se também uma consistência nos valores de m/z apresentados nos espectros. Além disso, os compostos apresentados neste trabalho mostraram um efeito interessante: para todos os complexos presentes na série, existe a presença de um sinal que corresponde à formação de um aquocomplexo, de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, na fragmentação (MS^2) do ESI. Isso é um resultado inesperado, uma vez que somente o íon complexo foi selecionado para a fragmentação, e, supostamente, somente moléculas de mesma razão m/z estariam presentes na segunda câmara de fragmentação.

Para confirmar como a ionização dos complexos acontece, uma segunda técnica foi utilizada, a MALDI. Enquanto a ESI utilizou água na mistura de solventes onde os analitos foram infundidos para aplicação no espectrômetro, o experimento utilizando MALDI foi realizado em fase sólida (cocrystalização com a matriz sem água), portanto, se a água encontrada para a formação do aquocomplexo tiver sido originada em alguma rota de fragmentação, o pico de razão m/z equivalente também deve ser encontrado na fragmentação do íon complexo na MALDI.

A Tabela 7 resume os resultados encontrados para ambas as técnicas de ionização, mostrando o comportamento típico apresentado por todos complexos da série.

Tabela 7. Resultados obtidos através dos espectros de massa (MS²) dos complexos 1-6

	m/z [ML ₃] ⁺ (calculado)	m/z [ML ₃] ⁺	m/z [ML ₂] ⁺	m/z [ML ₂ (H ₂ O)] ⁺
ESI-Q-TOF (MS²)				
<i>Complexo 1</i>	1065,95	1064,95	934,90	952,90
<i>Complexo 2</i>	1197,91	1196,89	1022,85	1040,85
<i>Complexo 3</i>	1296,69	1297,61	1089,65	1106,66
<i>Complexo 4</i>	1062,69	1061,96	932,90	950,90
<i>Complexo 5</i>	1107,99	1106,93	962,87	980,87
<i>Complexo 6</i>	1075,05	1073,99	940,90	958,91
MALDI-Q-TOF (MS²)				
<i>Complexo 1</i>	1065,95	1064,95	934,73	-
<i>Complexo 2</i>	-	-	-	-
<i>Complexo 3</i>	1296,69	1297,54	1089,48	-
<i>Complexo 4</i>	1062,69	1061,01	931,90	-
<i>Complexo 5</i>	1107,99	1107,02	962,85	-
<i>Complexo 6</i>	1075,05	1074,11	938,82	-

Fonte: Autora

No caso da MALDI, os espectros de fragmentação dos complexos 1-4 e 6 (o complexo 5 coordenou-se à matriz, e não foi possível selecionar o íon complexo [M-PF₆]⁺ para fragmentação), apresentam apenas dois picos, com razão m/z correspondente a, respectivamente, [Ru₃O(CH₃COO)₆(L)₃]⁺ e [Ru₃O(CH₃COO)₆(L)₂]⁺, e esses valores são consistentes àqueles encontrados para estes fragmentos em espectros onde utilizou-se ESI como técnica de ionização. A ausência, no MALDI, da razão m/z correspondente ao fragmento do aquocomplexo fortalece a hipótese de que sua formação acontece porque não só moléculas com m/z do íon complexo são levadas à câmara de fragmentação, mas também outras pequenas moléculas neutras, nesse caso, a água utilizada na injeção das amostras.

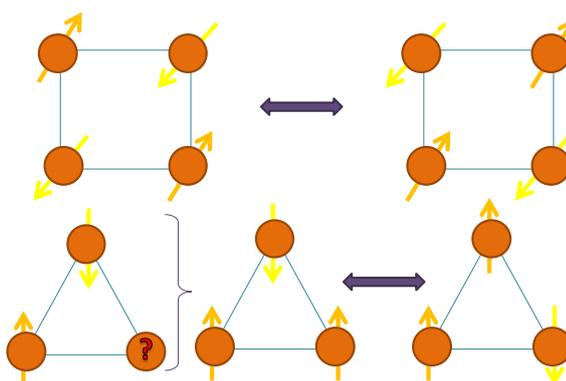
Apesar do comportamento atípico dos complexos nos espectros de massa no caso da ESI, é importante ressaltar a ausência de mais fragmentos nos espectros de fragmentação (ESI e MALDI). Entretanto, maiores energias não foram testadas para fragmentação para

confirmar que apenas a perda dos ligantes seria observada, independente das condições experimentais, confirmando a estabilidade do complexo.

5. Ressonância Magnética Nuclear

Para complexos polinucleares de alguns metais do bloco d, observa-se um fenômeno chamado de frustração de spin (PAVLISHCHUK; GAVRILENKO; KOLOTILOV, 2002), que é a incapacidade do sistema magnético encontrar uma configuração única capaz de minimizar sua energia (KAHN, 1997) (Figura 32), gerando estados fundamentais degenerados com spin diferente de zero (PAVLISHCHUK; GAVRILENKO; KOLOTILOV, 2002). A utilização da técnica de RMN (em solução) torna-se inviável para a caracterização desses complexos, devido à impossibilidade de alinhamento dos spins, gerando campos locais que interferem fortemente no campo aplicado.

Figura 32. Esquema ilustrando a frustração de spin



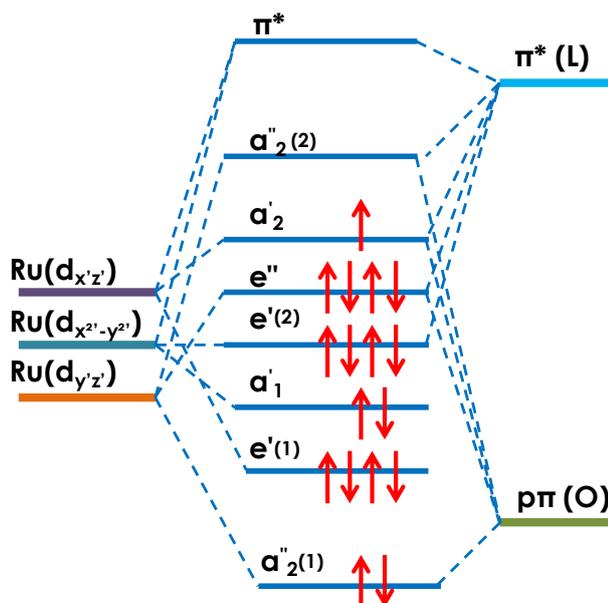
Em sistemas antiferromagnéticos triangulares, a frustração é inevitável.

Fonte: Adaptado de (“Sistemas Frustrados: Líquidos e Gelos de Spin”)

Apesar de os íons Ru^{3+} (d^5) serem paramagnéticos, o elétron desemparelhado de cada rutênio não se mantém após a formação do complexo trinuclear de fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$, pois os elétrons dos orbitais 4d não permanecem localizados no centro metálico, e sim deslocalizados na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, que foi descrita como um núcleo metálico deslocalizado em razão da severa mistura orbital observada para os três íons de rutênio e o oxigênio central (BAUMANN et al., 1978; TOMA et al., 2001). Assim, estes complexos trinucleares de rutênio não apresentam frustração de spin, mas, como pode ser visto através da distribuição eletrônica no diagrama de orbitais moleculares

(Figura 33), existe um elétron desemparelhado no orbital a'_2 , e, devido à presença deste elétron desemparelhado, os complexos apresentam *anisotropia paramagnética*, que é o efeito causado por este elétron desemparelhado nas propriedades magnéticas do sistema.

Figura 33. Diagrama de orbitais moleculares proposto para complexos trinucleares de rutênio com simetria D_{3h}



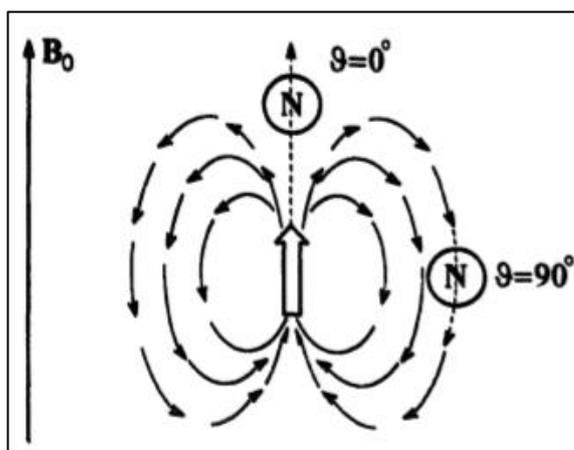
Fonte: Adaptado de (ALEXIOU, 1993)

A anisotropia paramagnética pode ser tratada através de dois mecanismos: o mecanismo de pseudocontato, ou mecanismo dipolar, e o mecanismo de contato de Fermi.

Segundo Ivano Bertini in *Encyclopedia of Biophysics* (BERTINI; PARIGI, 2013), “o mecanismo de pseudocontato acontece quando a rotação do acoplamento dipolar entre o momento magnético nuclear e a média dos momentos magnéticos eletrônicos induzidos pelo campo externo é diferente de zero” (tradução livre). Ou seja, campo magnético originado pela rotação do elétron desemparelhado interage somando-se ou subtraindo-se ao campo magnético externo. Esse mecanismo depende da sua distância com relação ao núcleo paramagnético e da posição angular. Deste modo, os núcleos mais distantes do centro paramagnético sentem menos o efeito do elétron desemparelhado (BERTINI; LUCHINAT, 1996). Os deslocamentos dos sinais resultam do acoplamento dipolar do momento magnético do núcleo e do elétron desemparelhado. Este mecanismo explica,

por exemplo, porque alguns hidrogênios são deslocados para campo mais alto, e outros para campo mais baixo, já que, como dito anteriormente, a interação dipolar também depende da orientação relativa dos núcleos e do centro paramagnético, fazendo com que o campo magnético externo seja sentido de maneiras diferentes, dependendo da orientação do núcleo (BERTINI; LUCHINAT, 1996; NIKOLAOU, 2002), como mostra a Figura 34, retirada de (BERTINI; LUCHINAT, 1996).

Figura 34. Ilustração do mecanismo de pseudocontato

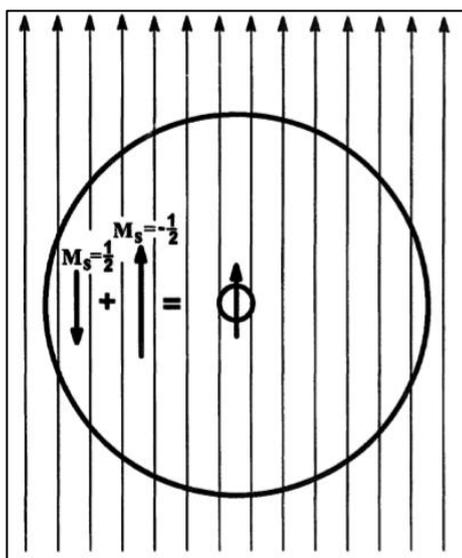


“Um núcleo N imerso no campo magnético dipolar do spin eletrônico, o primeiro alinhado com o campo magnético externo, experimenta um campo extra que se soma ($\theta=0^\circ$) ou subtrai ($\theta=90^\circ$) ao campo externo”
Tradução livre, retirado de (BERTINI; LUCHINAT, 1996)

Fonte: (BERTINI; LUCHINAT, 1996)

O mecanismo de contato de Fermi considera que o contato é dado pela polarização de spin, resultado da presença de densidade eletrônica do elétron desemparelhado no núcleo paramagnético (BERTINI; LUCHINAT, 1996). A densidade contribui para o campo magnético no núcleo (Figura 35), e o efeito é propagado através de ligações π . (BERTINI; LUCHINAT, 1996).

Figura 35. Ilustração do mecanismo de contato de Fermi



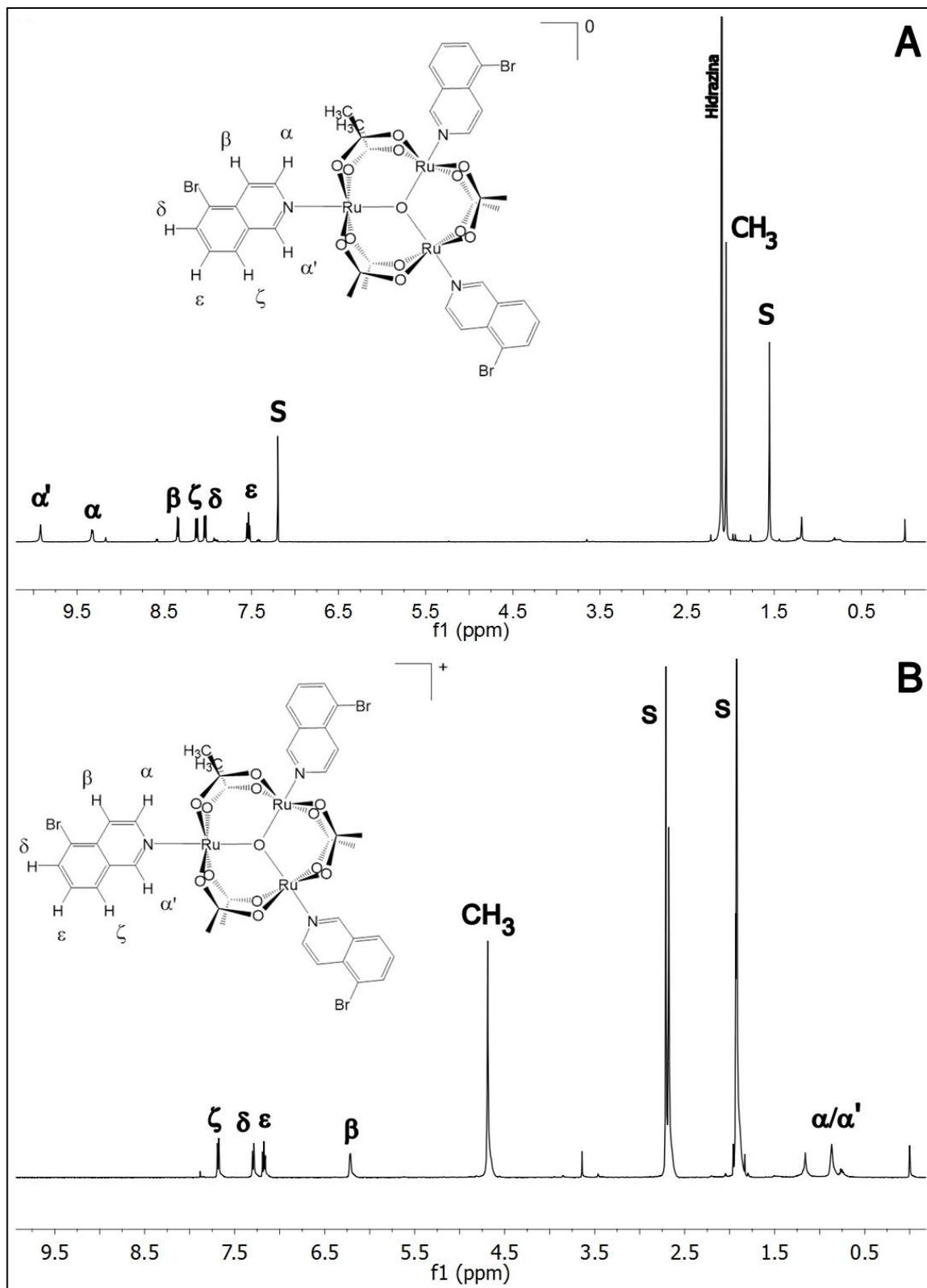
“O excesso de $-1/2$ na densidade de spin do elétron contribui com um campo magnético no núcleo, que se soma ao campo magnético externo.” Tradução livre, retirado de (BERTINI; LUCHINAT, 1996)

Fonte: (BERTINI; LUCHINAT, 1996)

A intensa deslocalização eletrônica em torno da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ atenua o efeito da anisotropia paramagnética, tornando a atribuição dos espectros RMN para essa classe de compostos fidedigna (BERTINI; LUCHINAT, 1996; ALEXIOU; TOMA, 1997; TOMA et al., 1999, 2001).

A discussão dos espectros de todos os complexos será feita em termos do efeito da anisotropia paramagnética nos deslocamentos químicos dos sinais dos núcleos. O complexo 3 foi escolhido para exemplificar este efeito nos complexos trinucleares na forma $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, e, para isso, estudou-se também o espectro de ^1H -RMN da forma reduzida do complexo 3, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_3]^0$, obtida pela redução com hidrazina. A forma reduzida dos complexos simétricos é diamagnética, ou seja, ao ganhar um elétron, o complexo deixa de ser paramagnético e não há mais efeito da anisotropia paramagnética. Então, os sinais dos hidrogênios dos acetatos e dos ligantes azanaftalenos são mais próximos àqueles apresentados pelos ligantes livres (NIKOLAOU, 2002). Nesta etapa do trabalho, os sinais foram atribuídos com o auxílio dos espectros de correlação COSY (ANEXO I).

Figura 36. A. Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})^0]$ obtido em clorofórmio- d_3 . B. Espectro de ^1H -RMN do complexo 3, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_3]^+$ obtido em acetona- d_6



Fonte: Autora

No caso da forma oxidada deste complexo em particular, os dois hidrogênios adjacentes ao nitrogênio coordenado aparecem no mesmo sinal: um singlete alargado. O alargamento dos sinais é comum para sistemas que apresentam a anisotropia paramagnética, e isto é devido à relaxação mais rápida causada pela perturbação associada ao elétron desemparelhado (BERTINI; LUCHINAT, 1996; NIKOLAOU, 2002). Os sinais que mais sofrem o efeito da anisotropia paramagnética são os dos hidrogênios dos acetatos em ponte, que são deslocados para campo mais baixo e, no ligante quinolínico, dos hidrogênios α e α' , adjacentes ao nitrogênio que está coordenado, que são deslocados para campo alto. Isso não significa que os hidrogênios mais distantes também não sofram o efeito, mas a magnitude da perturbação diminui com o distanciamento do núcleo paramagnético, neste caso, a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$. A Tabela 8 traz um resumo das atribuições tentativas dos sinais dos hidrogênios nos dois estados de oxidação diferentes do complexo 3 e a Tabela 9 traz os valores dos deslocamentos químicos dos ligantes livres.

Tabela 8. Correlação entre os sinais nos espectros do complexo 3 nas formas reduzida e oxidada

$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_3]^0$			$[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(5\text{-briq})_3](\text{PF}_6)$		
Deslocamento químico	Multiplicidade	Integração	Deslocamento químico	Multiplicidade	Integração
2,09 ppm (CH_3)	Singlete	17,86	0,97 ppm (α e α')	Singlete largo	6,00
7,57 ppm (ϵ)	Tripleto	2,94	4,79 ppm (CH_3)	Singlete	18,02
8,07 ppm (δ)	Dubleto	2,92	6,32 ppm (β)	Singlete	3,03
8,16 ppm (ζ)	Dubleto	3,10	7,28 ppm (ϵ)	Tripleto	3,14
8,38 ppm (β)	Dubleto	2,95	7,41 ppm (δ)	Dubleto	3,15
9,37 ppm (α)	Dubleto	2,99	7,79 ppm (ζ)	Dubleto	3,07
9,96 ppm (α')	Singlete	3,02			

Fonte: Autora

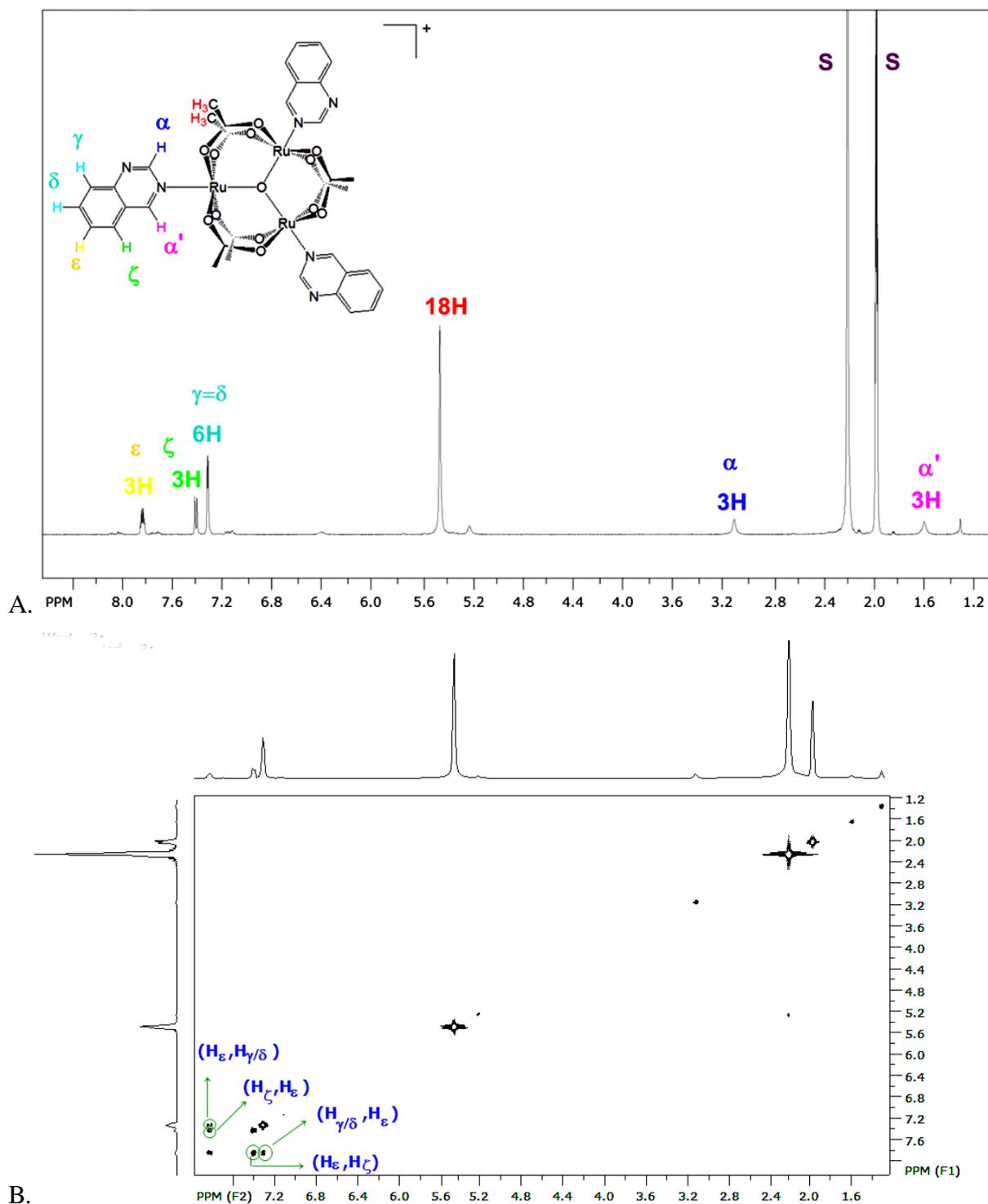
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios nos espectros ^1H -RMN dos ligantes livres

Hidrogênio	δ (ppm) (ligantes livres)					
	1, qui	2, 5-nitro	3, 5-briq	4, iq	5, 5-amino	6, THIQ
α'	9.40	9.50	9.37	9.22	9.25	8.25
α	9.35	8.75	8.66	8.48	8.40	$\alpha=\alpha'$
β	-	8.55	7.91	7.60	8.05	6.93
γ	8.05	-	-	7.90	-	2.76
δ	7.90	8.65	8.19	7.54	6.95	1.79
ϵ	7.50	7.85	7.62	7.64	7.40	$\epsilon=\delta$
ζ	$\delta=\zeta$	8.40	8.15	7.76	7.35	$\zeta=\gamma$
NH_2	-	-	-	-	6.05	-

Fonte: Autora

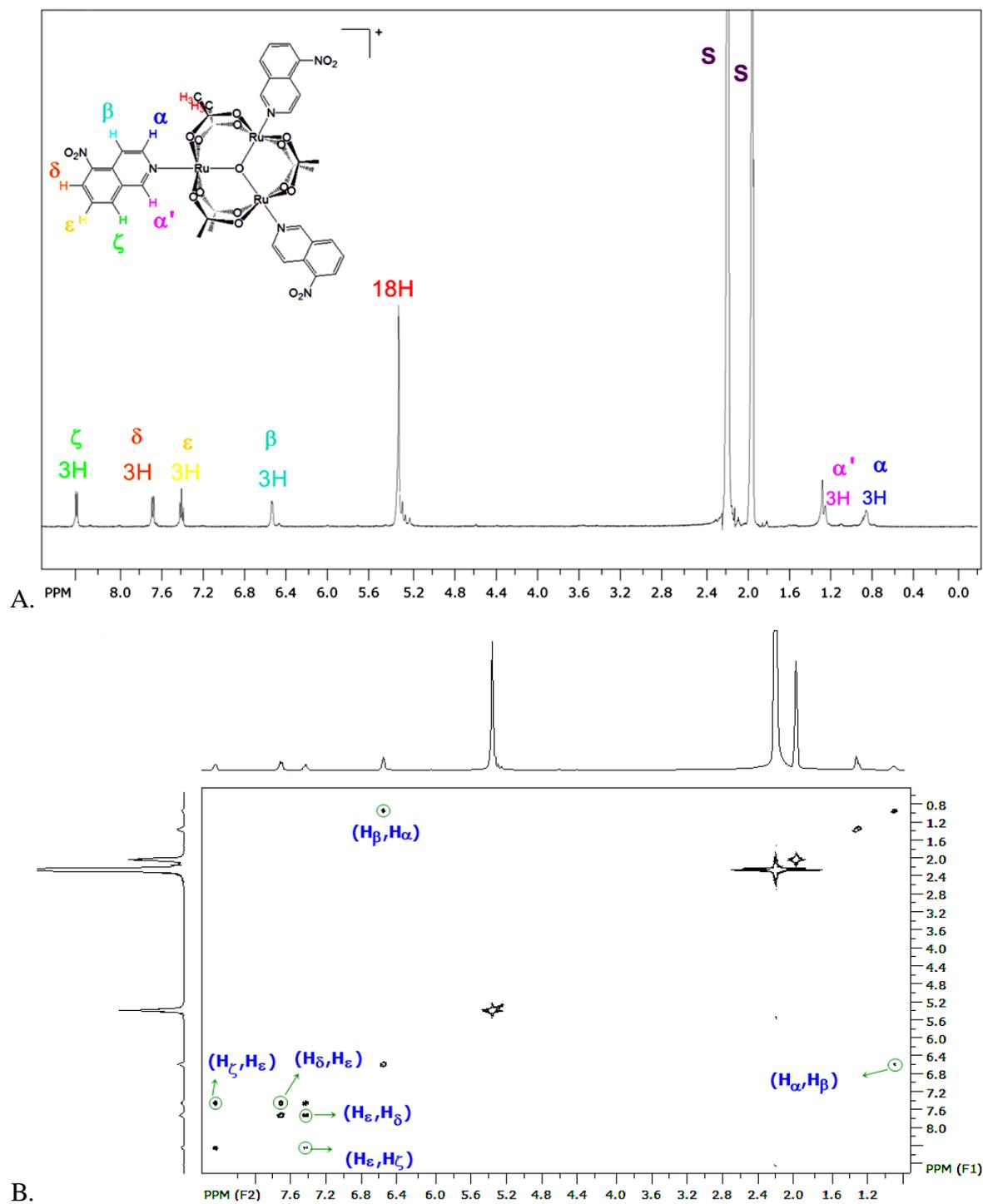
As atribuições dos espectros dos complexos 1-6 foram baseadas em espectros de correlação ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C , nos espectros dos ligantes livres (POUCHERT, 1993) e complexos análogos (ALEXIOU; TOMA, 1997; TOMA et al., 1999).

Figura 37. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo **1**, obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3



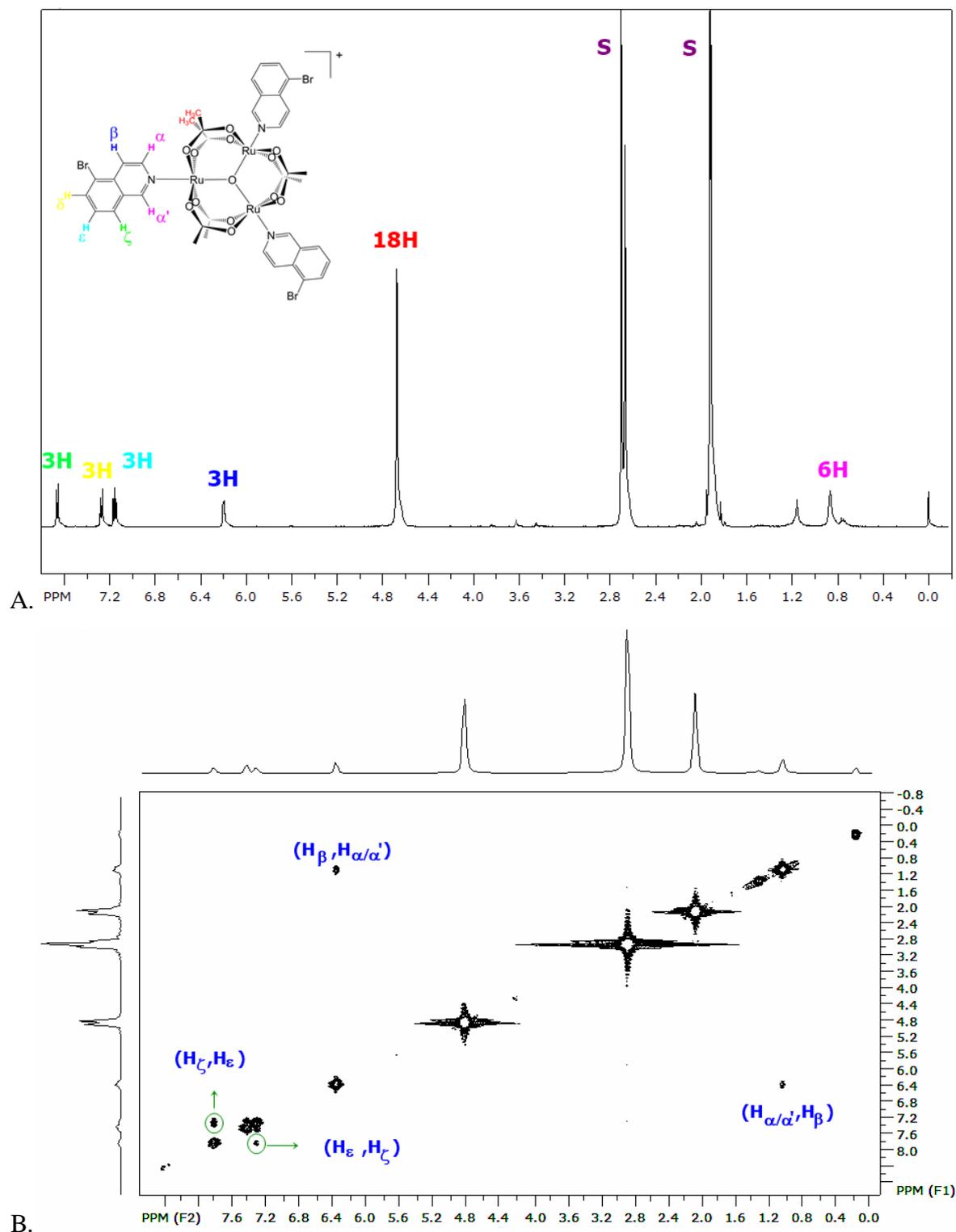
Fonte: Autora

Figura 38. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo **2**, obtidos de uma solução 1 mM em acetonitrila- d_3



Fonte: Autora

Figura 39. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo **3**, obtidos de uma solução 10 mM em acetona- d_6



Fonte: Autora

Figura 40. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo **4**, obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3

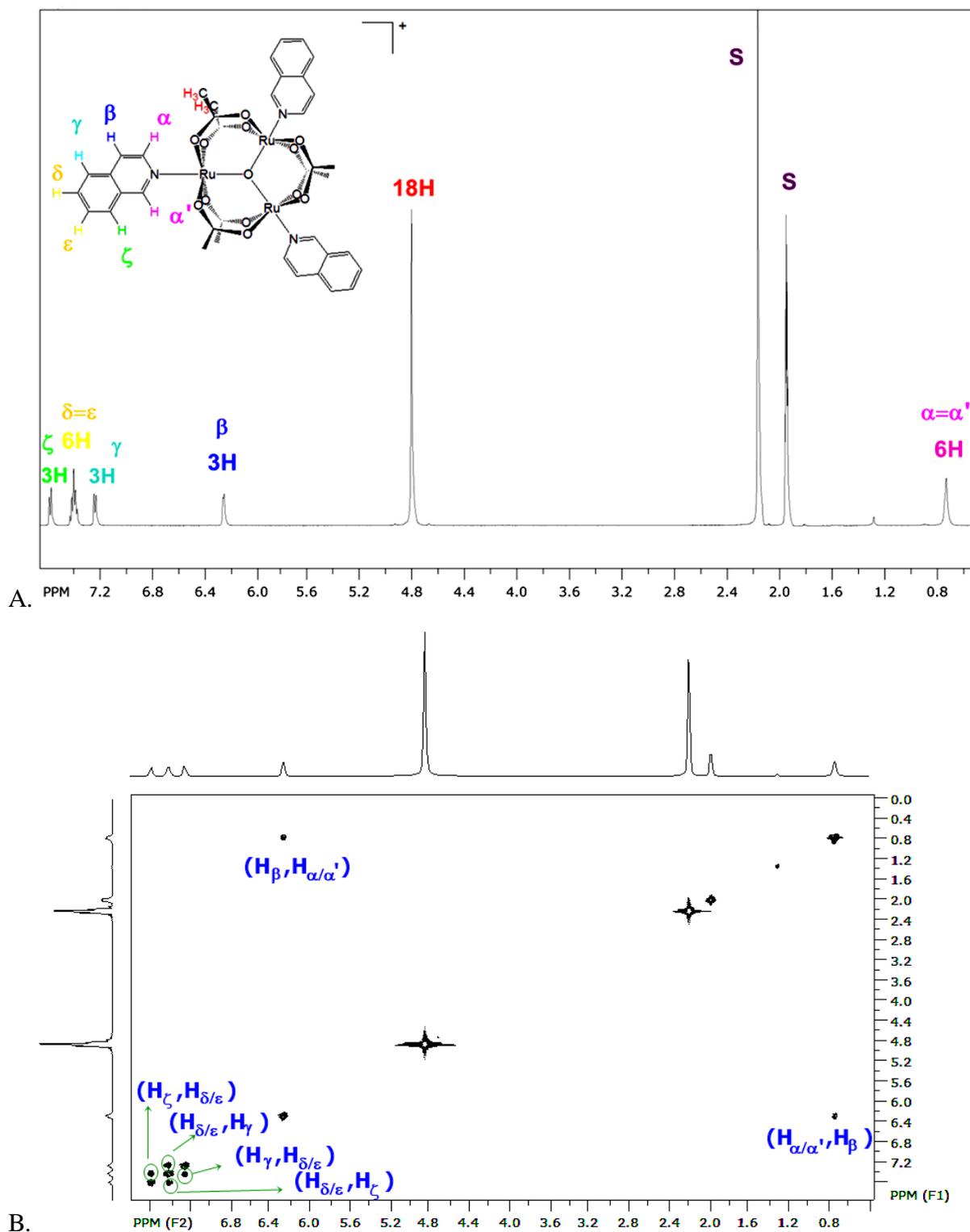
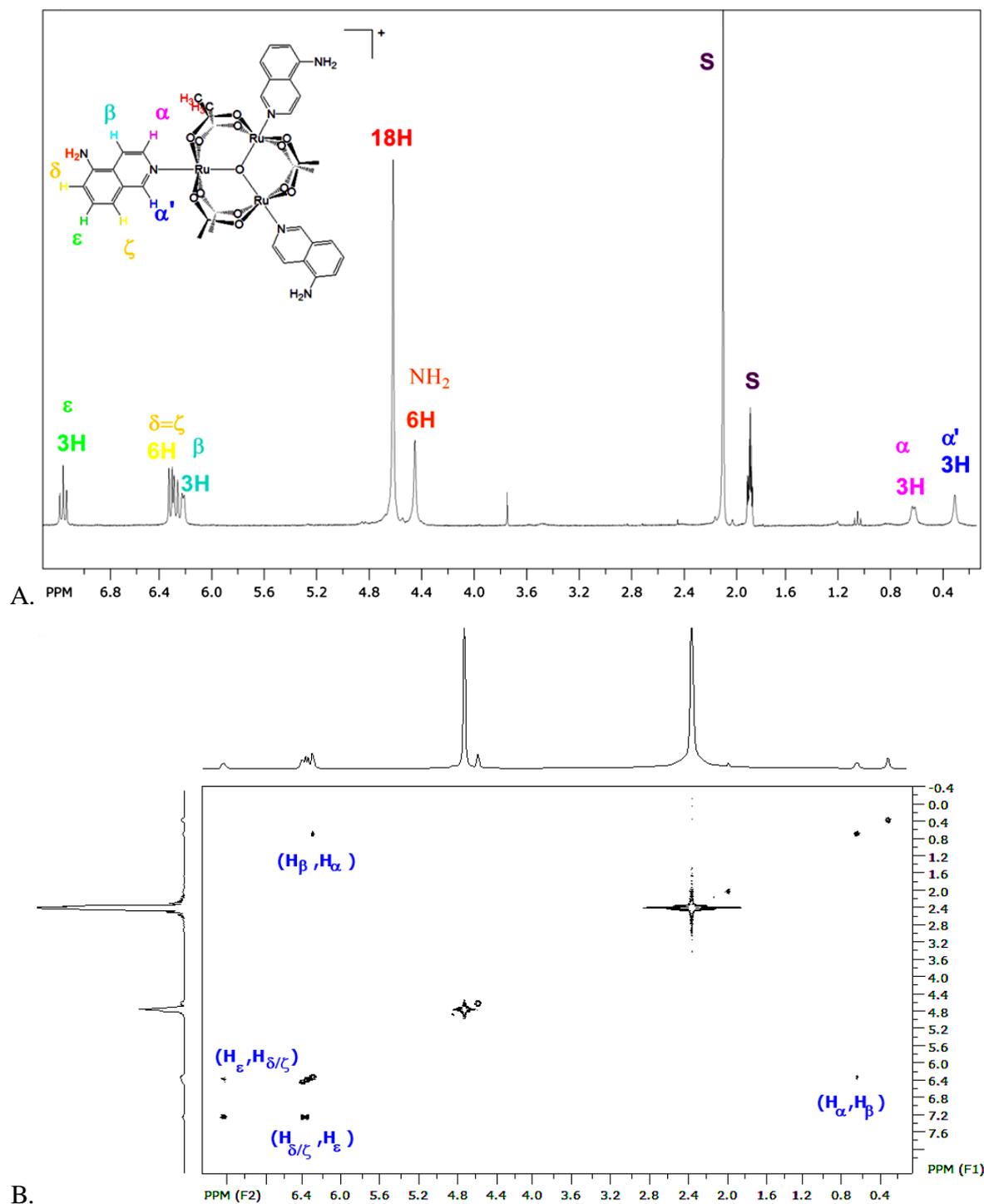
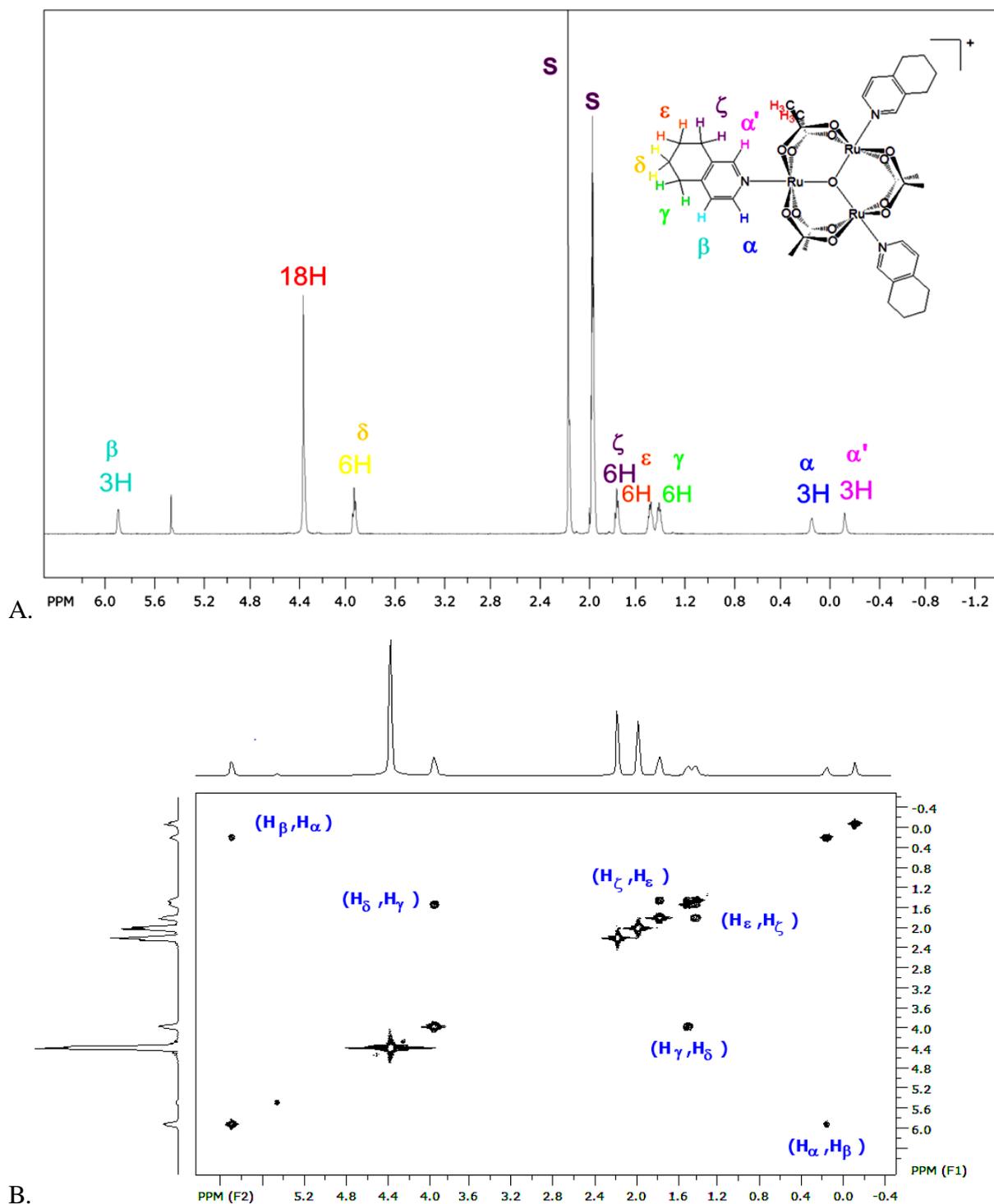


Figura 41. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo **5**, obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3



Fonte: Autora

Figura 42. Espectros de ^1H -RMN (A) e COSY (B) do complexo **6**, obtidos de uma solução 10 mM em acetonitrila- d_3



Fonte: Autora

Tabela 10. Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos nos espectros de ^1H -RMN

Hidrogênio	δ (ppm)					
	1, qui	2, 5-nitro	3, 5-briq*	4, iq	5, 5-amino	6, thiq
CH₃	5,43 (18H, s)	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)
NH₂	-	-	-	-	4,45 (6H, s)	-
pK_a						
	3,66	3,85	4,85	5,17	6,15	7,00

Os espectros do complexo 3 foram obtidos em solução de acetona-d₆

Fonte: Autora

Os sinais dos espectros ^1H -RMN são divididos em três grupos: os sinais dos hidrogênios das metilas dos acetatos; os sinais dos hidrogênios α , α' , adjacentes ao nitrogênio coordenado, e β do primeiro anel do azanaftaleno, que está diretamente ligado à unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, e, por fim, os sinais dos hidrogênios γ , δ , ϵ e ζ do segundo anel do azanaftaleno, que estão mais distantes da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$. Assim como também observado para o complexo 3 reduzido, quando comparados aos sinais dos ligantes livres, os sinais das metilas da ponte acetato foram deslocados para campo mais baixo, os sinais dos hidrogênios α , α' , e β foram muito deslocados para campo mais alto; e os sinais dos hidrogênios γ , δ , ϵ e ζ , mais distantes do núcleo paramagnético são menos afetados. Isso também é verificado para o complexo 6, cujo segundo anel do ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina não é aromático. Portanto, assim como para o complexo 3, o padrão dos deslocamentos químicos nesta classe de compostos é ditado pela anisotropia paramagnética presente na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, transmitida tanto por mecanismo de contato de Fermi como por mecanismo de pseudocontato (BAUMANN et al., 1978; BERTINI; LUCHINAT, 1996).

Os complexos 2, 3 e 5 têm grupos funcionais na mesma posição (carbono 5) no ligante azanaftaleno. Levando-se em consideração apenas a simetria das moléculas, não

deveria haver diferenças tão pronunciadas nos deslocamentos químicos, não só dos hidrogênios α e α' dos próprios ligantes, mas, principalmente, daqueles dos acetatos em ponte. Mas o que é observado é a ação da aceitação e doação eletrônica, e, no caso do complexo 2, a extensão do sistema π do complexo, causada pela presença do grupo nitro no ligante 5-nitroisoquinolina, que desloca a densidade eletrônica para a periferia do complexo.

Para demonstrar o acoplamento eletrônico e a relação intrínseca de doação e aceitação de densidade eletrônica entre ligantes e o centro metálico, os valores de $\Delta\delta$ -- a diferença entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios no ligante livre e no ligante coordenado -, foram analisados, mostrando sua dependência com o pK_a dos ligantes livres e com parâmetro de Hammett, σ_p dos substituintes dos complexos 2, 3 e 5 (HANSCH; LEO; TAFT, 1991).

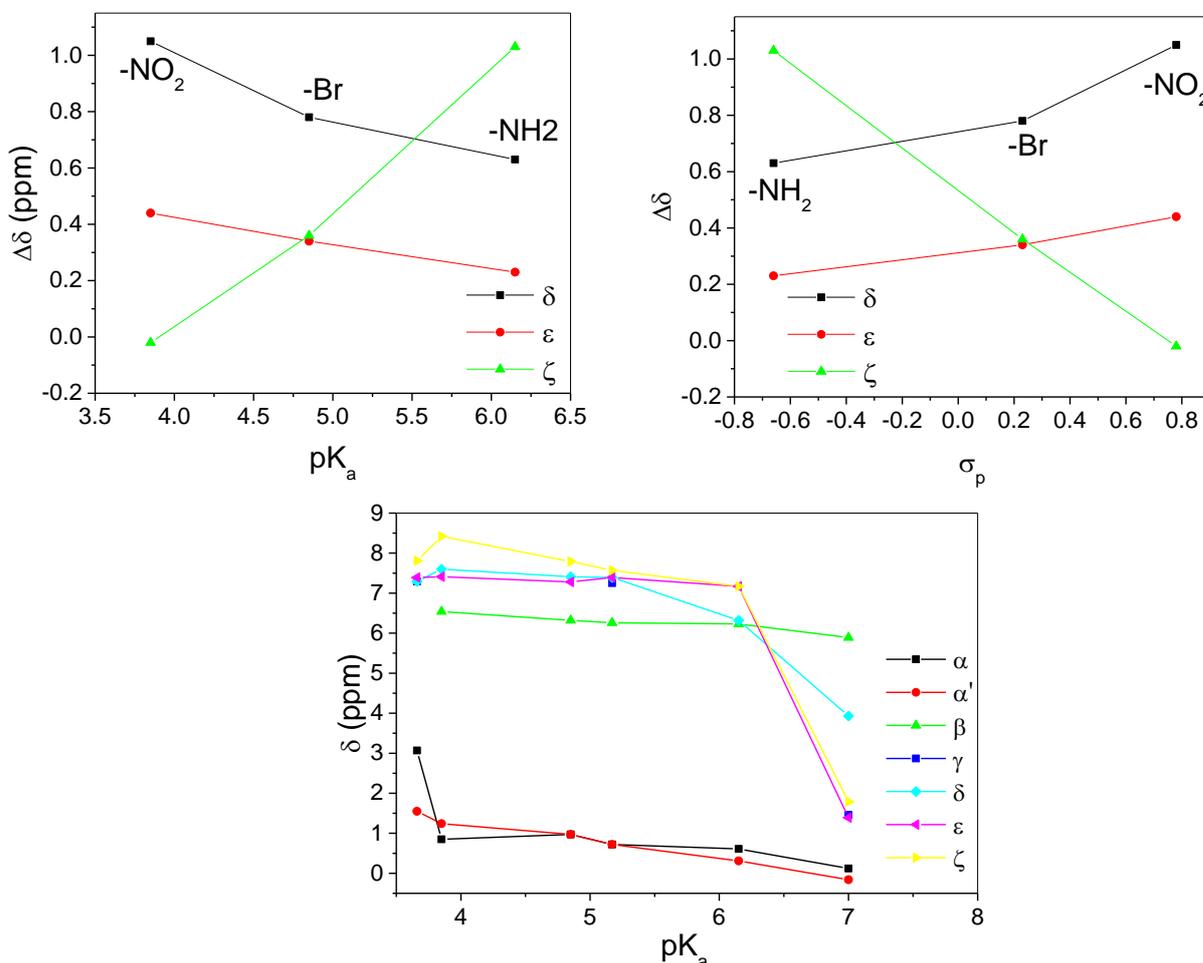
Os valores de $\Delta\delta$ permitem avaliar a propagação da anisotropia paramagnética da unidade $[Ru_3O]^+$ através do mecanismo de contato de Fermi, especialmente no segundo anel do ligante azanaftaleno, já que o efeito do mecanismo de pseudocontato diminui com o aumento da distância do centro paramagnético. Para verificar a intensidade com que a anisotropia paramagnética propaga-se, os complexos 2, 3 e 5 foram escolhidos, pois, como já dito anteriormente, eles são isoestruturais por possuírem os substituintes na mesma posição (carbono 5, posição γ)(Figura 43). Os valores dos deslocamentos químicos dos prótons α e α' do primeiro anel mudam significativamente, o que resulta em altos valores de $\Delta\delta$ (Tabela 11). No entanto, a magnitude do deslocamento dos sinais dos hidrogênio δ , ϵ , and ζ no segundo anel de azanaftaleno através do mecanismo de contato Fermi está ligada ao quanto a densidade eletrônica do núcleo é deslocalizada para a periferia. Por sua vez, a habilidade dos ligantes em deslocalizar a densidade eletrônica através do sistema- π é influenciada pelos substituintes e, conseqüentemente, pela acidez e basicidade dos ligantes, avaliada pelo pK_a .

Tabela 11. Variação dos deslocamentos químicos $\Delta\delta$ dos hidrogênios nos espectros $^1\text{H-RMN}$ dos ligantes livres

Hidrogênio	$\Delta\delta$ (ppm)					
	1, qui	2, 5-nitro	3, 5-briq*	4, iq	5, 5-amino	6, THIQ
α	6.28	7.9	7.69	7.76	7.79	8.28
α'	7.85	8.26	8.40	8.5	8.94	8.41
β	-	2.01	1.59	1.34	1.82	1.04
γ	0.76	-	-	0.65	-	1.37
δ	0.61	1.05	0.78	0.15	0.63	-2.14
ϵ	0.11	0.44	0.34	0.25	0.23	0.33
ζ	0.09	-0.02	0.36	0.19	1.03	1.02
NH_2	-	-	-	-	1.6	-

Fonte: Autora

Figura 43. Dependência dos valores de $\Delta\delta$ (ppm) dos hidrogênios dos ligantes 5-nitroisquinolina, 5-bromoisquinolina e 5-aminoisquinolina com o e parâmetro de Hammett σ_p , e dependência dos valores de deslocamento químico dos ligantes livres com o pK_a



Fonte: Autora

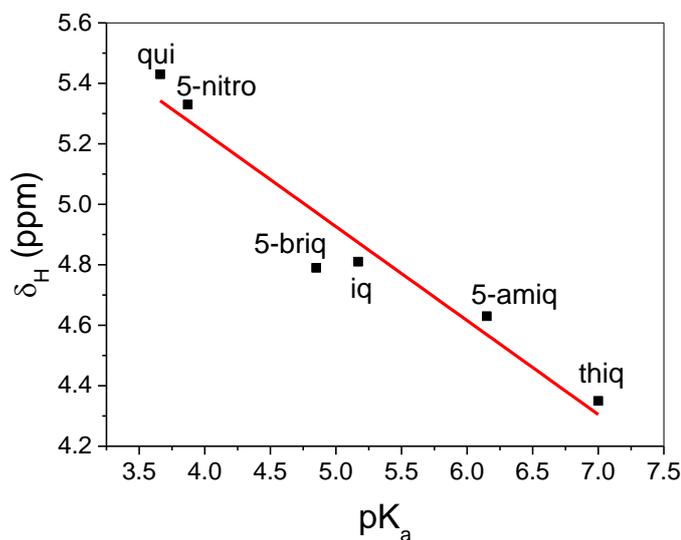
De acordo com a Figura 43 (superior), os hidrogênios δ e ϵ no complexo 2 têm os maiores valores de $\Delta\delta$ porque o ligante 5-nitroisquinolina é o mais ácido (π -receptor, pK_a 3,85) entre os ligantes avaliados. Por outro lado, os hidrogênios δ e ϵ do complexo 5 apresentam os menores valores de $\Delta\delta$, uma vez que este complexo contém o ligante mais básico 5-aminoisquinolina (σ -doador, pK_a 6,15). A mesma análise pode ser realizada sob o ponto de vista do parâmetro Hammett σ_p : quanto mais positivo é o valor de σ_p , mais retirador de elétrons é o grupo substituinte. Da mesma maneira que no caso anterior, o complexo 2 apresentou os maiores valores de $\Delta\delta$ porque o ligante 5-nitroisquinolina apresenta o substituinte de NO_2 . Não foi possível observar o mesmo

efeito para o hidrogênio ζ porque ele sofre mais os efeitos indutivos do substituinte na posição -para do anel.

Os dados mostraram que os hidrogênios da periferia dos complexos são mais susceptíveis às mudanças de descolamento químico através do mecanismo de contato de Fermi quando os ligantes são mais ácidos, ou seja, quanto maior for sua capacidade de retirar elétrons e estender a deslocalização eletrônica através do sistema π .

A relação entre os deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios das metilas das pontes acetato com o pK_a dos ligantes livres já foi reportada anteriormente (ALEXIOU; TOMA, 1997), e revisitada aqui, como mostra a Figura 44:

Figura 44. Dependência dos valores de δ (ppm) dos hidrogênios da ponte acetato com o pK_a dos ligantes livres para os complexos 1-6



Fonte: Autora

A dependência dos valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios das metilas dos acetatos em ponte com o pK_a dos azanaftalenos (Figura 44) também mostrou-se como uma boa ferramenta para a investigação da extensão da influência dos ligantes periféricos ao centro metálico.

Os acetatos, que estão diretamente ligados aos rutênios da unidade $[Ru_3O]^+$, têm seus hidrogênios blindados e deslocados para campo mais alto quando a densidade eletrônica do centro metálico é aumentada através da σ -doação dos ligantes mais básicos. Essa tendência, já relatada na literatura (ALEXIOU; TOMA, 1997; MOREIRA et al., 2016) mostra que quanto menor o pK_a dos ligantes periféricos, maiores serão os

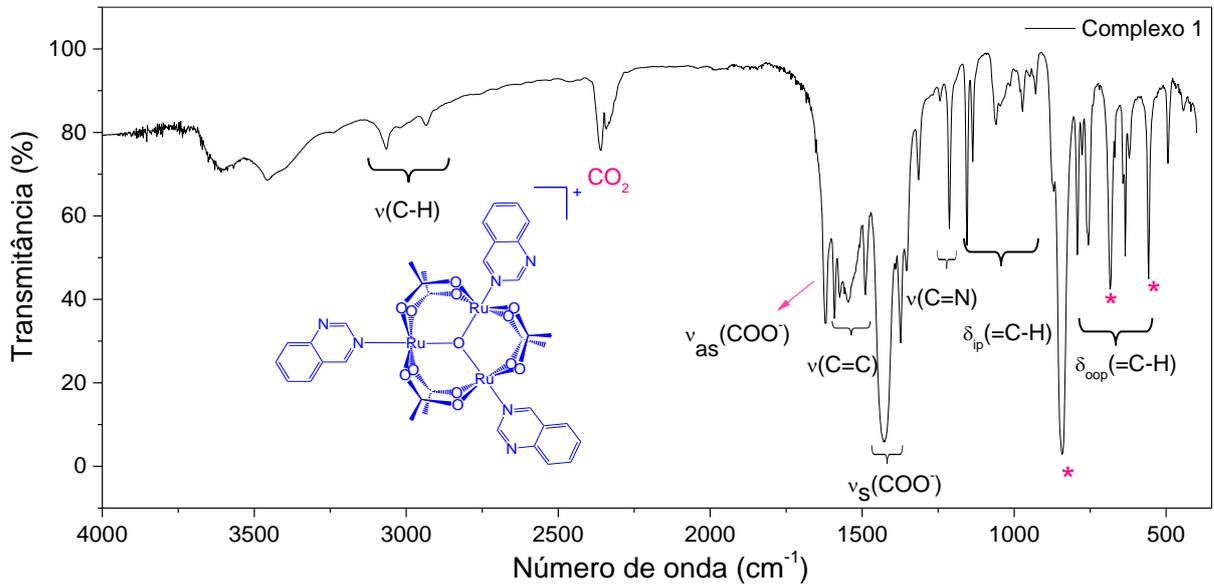
valores dos deslocamentos químicos de hidrogênios do CH₃. Além disso, a similaridade entre os deslocamentos dos hidrogênios da metila no complexo de isoquinolina (complexo 4, pK_a 5,17 (GOELTZ; BENSON; KUBIAK, 2010)) e dos hidrogênios da metila do complexo análogo com piridina (pK_a 5.28), [Ru₃O(CH₃COO)₆(py)₃]⁺, é impressionante: 4,81 e 4,82 ppm, respectivamente (ALEXIOU; TOMA, 1997). O fato do pK_a ditar a variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos mostrou que o comportamento da unidade [Ru₃O]⁺ depende muito da doação ou retirada da densidade eletrônica originada nos ligantes azanaftalenos, enquanto o comportamento dos ligantes é majoritariamente influenciado pelo acoplamento eletrônico com o centro metálico através do sistema π estendido, evidenciando a influência mútua entre eles.

6. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional é uma ferramenta fundamental na caracterização dos compostos inorgânicos e fornece informações valiosas sobre a estrutura dos complexos. As transições presentes nos espectros dos complexos 1-6 foram atribuídas através de comparação aos dados presentes na literatura (BAUMANN et al., 1978; ALEXIOU, 1993; NAKAMOTO, 1997; TOMA et al., 2001; NIKOLAOU, 2002; TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; PAVIA, 2009; TAUCHMAN et al., 2014), e aos espectros de infravermelho da série compostos trinucleares [M₃O]ⁿ descritas por Cannon e colaboradores (JOHNSON; POWELL; CANNON, 1981) e observando atentamente as peculiaridades de cada sistema.

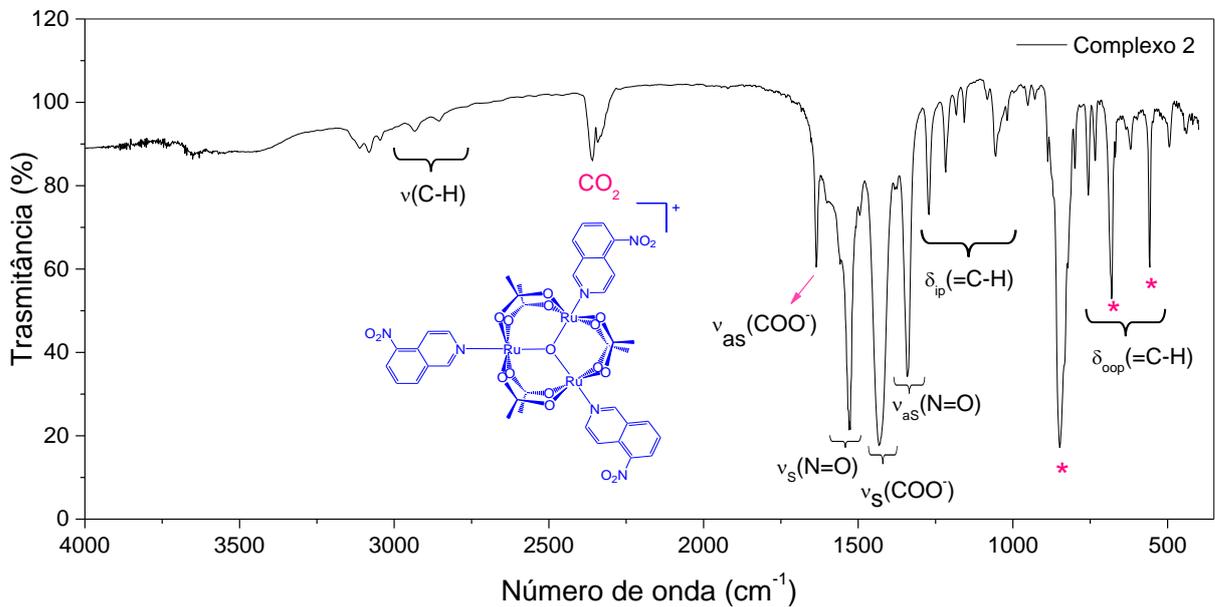
Considerou-se que todos os complexos da série têm simetria ideal D_{3h}, o que está de acordo com os dados da difração de raios-X do complexo 1, e portanto, o fato de os espectros dos complexos 1-6 serem muito parecidos não era inesperado. Mesmo no caso dos complexos 2 (5-nitro), 3 (5-briq), e 5 (5-amino) e 6 (thiq), que apresentam grupos substituintes ou, no caso do thiq, cujas diferenças estruturais são mais significativas, ainda é possível notar as semelhanças na constituição dos espectros (Figura 45). Como mostra a As principais bandas com origem nos ligantes periféricos são ν(C-H) aproximadamente 3000 cm⁻¹, ν(C=C) acima de 1600 cm⁻¹, δ_{ip}(=C-H), e δ_{oop}(=C-H) acima de 1400 cm⁻¹ (ip e oop significam *in plane*, no plano, e *out of plane*, fora do plano, respectivamente), a chamada região *fingerprint* (Tabela 12).

Figura 45. Espectro de infravermelho do complexo 1 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-



Fonte: Autora

Figura 46. Espectro de infravermelho do complexo 2 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-



Fonte: Autora

Figura 47. Espectro de infravermelho do complexo 3 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-

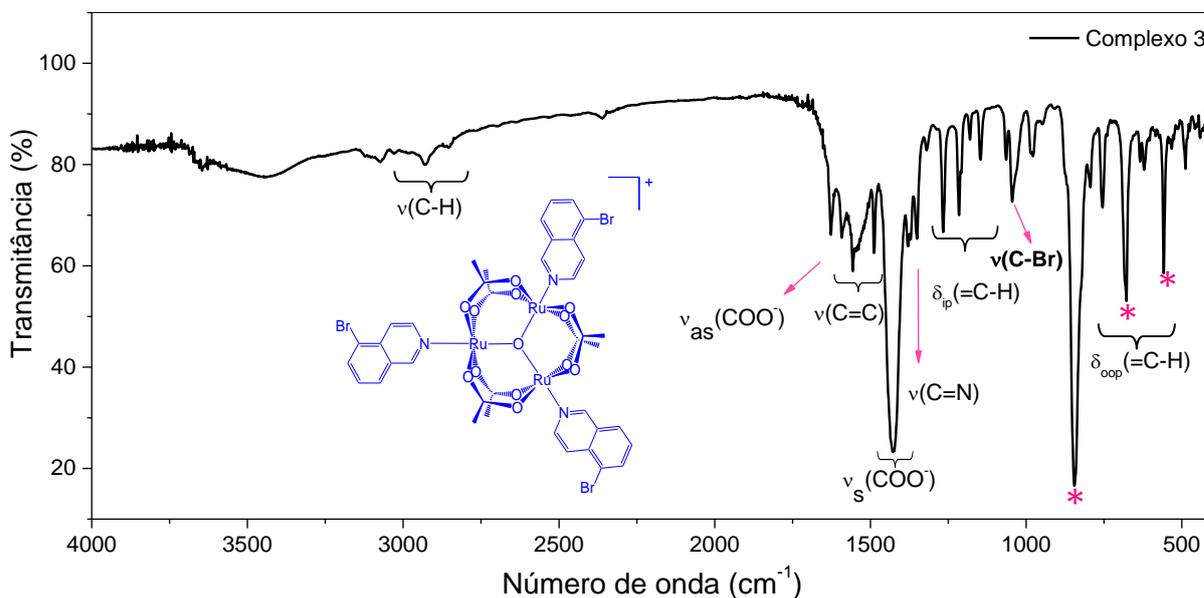


Figura 48. Espectro de infravermelho do complexo 4 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contraíon PF_6^-

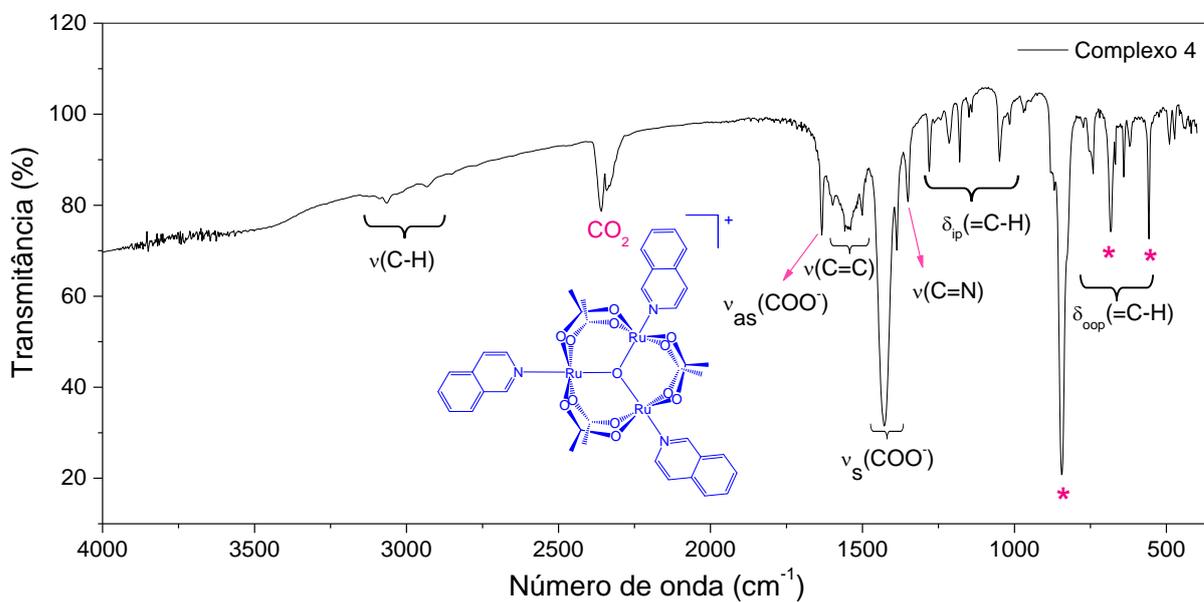
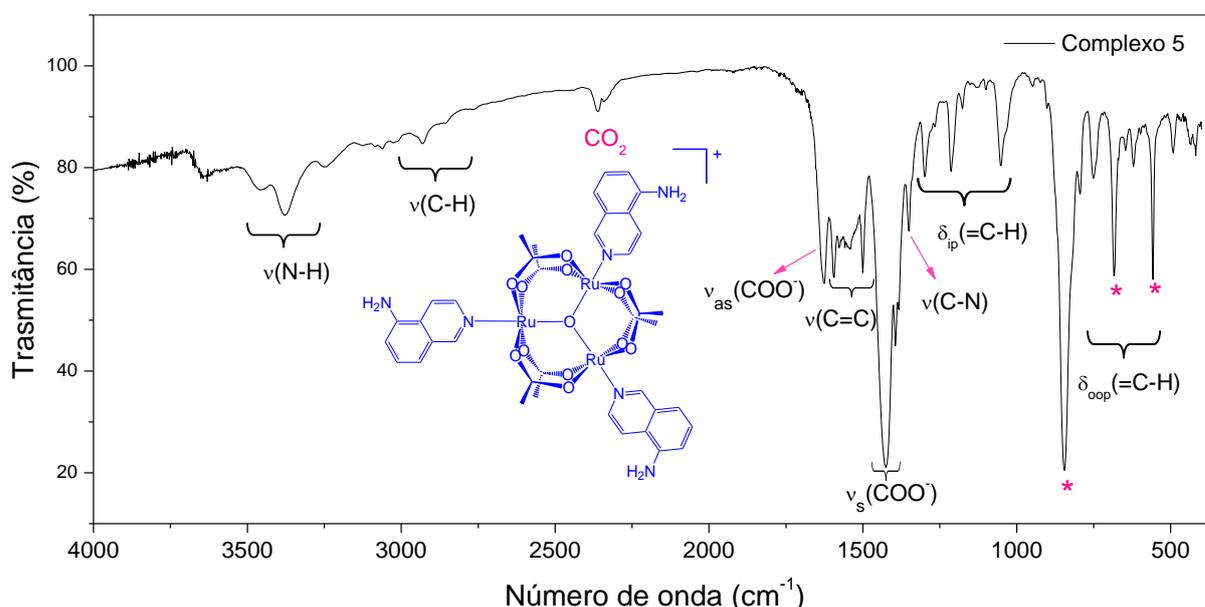
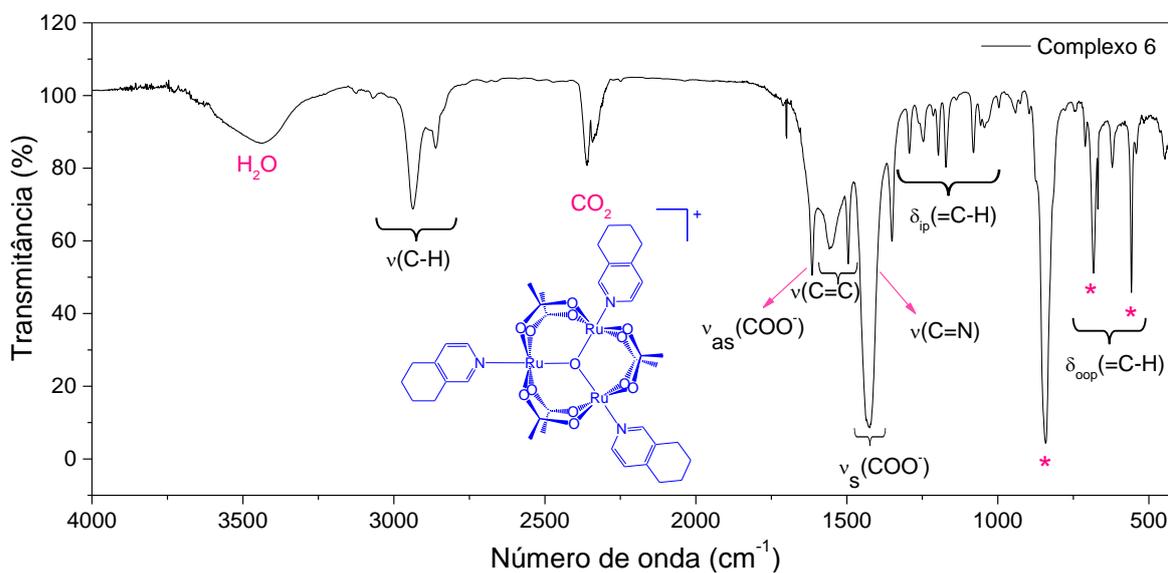


Figura 49. Espectro de infravermelho do complexo 5 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contração PF_6^-



Fonte: Autora

Figura 50. Espectro de infravermelho do complexo 6 obtido em pastilha de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} . As bandas marcadas pelo (*) referem-se às vibrações do contração PF_6^-



Fonte: Autora

Tabela 12. Atribuição das bandas dos espectros de infravermelho dos complexos 1-6

Complexo	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1, qui	1591m, 1556br e 1489m	v(C=C) anel aromático
	1620m	v _{as} (COO ⁻) acetatos em ponte
	1427s	v _s (COO) acetatos em ponte
	1216m	v(C=N) anel aromático fundido
	790w, 752w, 685w, 635w	δ _{oop} (=C-H) anel aromático
2, 5-nitro	1635m	v _{as} (COO ⁻) acetato em ponte
	1527s e 1341s	v _s (N=O) e v _{as} (N=O)
	1429s	v _s (COO) acetato em ponte
	1271w, 1217w, 1182w	δ _{ip} (=C-H) anel aromático
	756w, 680w	δ _{oop} (=C-H) anel aromático
3, 5-briq	1592m, 1556br e 1488m	v(C=C) anel aromático
	1628m	v _{as} (COO ⁻) acetato em ponte
	1427s	v(COO) acetato em ponte
	1266m, 1215m, 1146w	δ _{ip} (=C-H) anel aromático
	1044m	v(C-Br) ligado ao anel aromático
	758w, 620w, 487w	δ _{oop} (=C-H) anel aromático
4, iq	1598m, 1556br e 1501m	v(C=C) anel aromático
	1633m	v _{as} (COO ⁻) acetato em ponte
	1427s	v _s (COO) acetato em ponte
	1274w, 1215w, 1180w	δ _{ip} (=C-H) anel aromático
	741w, 683w, 639w	δ _{oop} (=C-H) anel aromático
5, 5-amiq	3458w, 3377w	v _s (N-H) e v _{as} (N-H)
	2937w	v(C-H)
	1594m, 1556br e 1500m	v(C=C) anel aromático
	1626m	v _{as} (COO ⁻) acetato em ponte
	1425s	v _s (COO ⁻) acetato em ponte
	1298w, 1213w, 1176w	δ _{ip} (=C-H) anel aromático
	751w, 621w, 491w	δ _{oop} (=C-H) anel aromático
6, thiq	2936m e 2862m	v(C-H) anel saturado
	1556br e 1496m	v(C=C) anel aromático
	1616m	v _{as} (COO ⁻) acetato em ponte
	1427s	v _s (COO ⁻) acetato em ponte
	1290w, 1244w, 1200w, 1170w, 1080w	δ _{ip} (=C-H) anel aromático
	708w, 620w	δ _{oop} (=C-H) anel aromático
	<i>m=medium, intensidade média; br=branched, ramificado; s=strong, muito intensa; w=weak, pouco intensa</i>	

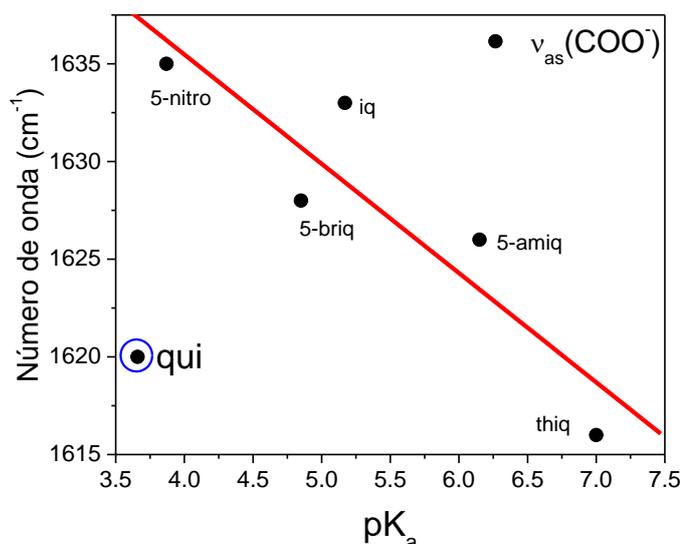
Fonte: Autora

Considerando-se a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6]$, as bandas dos estiramentos simétrico e assimétrico dos acetatos em ponte, ν_s e $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, aparecem próximas a 1427 cm^{-1} e 1625 cm^{-1} , respectivamente. A regularidade dos valores de $\nu_s(\text{COO}^-)$ é impressionante, enquanto que os valores de $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ variam consistentemente com o pK_a dos ligantes periféricos (Figura 51). Na verdade, a variação do $\nu_s(\text{COO}^-)$ foi menor que 4 cm^{-1} , o que não é exatamente uma surpresa, porque, no acetato livre, o modo vibracional do estiramento simétrico teve origem num termo espectroscópico A_1 (NAKAMOTO, 1997), que tem simetria esférica, advindo de orbitais s. Quando transpomos esse raciocínio para o caso dos complexos deste trabalho, fica mais claro porque o estiramento simétrico não é perturbado pela mudança na natureza dos ligantes: orbitais s não participam da formação do sistema π deslocalizado, não se “comunicando” com os ligantes periféricos. Em compensação, $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ é um modo vibracional que tem origem em um termo espectroscópico B_1 ; i.e., de orbitais p sob simetria σ . Orbitais com essa simetria participam ativamente na coordenação de acetatos à unidade metálica, e, portanto, eles estão sujeitos às variações na densidade eletrônica do núcleo $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Recentemente, esse comportamento foi explorado para o caso dos complexos assimétricos com ligante CO, com fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CO})(\text{L})]$, L = ligantes piridínicos (MOREIRA et al., 2016). Nesse caso, um comportamento “*push-pull*” determinou as características espectroscópicas dos complexos com CO, onde a doação de densidade eletrônica à unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, feita por ligantes mais básicos, aumentou a magnitude da retrodoação na direção π entre CO e o núcleo metálico. Isso fortaleceu a ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CO}$, diminuindo a densidade eletrônica do centro metálico. O comportamento “*push-pull*” foi refletido nos valores de $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, os quais aumentaram com o aumento do pK_a dos ligantes porque a retrodoação π mais intensa reduziu a densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$. Como consequência, as ligações $[\text{Ru}_3\text{O}]\text{-CH}_3\text{COO}$ foram enfraquecidas e as ligações no grupo COO^- foram fortalecidas.

Curiosamente, no caso da série dos compostos simétricos apresentada aqui, a variação na energia da banda de $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ foi pequena, mas diminuiu com o aumento da basicidade dos ligantes periféricos. Na ausência de um efeito como a retrodoação π do CO para compensar a doação dos ligantes básicos, efetivamente houve o aumento da

densidade eletrônica na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$. Isso, por sua vez, fortaleceu a ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]-\text{CH}_3\text{COO}$, enfraquecendo as ligações nos ligantes de acetato. Na contramão dessa tendência, está o complexo 1, cujo valor de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ não foi significativamente aumentado pela coordenação do ligante quinazolina, considerado o mais ácido da série. A Figura 51 ilustra essa tendência:

Figura 51. Dependência da energia do estiramento $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ com o pK_a dos ligantes azanaftalenos livres para os complexos 1-6

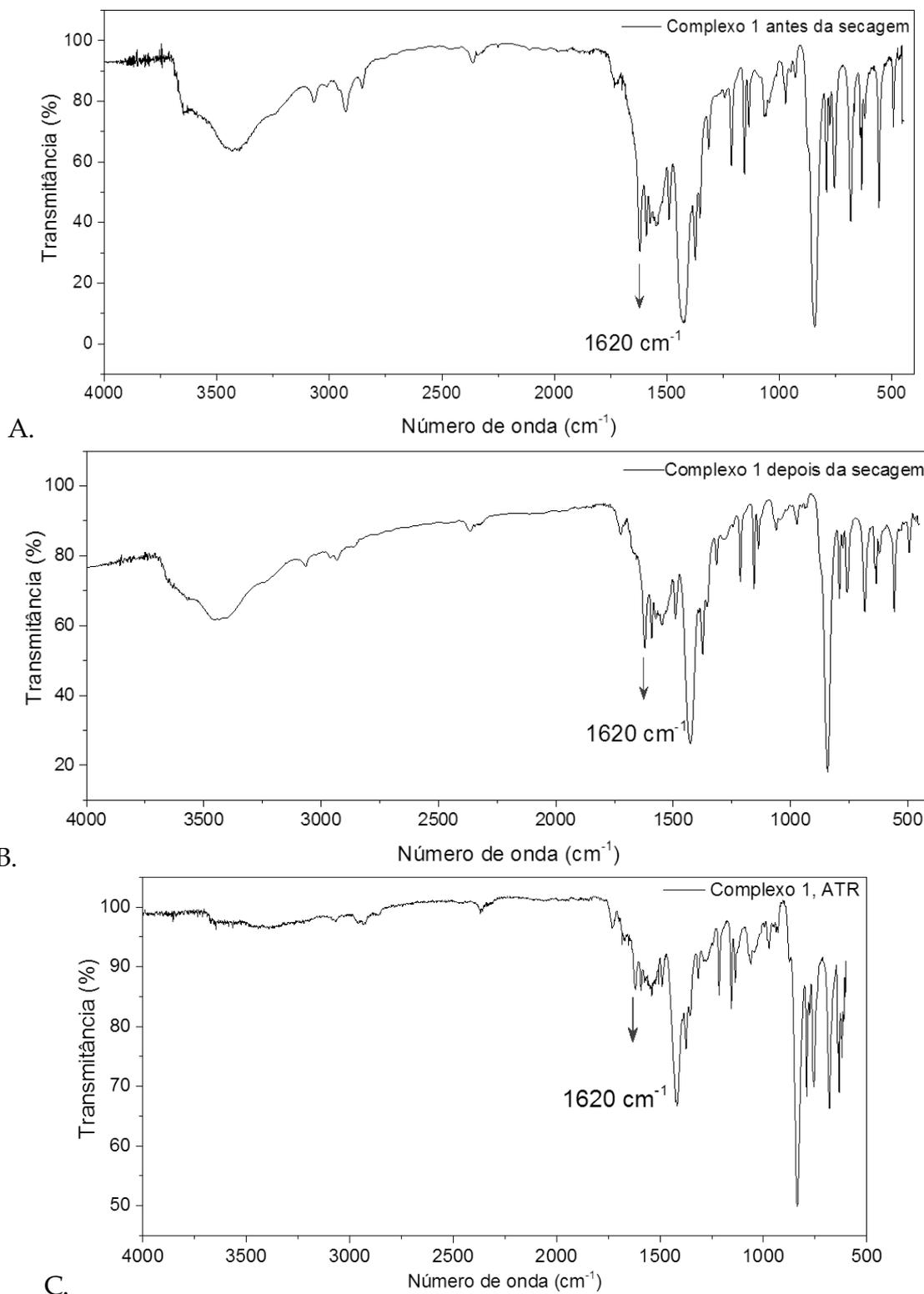


Fonte: Autora

Recentemente demonstrou-se que ligações de hidrogênio intermoleculares, envolvendo átomos de oxigênio dos acetatos, nos cristais de $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(4\text{-ampy})_2(\text{CO})]$, foram responsáveis pela diminuição da energia da banda de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ (MOREIRA et al., 2016). Por esse motivo, alguns experimentos preliminares foram conduzidos na tentativa de atribuir o abaixamento da energia do estiramento $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, porque, como pode ser visto na Figura 45, não só a energia do estiramento diminuiu, mas também verificou-se a presença de uma banda característica de $\nu(\text{N-H})$ na região de 3500 cm^{-1} . A primeira providência tomada foi refazer o espectro utilizando o complexo 1 obtido e purificado mais recentemente (Figura 52 A). Ainda verificando a presença da banda alargada em 3500 cm^{-1} , a próxima tentativa foi manter o composto 1 e o KBr secando em estufa a vácuo durante 12 horas e, depois, mantidos durante 48 horas num dessecador contendo sílica seca e pentóxido de fósforo (Figura 52 B). E, por fim, fazendo uso do composto que

passou pelo processo de secagem, o espectro de infravermelho foi obtido utilizando o acessório para ATR, que dispensa o uso de KBr (Figura 52 C).

Figura 52. Espectros de infravermelho do complexo 1 antes da secagem (A), depois da secagem (B) e ATR (C)



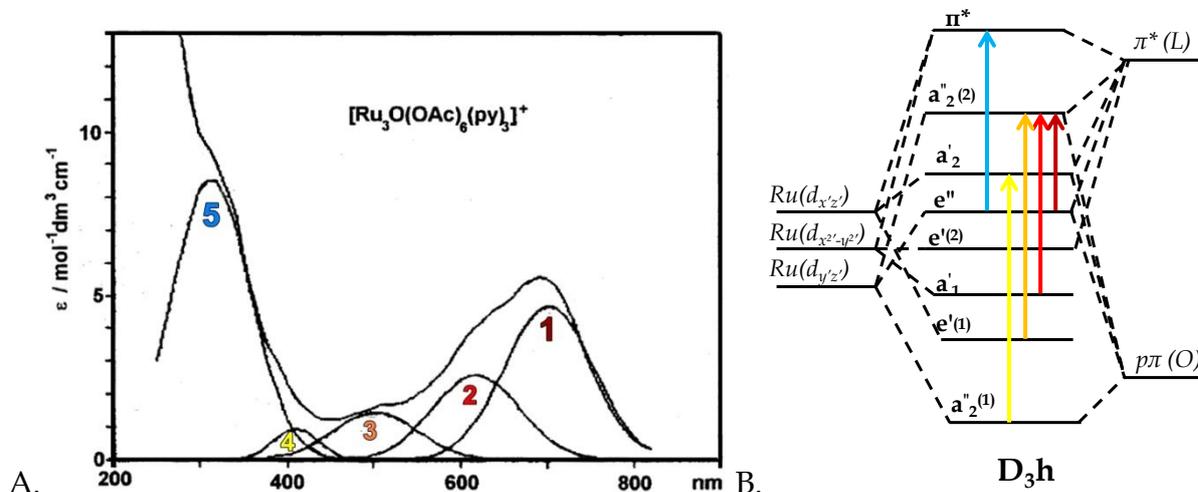
Fonte: Autora

Como foi visto, a banda em 3500 cm^{-1} , mesmo após o processo de secagem, continuou presente. A intensidade dessa banda foi menor no ATR, e isso pode estar relacionado não somente à menor concentração da amostra, mas também à ausência do processo de pastilhagem com KBr. É possível que, ao pastilhar as amostras, as ligações intermoleculares sejam favorecidas, mas o fato é que em todos os casos, o $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ continua aparecendo em 1620 cm^{-1} , o que dá força à hipótese de que existem sim ligações de hidrogênio intermoleculares ocorrendo no complexo 1.

7. Espectroscopia de absorção na região do UV-visível

Os espectros eletrônicos dos complexos 1-6 são consistentes com os espectros observados para os complexos trinucleares simétricos, $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$, sob simetria ideal D_{3h} (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988; CUNHA, 1989; ALEXIOU, 1993; TOMA et al., 2001), como exemplifica a Figura 53:

Figura 53. A. Espectro de absorção na região UV-vis do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{OAc})_6(\text{py})_3]^+$, apresentando a deconvolução das bandas; B. diagrama de orbitais moleculares para complexos sob simetria D_{3h} , mostrando as transições eletrônicas referentes ao espectro

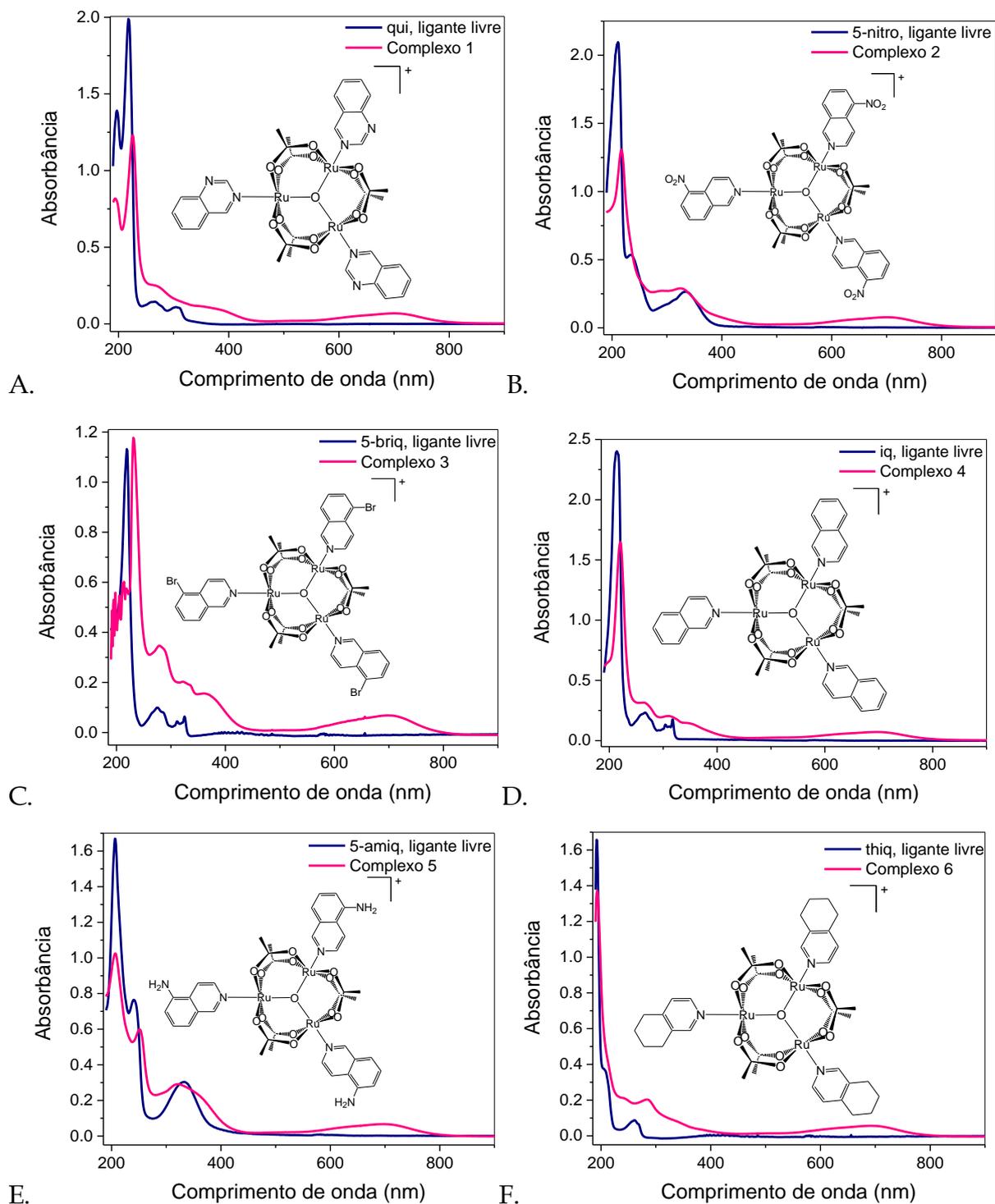


Fonte: Adaptado de (ALEXIOU, 1993)

Os espectros dos complexos 1-6 (Figura 54) mostram uma banda alargada característica na região de 700 nm , atribuída à transição intracuster (IC). Na região de 200 nm , existe a presença de bandas muito intensas que compreendem as transições $\pi-\pi^*$ centradas nos ligantes azanaftalenos, chamadas de IL (intra-ligante). Por fim, na região de $240-400$, observa-se bandas sobrepostas. Essa sobreposição foi causada pela intensa

influência dos ligantes azanaftalenos, que também têm transições nessa região, e essa é a principal diferença dessa série para aquela com ligantes piridínicos. As bandas sobrepostas compreendem também as bandas das transições de transferência de carga (TCCL), que, muitas vezes não são completamente distinguíveis, o que tornou sua atribuição (Tabela 13) muito difícil, fazendo com que a comparação entre energia desta transição e pK_a dos ligantes terminais não pudesse ser feita.

Figura 54. A-F.



Fonte: Autora

Tabela 13. Atribuições tentativas das transições presentes nos espectros de absorção na região do UV-vis dos complexos 1-6

$\lambda_{\text{máx}} \text{ (nm)} (\log \epsilon)^*$						
	(1) qui	(2) 5-nitro	(3) 5-briq ^a	(4) iq	(5) 5-amiq	(6) thiq
IL^b	226 (5,08)	217 (5,08)	230 (5,02)		206 (4,98)	240 (4,33)
	264 (4,41)	324 (4,42)	279 (4,44)	220 (5,21)	251 (4,77)	283 (4,31)
IL e TCCL^d	350 <i>sh</i> ^c	286 (4,37)	321 (4,20)	265 (4,53)	319 (4,49)	340 <i>sh</i>
			361 (4,08)	309 (4,30)		
				345 <i>sh</i>		
IC^e	701 (3,84)	700 (3,88)	697 (3,84)	698 (3,83)	696 (3,86)	693 (3,82)
pK_a						
	3,66	3,85	4,85	5,17	6,15	7,00
(*) ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹); (a)Os espectros do complexo 3 foram obtidos em diclorometano; (b)IL: Intracluster; (c) <i>sh</i> : shoulder, ombro; (d)TCCL: Transferência de Carga do Cluster para o Ligante; (e) IC: Intracluster						

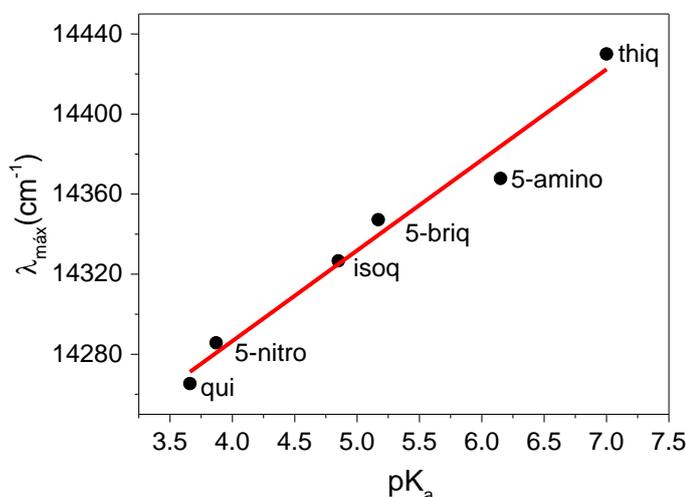
Fonte: Autora

A energia das bandas TCCL dependem fortemente da natureza dos ligantes periféricos, porque esta transição eletrônica ocorre entre os orbitais d_{π} do metal e π^* do ligante (Figura 53) (COTTON; NORMAN, 1972; BAUMANN et al., 1978). Com relação a essa dependência, é possível dizer que ligantes mais básicos (maior pK_a) aumentam a densidade eletrônica nos níveis $d\pi$ do metal através de doação eletrônica da na direção σ . Neste ponto, vale mencionar que resultados de cálculos teóricos obtidos a partir de DFT para os complexos 1-6 (POSSATO et al., 2017, submetido) reproduzem apenas parcialmente o diagrama de orbitais moleculares qualitativo para complexos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^n$ sob simetria D_{3h} proposto por Cotton e Norman em 1972, utilizado neste trabalho e ainda amplamente aceito na literatura (COTTON; NORMAN, 1972). Nesse diagrama proposto em 1972, a contribuição dos acetatos não é levada em consideração, mas, como já mostrado através dos resultados de RMN e espectroscopia vibracional, a comunicação entre o centro metálico e as pontes existe e deve ser levada em conta.

Um resultado experimental importante, e que está de acordo com a discussão anterior, é a aparente contradição originada da interpretação da dependência das transições IC com a natureza do ligante. Com base no diagrama de orbitais moleculares

(Figura 53), essas transições envolvem predominantemente orbitais com caráter metálico ($d\pi$), e o HOMO da transição IC tem a mesma origem que o da transição de transferência de carga (o orbital $d_{y'z'}$) (BAUMANN et al., 1979). Desta maneira, esperava-se que a energia da transição IC diminuísse com o aumento da densidade eletrônica através da doação σ , assim como é observado para a transferência de carga, mas, quanto maior o pK_a do ligante, maior é a energia da transição IC, variando aproximadamente 165 cm^{-1} dentro da série (Figura 55).

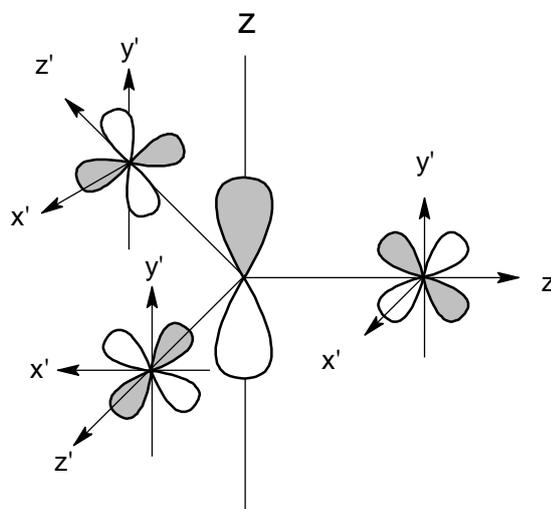
Figura 55. Variação da energia da transição IC dos complexos 1-6 com o pK_a dos ligantes azanaftalenos



Fonte: Autora

A σ -doação dos ligantes azanaftalenos desestabilizou mais intensamente os orbitais d_{z^2} do rutênio, que estão envolvidos no arcabouço σ com os ligantes periféricos e não contribuem para o sistema π acima considerado, mas, *todos os orbitais com contribuição na direção z foram, possivelmente, afetados*. Considerando o diagrama de orbitais moleculares proposto em 1972 (Figura 53), a componente 1 é quem define o λ_{\max} da transição IC, e ela é uma transição entre os orbitais $e'' \rightarrow a_2''$ antiligante, sendo que ambos têm origem na combinação entre os orbitais $d_{y'z'}$ do metal e p_z do oxigênio (Figura 56). Desta forma, a tendência observada para a banda IC demonstrou que a desestabilização do LUMO, o orbital a_2'' antiligante, compensou a perturbação dos orbitais ocupados devido à σ -doação, aumentando a energia dessa transição. O mesmo comportamento pode ser observado para a série de complexos simétricos com ligantes piridínicos (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988).

Figura 56. Combinação entre os orbitais $d_{y'z'}$ do metal e p_z do oxigênio, dando origem aos orbitais a_2'' e a_2'' antiligante e e''



Fonte: Adaptado de (NIKOLAOU, 2002)

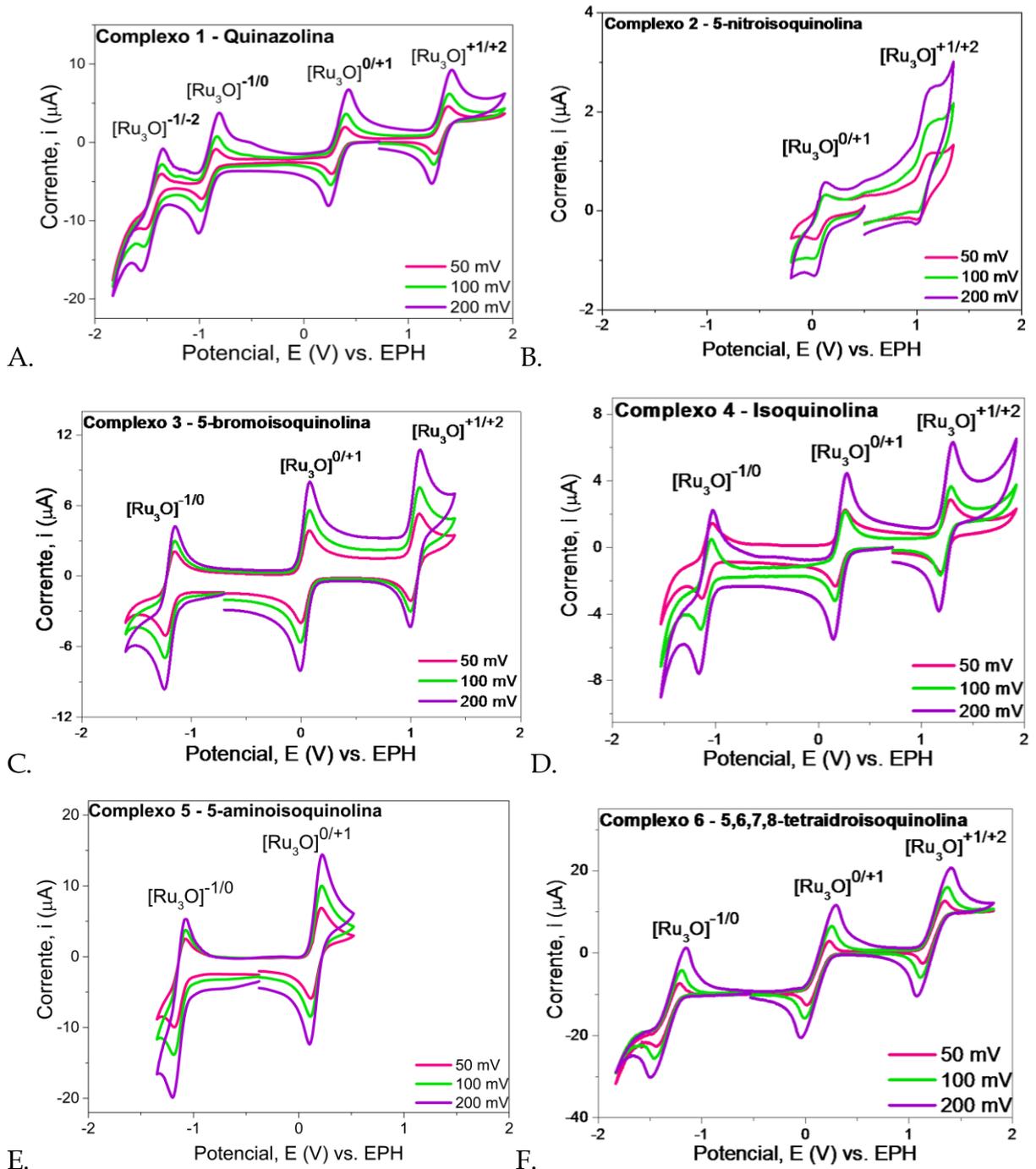
Dado que a LUMO da transição TCCL não tem componente em z , o fato de o comportamento frente à mudança na natureza do ligante ser diferente das transições IC passa a fazer mais sentido.

8. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica importante para o estudo do comportamento eletroquímico de complexos trinucleares de rutênio. Tipicamente, complexos trinucleares simétricos com ligantes N-heterocíclicos (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988; TOMA et al., 2001) apresentam quatro processos reversíveis dentro da janela de trabalho de solventes orgânicos comuns, como acetonitrila, atribuídos aos processos redox $Ru^{III}Ru^{II}Ru^{II}/Ru^{III}Ru^{III}Ru^{II}/Ru^{III}Ru^{III}Ru^{III}/Ru^{IV}Ru^{III}Ru^{III}/Ru^{IV}Ru^{IV}Ru^{III}$. Além disso, os valores de $E_{1/2}$ desses processos variam de acordo com as propriedades π -receptoras e σ -doadoras dos ligantes periféricos (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988). Neste trabalho, empregou-se o solvente benzonitrila devido à baixa solubilidade dos complexos 1-6 em acetonitrila na presença do eletrólito suporte, mas essa mudança não afetou tanto a extensão da janela de trabalho (BARD; FAULKNER, 2000). A Figura 57 apresenta os voltamogramas dos complexos 1-6. Para os complexos 2 e 5, foi possível registrar apenas dois processos redox, pois ambos apresentam eletropolimerização e/ou reações acopladas durante os experimentos. A Tabela 14 traz os valores de $E_{1/2}$ para os

complexos 1-6, e a Figura 58 ilustra a dependência dos valores de $E_{1/2}$ com o pK_a dos ligantes periféricos:

Figura 57. A-F. Voltamogramas cíclicos dos complexos 1-6, registrados em benzonitrila. $[TBABF_4] = 0,1\text{ M}$, $[\text{complexos 1, 3, 4, 5}] = 1\text{ mM}$, $[\text{complexo 2}] = 0,1\text{ mM}$, $[\text{complexo 6}] = 10\text{ mM}$



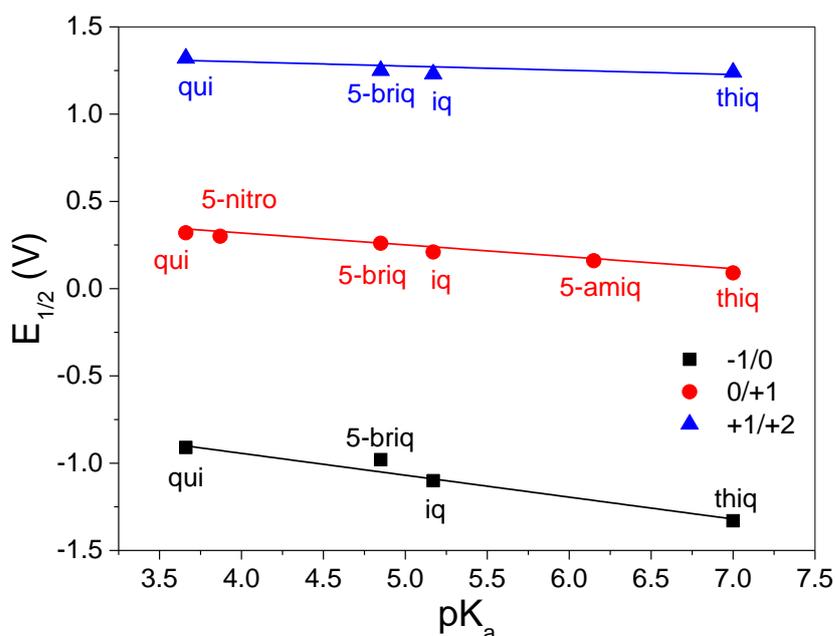
Fonte: Autora

Tabela 14. Valores de $E_{1/2}$ obtidos para os complexos 1-6

$E_{1/2}$ (V vs. EPH*)						
	(1) qui	(2) 5-nitro	(3) 5-briq	(4) iq	(5) 5-amino	(6) thiq
-2/-1	-1,43	-	-	-	-	-
-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
pK_a						
	3,66	3,85	4,85	5,17	6,15	7,00

(*)EPH=Eletrodo Padrão de Hidrogênio

Fonte: Autora

 Figura 58. Dependência dos valores de $E_{1/2}$ com o pK_a dos ligantes periféricos


Fonte: Autora

Normalmente, os voltamogramas dos complexos simétricos são analisados em termos da separação regular dos picos entre os processos -1/0, 0/+1, e +1/+2. Isso é resultado da intensa deslocalização eletrônica dentro da unidade $[Ru_3O]^n$, o que, qualitativamente, está de acordo com o um composto de classe III segundo a classificação de Robin-Day (ROBIN; DAY, 1968; ZANELLO, 2003). Isso não é estritamente observado no caso de análogos de CO e NO. No caso do complexo com CO, a separação pico a pico entre processos -1/0 e 0/+1 é maior que a separação entre os

processos 0/+1 e +1/+2, uma vez que os complexos reduzidos, que têm carga zero, são as espécies mais estáveis, o que é resultado da localização da valência e do efeito de retrodoação na direção π entre o ligante CO e o íon Ru^{2+} (MOREIRA et al., 2016). Para os nitrosilo complexos trinucleares, a separação dos picos dos processos 0/+1 e +1/+2 foi maior do que a separação dos picos dos processos -1/0 e 0/+1. Isso mostrou que a espécie mais estável é a forma $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1}$, o que não é inesperado, porque a principal interação que mantém a ligação $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1}-\text{NO}^0$ é o emparelhamento dos elétrons desemparelhados tanto na unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1}$ quanto no NO^0 (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015).

Considerando os dados apresentados na Tabela 14 e na Figura 58, os valores de $E_{1/2}$ dos complexos 1-6 diminuíram à medida em que pK_a dos ligantes azanaftalenos aumentou. Além disso, a separação dos picos dos processos -1/0, 0/+1 e +1/+2 não é tão regular, sendo aproximadamente constantes a 1V para os processos +1/+2 e 0/+1 e variando de 1,23 a 1,42 V para os processos 0/+1 e -1/0.

O mesmo comportamento experimental foi observado para uma série de complexos simétricos com ligantes piridínicos (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988). Recentemente, Nikolaou e colaboradores (MOREIRA et al., 2016) também verificaram esse comportamento para a série de complexos com CO: quanto maior a basicidade (maior o pK_a) do ligante, mais fácil é a oxidação do centro metálico, ou seja, os ligantes periféricos doam densidade eletrônica para a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^n$ e compensam o aumento do estado de oxidação. Por outro lado, os ligantes com menor pK_a - mais ácidos - estabilizaram as espécies com menores estados de oxidação. Desse modo, o complexo 1, que tem o ligante mais π -receptor dentro da série, foi o único complexo a alcançar o processo redox -2/-1 dentro da janela de trabalho experimental.

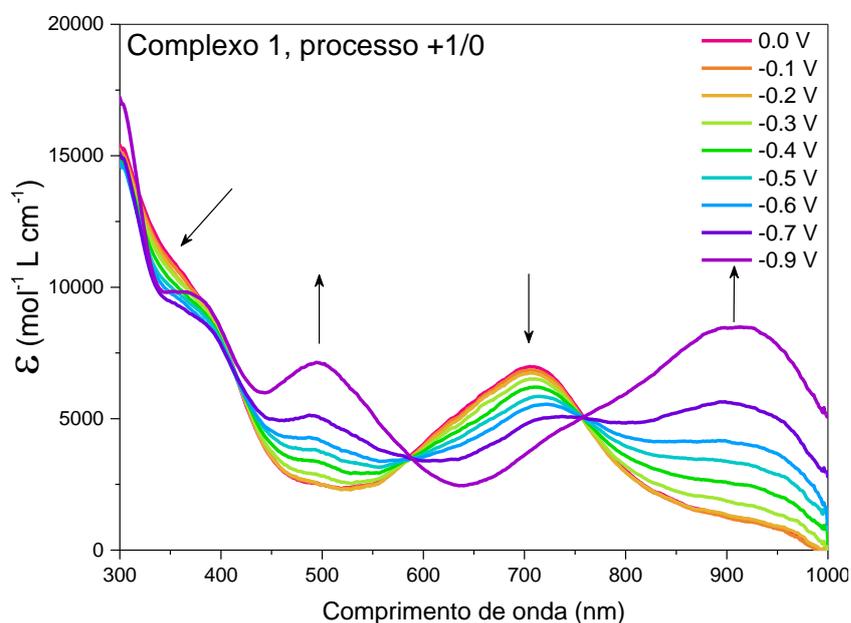
Apesar do fato de os valores de $E_{1/2}$ dos complexos 1-6 e de análogos piridínicos dependerem, de modo muito semelhante, do pK_a de ligantes periféricos (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988), é impressionante como os valores de $E_{1/2}$ do complexo 4 (isoquinolina, Tabela 14) assemelham-se aos valores de $E_{1/2}$ do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{py})_3]\text{PF}_6$ (-1,08; 0,19, e 1,21V vs EPH para os processos -1/0, 0/+1, e +1/+2, respectivamente (BAUMANN et al., 1978; TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988)).

Os valores de pK_a para isoquinolina e piridina são 5,17 e 5,28, respectivamente sendo similares no quesito basicidade. A diferença fundamental entre esses ligantes é a maior habilidade do azanaftaleno deslocalizar a densidade eletrônica através de seu sistema π -conjugado estendido. Essa habilidade causa impacto sobre as taxas nas reações de autotroca para o par 0/-1 (GOELTZ; HANSON; KUBIAK, 2009; GOELTZ; BENSON; KUBIAK, 2010), sem mudar os perfis dos voltamogramas no caso de complexos de CO. Nossos resultados reforçaram essas descobertas, demonstrando que a σ -doação e π -recepção influenciaram muito mais os valores de $E_{1/2}$, e que a habilidade dos ligantes periféricos de deslocalizar a densidade eletrônica à periferia do complexo pouco afetou tais valores, mas, como será visto na próxima seção, essa característica foi fundamental no perfil espectroeletróquímico dos complexos.

9. Espectroeletróquímica

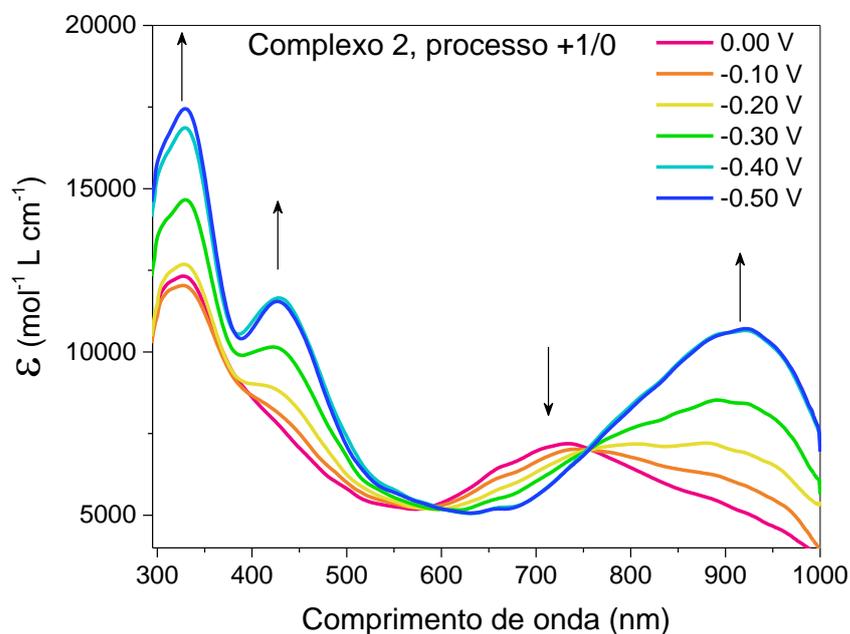
Os experimentos de espectroeletróquímica foram feitos, a princípio, com o objetivo de, a partir da variação espectral com o processo eletroquímico, verificar quais bandas sofrem a influência do núcleo metálico, ou seja, quais são bandas das transições de transferência de carga. Infelizmente, metade dos complexos não é solúvel em acetonitrila com o eletrólito suporte, sendo que a única alternativa continua sendo a benzonitrila, que apresenta o *cut-off* na região de 300 nm, tornando inviável a verificação das bandas que ocorrem em comprimentos de onda menores que esse. De qualquer forma, foi possível registrar os espectros dos complexos 4 e 5 em acetonitrila, e verificar a influência do estado de oxidação da unidade $[Ru_3O]^+$ em todas as transições do espectro. O processo registrado para a maioria dos complexos foi o $[Ru_3O]^{+1/0}$, mas para o complexo 3, foi possível verificar o processo $[Ru_3O]^{+1/+2}$, e para o complexo 5 em acetonitrila, o processo $[Ru_3O]^{0/-1}$. As figuras abaixo mostram a variação espectral em função da aplicação de potencial nos complexos 1-6:

Figura 59. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 1, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



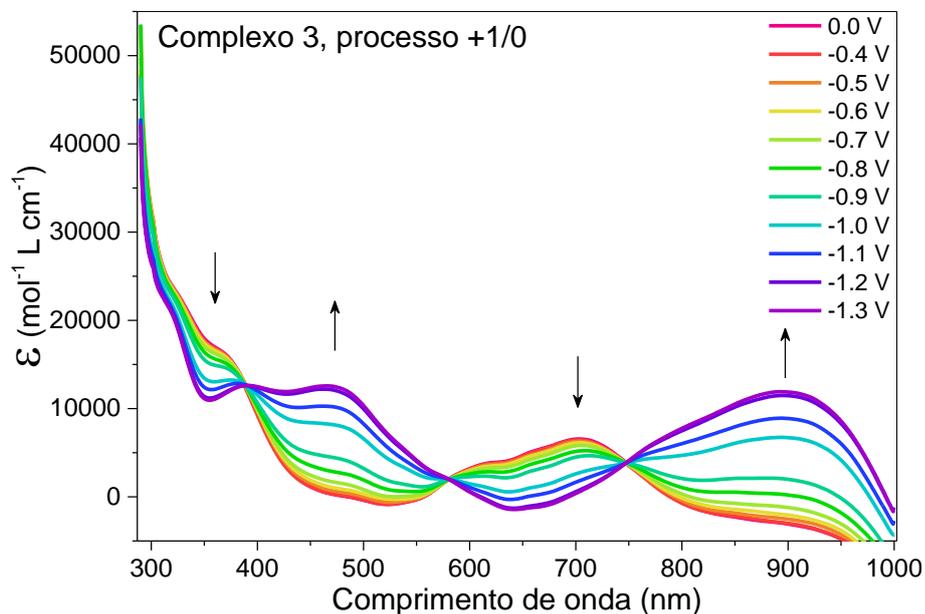
Fonte: Autora

Figura 60. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 2, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



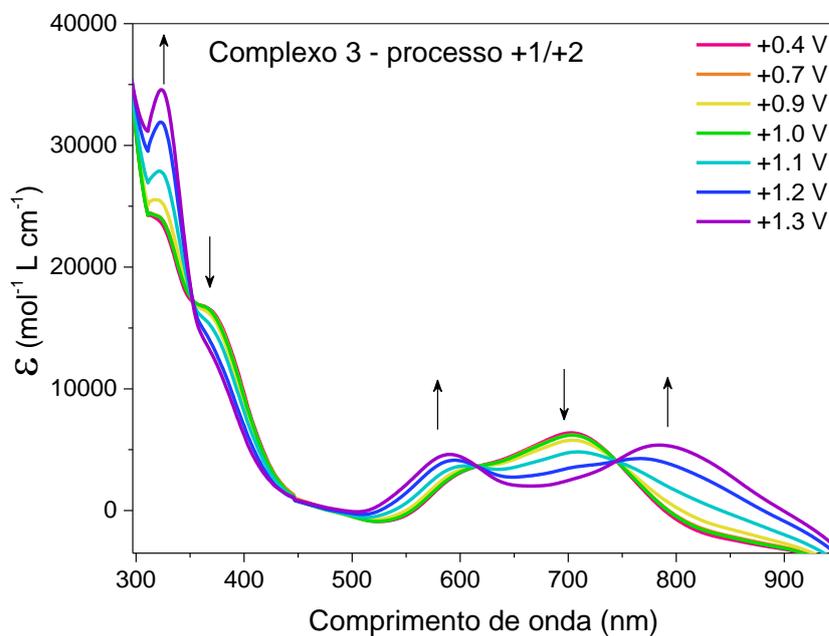
Fonte: Autora

Figura 61. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 3, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



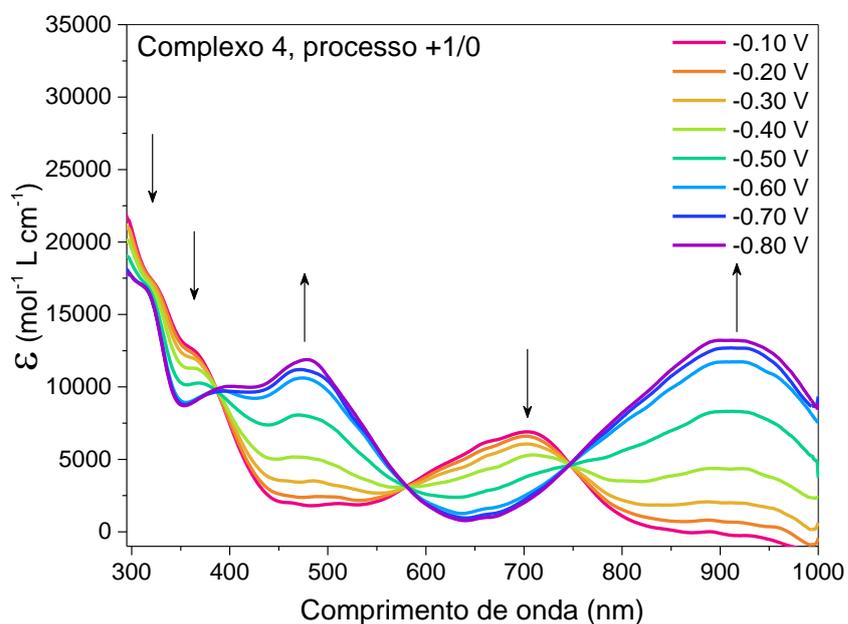
Fonte: Autora

Figura 62. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 3, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo oxidativo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/+2}$



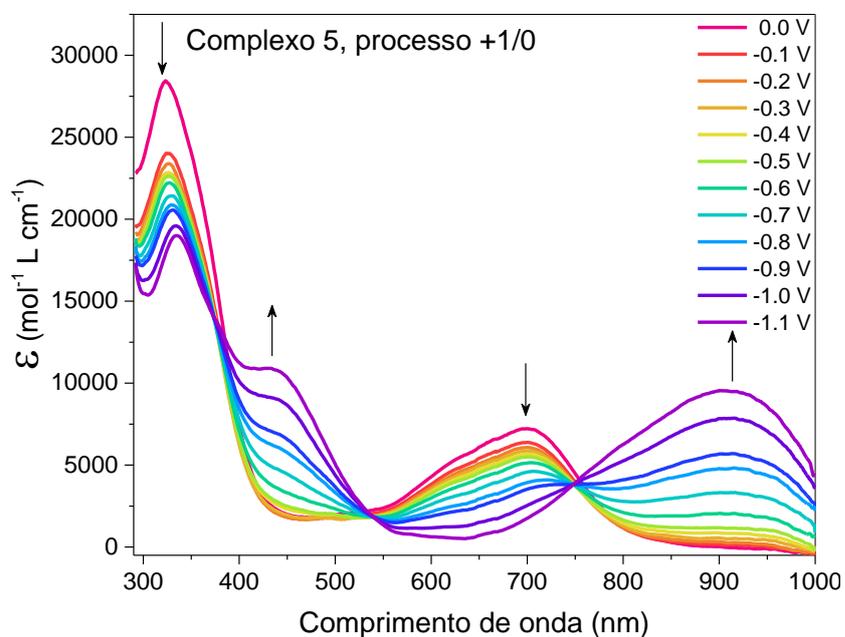
Fonte: Autora

Figura 63. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 4, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



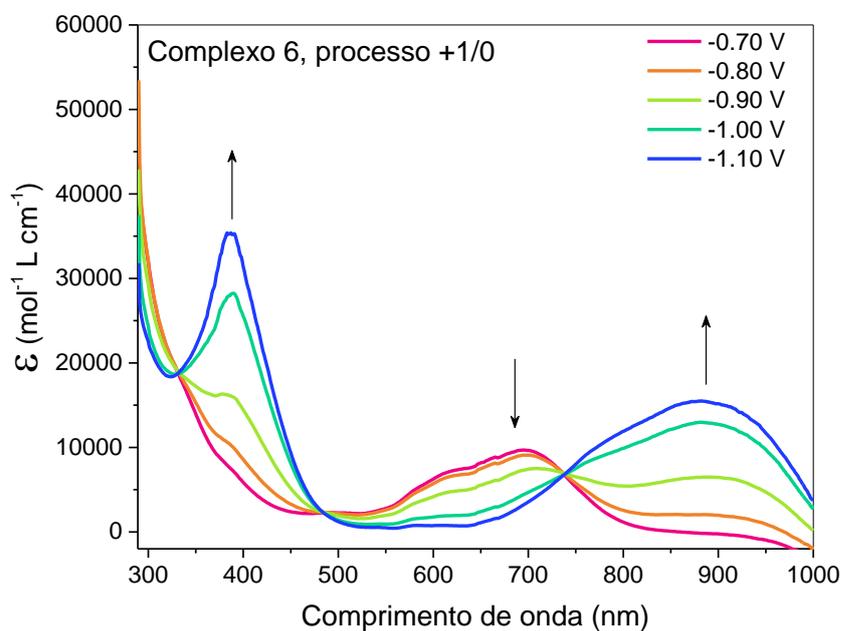
Fonte: Autora

Figura 64. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 5, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



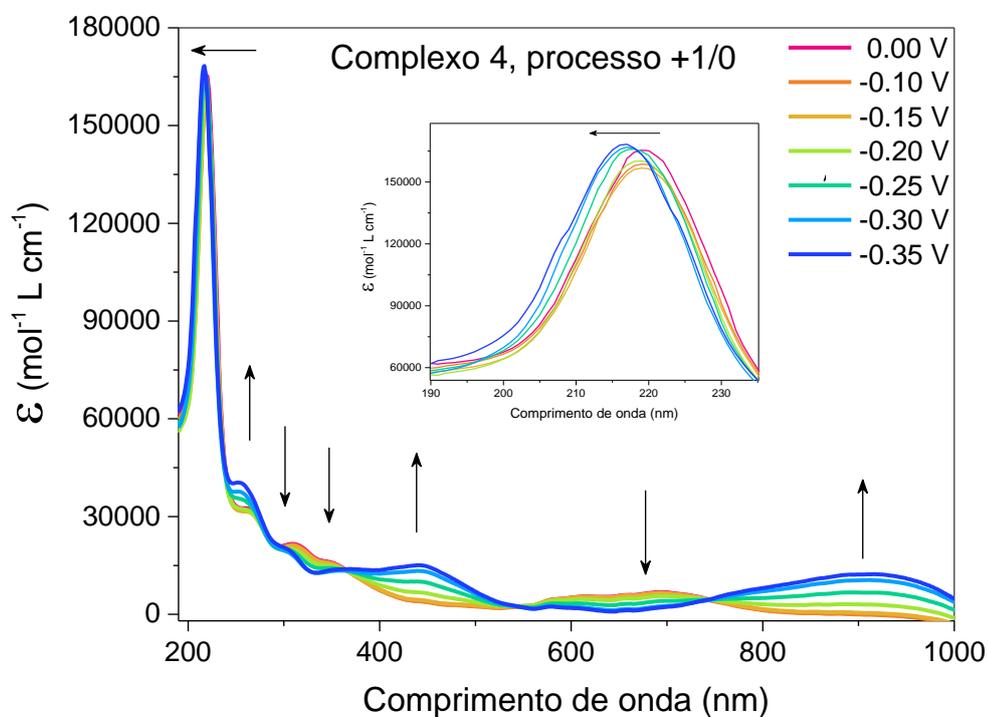
Fonte: Autora

Figura 65. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 6, obtidos em benzonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



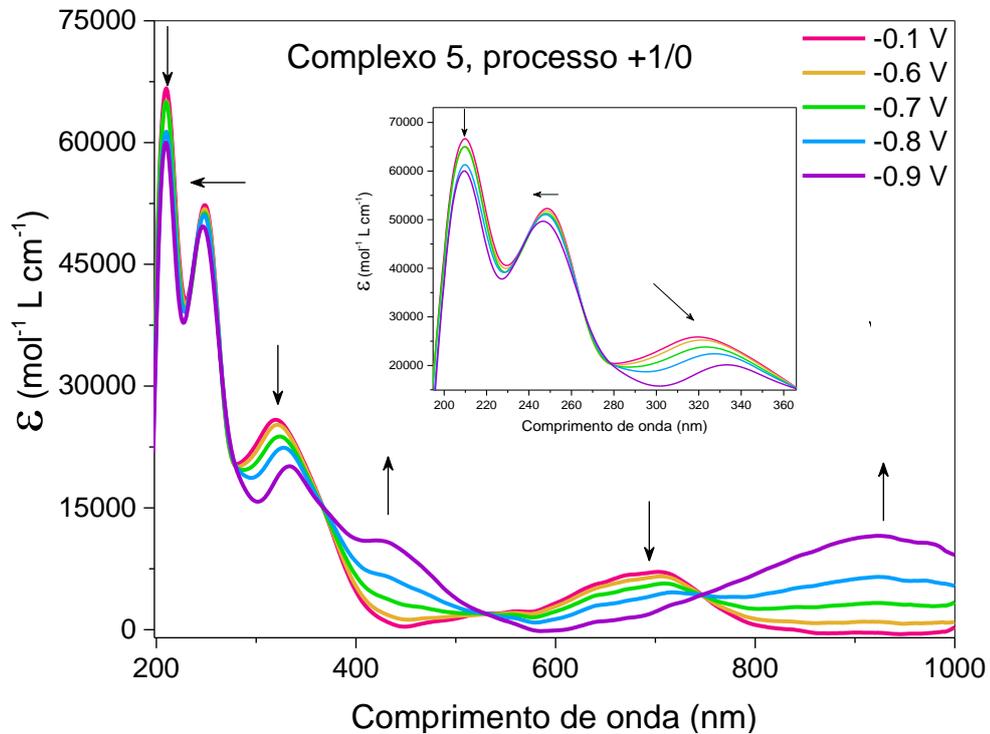
Fonte: Autora

Figura 66. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 4, obtidos em acetonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



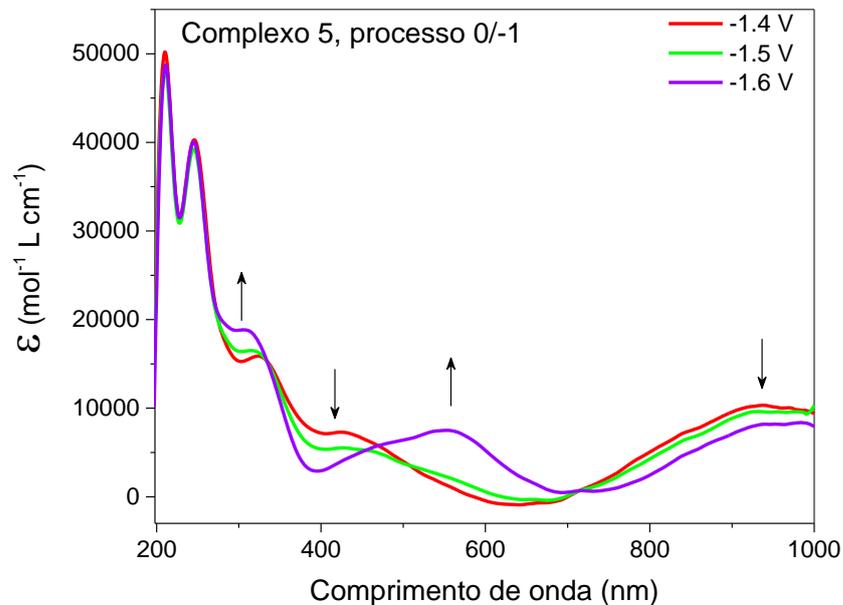
Fonte: Autora

Figura 67. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 5, obtidos em acetonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1/0}$



Fonte: Autora

Figura 68. Espectros de absorção na região do UV-vis-NIR do complexo 5, obtidos em acetonitrila e realizados em diferentes potenciais, mostrando o processo redutivo $[\text{Ru}_3\text{O}]^{0/-1}$



Fonte: Autora

O processo mais comumente registrado foi o $[\text{Ru}_3\text{O}]^{+1}/[\text{Ru}_3\text{O}]^0$ devido à janela de trabalho do eletrodo de ouro, problemas com precipitação durante as análises, e, como já

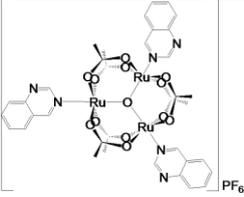
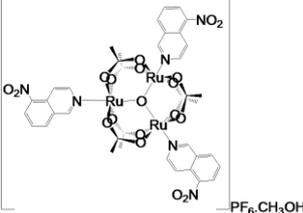
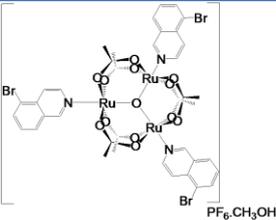
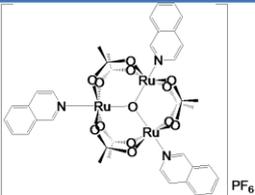
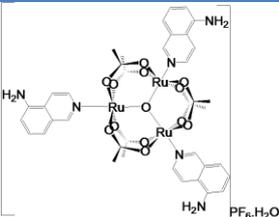
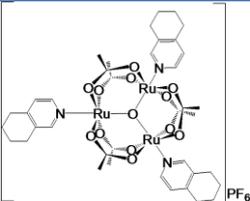
discutido na seção de voltametria cíclica, à possibilidade de eletropolimerização e reações acopladas de alguns complexos. Apesar disso, o comportamento dos complexos 1-6, em benzonitrila, está de acordo com o descrito para essa classe de compostos (NIKOLAOU, 2002): o deslocamento da banda intracluster para uma região de menor energia, o que pode ser explicado pelo preenchimento dos orbitais a'_2 durante o processo redutivo, o que desestabiliza os níveis energéticos da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]$, o que também causa o deslocamento de todas bandas das transições de transferência de carga. Para o complexo 3, também foi possível observar o processo oxidativo +1/+2, onde ocorre a perda do elétron desemparelhado no orbital a'_2 , e, como consequência disso, o desdobramento da banda da transição intracluster de 700 nm para 580 e 800 nm. A remoção do elétron de um orbital com características metálicas ($d_{x'z'}$) estabiliza os orbitais $d\pi$ da unidade, mas não de maneira igualitária: o orbital e' é muito mais estabilizado, justamente por ter a mesma origem do orbital a'_2 , enquanto que o orbital a''_2 antiligante sofre menos a supracitada influência. A consequência imediata disso é que a transição $e' \rightarrow a''_2$ sofre um deslocamento hipsocrômico, enquanto a transição $e'' \rightarrow a''_2$ sofre um deslocamento batocrômico em menor magnitude.

Verificado o fato de que, na região acima de 300 nm, o comportamento da série está de acordo com o descrito para os análogos com piridinas, o que foi observado na região abaixo de 300 nm para os complexos 4 e 5 - porque eles foram solúveis o suficiente em acetonitrila - é surpreendente: a mudança do estado de oxidação da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]_n$ perturba até os orbitais com características “exclusivas” dos ligantes e isto pôde ser visto pela mudança da posição das bandas referentes às transições classificadas como intraligante, normalmente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, o que prova que, para o caso dos ligantes azanaftalenos a extensão do sistema π é tão intensa quanto discutido anteriormente através das observações da forte dependência das propriedades espectroscópicas com a basicidade dos ligantes periféricos.

10. Análise elementar

A análise elementar foi empregada com o objetivo de verificar a composição e pureza dos complexos 1-6, como resume a Tabela 15:

Tabela 15. Comparação entre os valores calculados e os resultados obtidos para análise elementar dos complexos 1-6

Complexo	Resultado (Erro %)
Complexo 1 	$\%C_{\text{enc}}$: 35,09%; $\%C_{\text{calc}}$: 35,77% (1,87%) $\%H_{\text{enc}}$: 3,07%; $\%H_{\text{calc}}$: 3,00% (3,76%) $\%N_{\text{enc}}$: 6,79%; $\%N_{\text{calc}}$: 6,95% (2,22%)
Complexo 2 	$\%C_{\text{enc}}$: 34,95%; $\%C_{\text{calc}}$: 34,99% (1,17%) $\%H_{\text{enc}}$: 2,83%; $\%H_{\text{calc}}$: 2,93% (3,47%) $\%N_{\text{enc}}$: 6,19%; $\%N_{\text{calc}}$: 6,12% (1,15%)
Complexo 3 	$\%C_{\text{enc}}$: 32,64%; $\%C_{\text{calc}}$: 32,57% (0,21%) $\%H_{\text{enc}}$: 2,90%; $\%H_{\text{calc}}$: 2,73% (6,23%) $\%N_{\text{enc}}$: 2,63%; $\%N_{\text{calc}}$: 2,85% (7,71%)
Complexo 4 	$\%C_{\text{enc}}$: 39,34%; $\%C_{\text{calc}}$: 38,84% (1,27%) $\%H_{\text{enc}}$: 3,35%; $\%H_{\text{calc}}$: 3,25% (2,71%) $\%N_{\text{enc}}$: 3,56%; $\%N_{\text{calc}}$: 3,49% (2,28%)
Complexo 5 	$\%C_{\text{enc}}$: 35,44%; $\%C_{\text{calc}}$: 36,91% (3,98%) $\%H_{\text{enc}}$: 3,37%; $\%H_{\text{calc}}$: 3,49% (3,43%) $\%N_{\text{enc}}$: 6,29%; $\%N_{\text{calc}}$: 6,62% (4,90%)
Complexo 6 	$\%C_{\text{enc}}$: 37,60%; $\%C_{\text{calc}}$: 38,50% (2,27%) $\%H_{\text{enc}}$: 4,06%; $\%H_{\text{calc}}$: 4,22% (3,76%) $\%N_{\text{enc}}$: 3,42%; $\%N_{\text{calc}}$: 3,45% (0,75%)

Fonte: Autora

3. Conclusões parciais

Seis novos compostos trinucleares simétricos de rutênio, com fórmula geral $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$, onde L = **(1)** quinazolina (qui), **(2)** 5-nitroisoquinolina (5-nitro), **(3)** 5-bromoisoquinolina (5-briq), **(4)** isoquinolina (iq), **(5)** 5-aminoisoquinolina (5-amiq), and **(6)** 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (thiq) foram sintetizados e purificados com sucesso, aumentando os dados disponíveis para esta classe de compostos. A estrutura do complexo 1 foi determinada por difração de raios-X e mostrou que os três ligantes quinazolina apresentam um nível de coplanaridade bastante elevado com a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, sendo que esta estrutura foi, provavelmente, ditada por efeitos eletrônicos, ou seja, a densidade eletrônica do complexo foi deslocalizada, através do sistema π formado pelos ligantes, para a periferia. Esta informação foi confirmada por todas as correlações feitas entre as propriedades dos ligantes livres (pK_a) e os dados espectroscópicos dos complexos.

Os dados obtidos através de ^1H -RMN mostraram que os ligantes que possuem substituintes retiradores de elétrons foram capazes de estender o sistema π deslocalizado, fornecendo valores de $\Delta\delta$ maiores. Além disso, a dependência dos deslocamentos químicos com o pK_a dos ligantes livres mostrou que a deslocalização através do sistema π influenciou a densidade eletrônica na periferia dos complexos. A σ -doação causada pelos ligantes mais básicos foi praticamente responsável pela densidade eletrônica da unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$. Todos os dados obtidos através das outras técnicas espectroscópicas e voltametria cíclica são autoconsistentes.

Resumindo, mesmo que a σ -doação tenha aumentado a densidade eletrônica do centro metálico, uma parte é deslocalizada de volta para a periferia dos complexos através do sistema π estendido. Este fato foi completamente corroborado pelos dados obtidos através dos experimentos de espectroeletrólise: mesmo o complexo 5 apresentando um ligante mais básico, isto não impediu que as transições internas do ligante fossem perturbadas pelo aumento/diminuição da densidade eletrônica do núcleo.

Por fim, com os dados obtidos, é possível afirmar que a estrutura proposta está de acordo com a obtida e que todos os compostos apresentaram pureza adequada para continuar com os estudos de atividade biológica.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

1. *Materiais e métodos*

1. *Atividade tripanocida*

Os ensaios de atividade tripanocida foram realizados pela Dra. Zumira Aparecida Carneiro no laboratório do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

a) *Estudos in vitro da atividade tripanocida na fase tripomastigota do Trypanosoma cruzi*

O método foi realizado de acordo com o descrito na literatura (DIAS et al., 2009).

Resumidamente, as células da linhagem LLC-MK₂ (ATCC®, retiradas do tecido epitelial de rins de macaco da espécie *Macaca mulatta*) foram ressuspensas em meio RPMI (Gibco) sem vermelho de fenol com suplemento de 5% de soro fetal bovino durante 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas com 1×10^6 parasitas *T. cruzi* na forma tripomastigota (presente na fase aguda da Doença de Chagas) da cepa CL Brener (clone B5), que expressa o gene β -galactosidase de *Escherichia coli*. Após 24 horas, as células foram incubadas com os complexos de 1-6, seus respectivos ligantes livres e o benznidazol, a droga de referência, em concentrações que variaram de 500 μ M a 3,8 μ M. Após 6 dias de cultura (3 dias após a exposição aos compostos), 50 μ L de tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100 e 400 μ M de vermelho de clorofenol- β -D-galactopirano (CPRG) foram adicionado às placas, que foram incubadas a 28 °C durante 6 h. Após este período, a viabilidade celular (parasitas vivos) é medida indiretamente através da absorvância do meio, lida utilizando um leitor de ELISA (leitor MPR multipoços VARIAN CARY-50), num λ_{\max} de 570 nm.

b) *Estudos in vitro da atividade tripanocida na fase amastigota do Trypanosoma cruzi*

A atividade tripanocida dos compostos simétricos e do benznidazol (BZN) contra as formas amastigotas da linhagem CL Brener foram avaliadas como descrito na literatura (BUCKNER et al., 1996b). Resumidamente, as células da linhagem LLC-MK₂ ($2,5 \times 10^4$) foram ressuspensas em meio RPMI (Gibco) sem o suplemento vermelho de

fenol e com soro fetal bovino 5% durante 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas com $5,0 \times 10^5$ das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da linhagem CL Brener, expressando estavelmente o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* (CL Brener), e, após 48 horas, as placas foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffer Solution*) para remover parasitas extracelulares. Em seguida, estas células foram incubadas com os compostos ou benzonidazol, em concentrações seriadas entre 500 μ M a 3,9 μ M. Após 48 ou 72 horas de cultura, 50 μ l de PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e 400 μ M de *chlorophenol red- β -D-galactoside* (CPRG) foram adicionados. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 6 h e a absorvância foi lida em 570 nm. O BZN foi utilizado como controle positivo e os meios de cultura como controle negativo.

c) *Citotoxicidade contra a linhagem LLC-MK₂*

A viabilidade celular da linhagem LLC-MK₂ foi avaliada através do teste do MTT, um método colorimétrico clássico utilizado extensivamente em trabalhos da literatura (MOSMANN, 1983; MSHANA et al., 1998). O MTT é um sal (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (amarelo), que pode ser convertido a formazan (roxo, solúvel em solventes orgânicos) através da ação da enzima redutase mitocondrial. A avaliação da toxicidade das células, sem a infecção pelo parasita *T. cruzi*, foi feita no mesmo molde do experimento da atividade tripanocida contra a fase tripomastigota do parasita. Para isso, utilizou-se $2,5 \times 10^4$ células, que foram incubadas por 24 h e mantidas por mais 24 h na estufa. No terceiro dia, a cultura celular foi exposta à presença dos complexos de 1-6, seus respectivos ligantes livres e o benznidazol, numa faixa de concentrações de 500 - 3,8 μ L. No sexto dia, o meio de cultura foi removido, e adicionou-se um novo meio, contendo 10 μ M de MTT, diluído em tampão fosfato. O precipitado roxo (formazan) foi diluído com 100 μ L de DMSO, a viabilidade celular (somente as células vivas produzem o formazan) foi medida indiretamente pela absorvância em 570 nm no leitor de ELISA (leitor MPR multipoços VARIAN CARY-50).

d) *Estudos prévios da atividade in vivo do composto 6 contra a fase aguda da Doença de Chagas*

Para os estudos *in vivo* (Comitê de ética para o uso de animais FCFRP - USP N° 15.1.713.60.7), dois grupos distintos de fêmeas de camundongo *Swiss* (*Mus musculus*,

linhagem *Swiss*) foram infectados com 2×10^3 cepas CL Brener dos parasitas na fase tripomastigota. Os grupos distintos foram tratados com 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dia durante 10 dias consecutivos por gavagem oral com benzonidazol e $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{thiq})_3]\text{PF}_6$. Após o tratamento, uma análise de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada para quantificar a quantidade de parasitas no tecido cardíaco através da presença do DNA do *T. cruzi*.

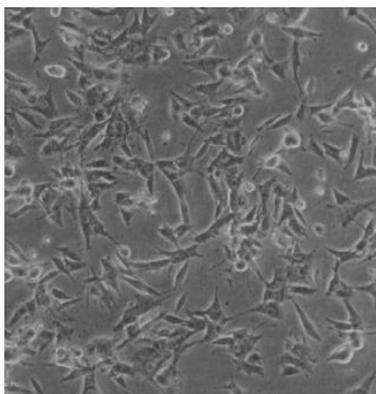
2. Atividade anticâncer

Os ensaios de atividade anticâncer foram realizados pela Ms. Laísa Bonafim Negri no laboratório do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

a) Avaliação preliminar da citotoxicidade contra a linhagem B16F10 (melanoma murino)

Assim como no item "Citotoxicidade contra a linhagem LLC-MK₂", empregou-se o método do MTT (MOSMANN, 1983) para avaliar a viabilidade celular das células de melanoma murino, B16F10 (crescimento aderente), após o tratamento com os complexos de 1-6 e com cisplatina, o medicamento de referência. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo e, após 80% de confluência (Figura 69) nas garrafas de cultivo, foram tripsinizadas (Tripsina, Sigma-Aldrich), ou seja, soltas do fundo da garrafa de cultivo, e contadas na câmara de Neubauer e, posteriormente, foram plaqueadas em placas de ELISA com 96 poços na concentração de 1×10^5 células/mL (2×10^4 células/poço). Após o período de incubação de 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos, 100 μM do ligante livre e 50 μM de cisplatina. Após o período de incubação dos compostos analisados (24 horas), foi adicionada uma solução de MTT (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich). Deixou-se reagir por 3 horas. Retirou-se o sobrenadante contendo a solução de MTT e adicionou-se 200 μL de DMSO em cada poço para solubilizar formazan que precipitou após a conversão pela redutase mitocondrial presente nas células vivas. A quantificação da quantidade de células vivas foi realizada de maneira indireta através da leitura de absorbância das soluções contidas nos poços utilizando um leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da razão entre as absorbâncias obtidas e a do controle.

Figura 69. Células B16F10 com 80% de confluência



Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2005)

b) *Avaliação preliminar da citotoxicidade do complexo 4 contra a linhagem L929 (fibroblasto murino)*

A linhagem L929 foi utilizada como modelo de células saudáveis, uma vez que os fibroblastos também apresentam crescimento aderente como a linhagem B16F10. O método empregado foi idêntico ao supracitado e o ensaio foi realizado para o complexo 4.

2. Resultados e discussão

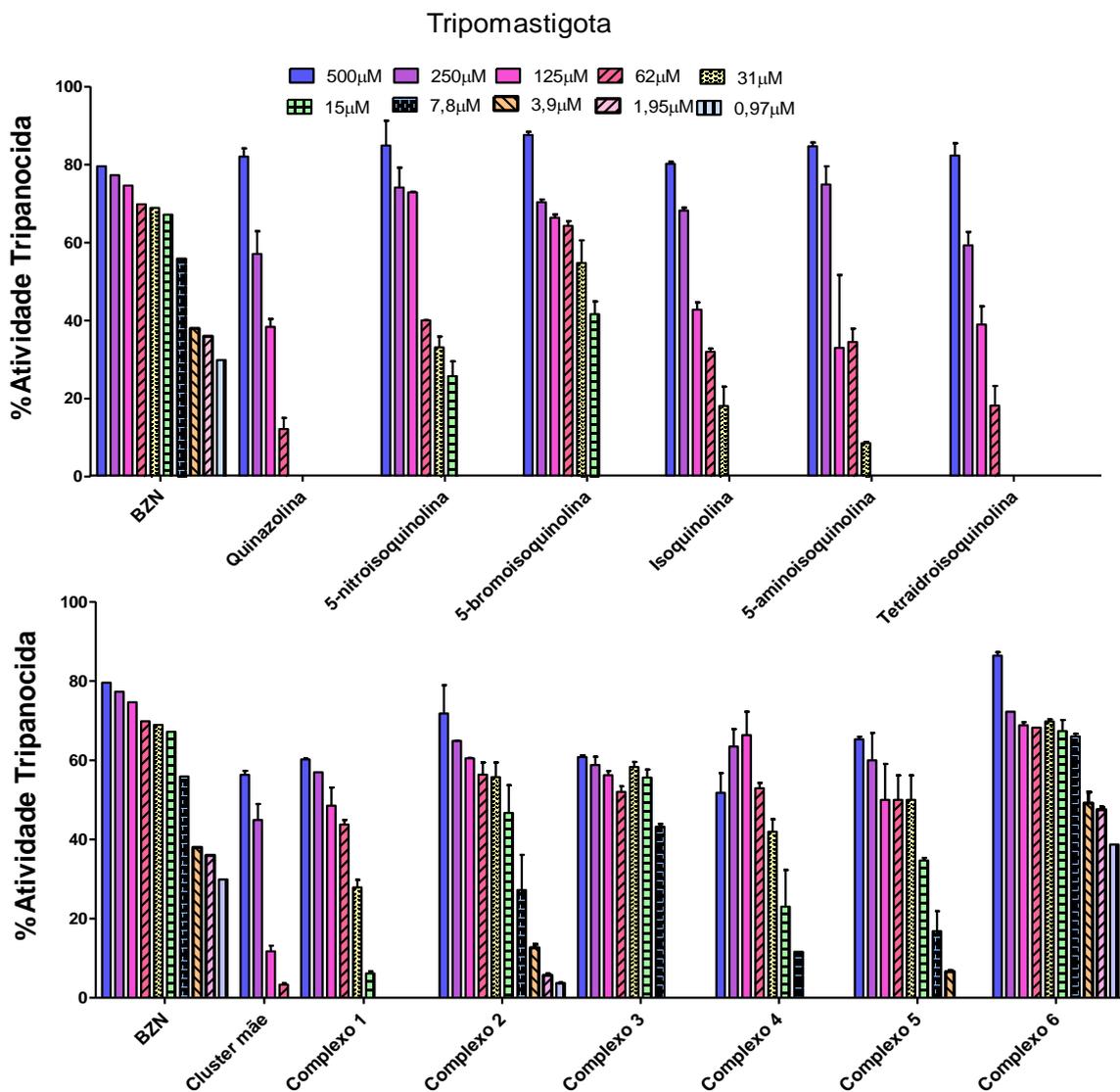
1. Atividade tripanocida

a) Estudos *in vitro*

Os ensaios de atividade tripanocida e citotoxicidade foram feitos visando à comparação entre a droga de referência benzonidazol, os azanaftalenos como ligantes livres, o complexo precursor ("*cluster mãe*") e os complexos com os ligantes azanaftalenos. Os resultados (Figura 70, Figura 71, Figura 72 e Tabela 16) foram muito interessantes porque, em todos os casos, a atividade dos complexos contra as fases tripomastigota e amastigota do *T. cruzi* foi igual ou superior e, em alguns casos, muitas vezes superior, quando comparado à atividade dos ligantes livres. O aumento da atividade tripanocida depois da formação do complexo metálico foi explorado por Farrell e colaboradores (FARRELL; WILLIAMSON; MCLAREN, 1984), mostrando que os ligantes que já eram ativos têm essa atividade significativamente aumentada após a coordenação à platina.

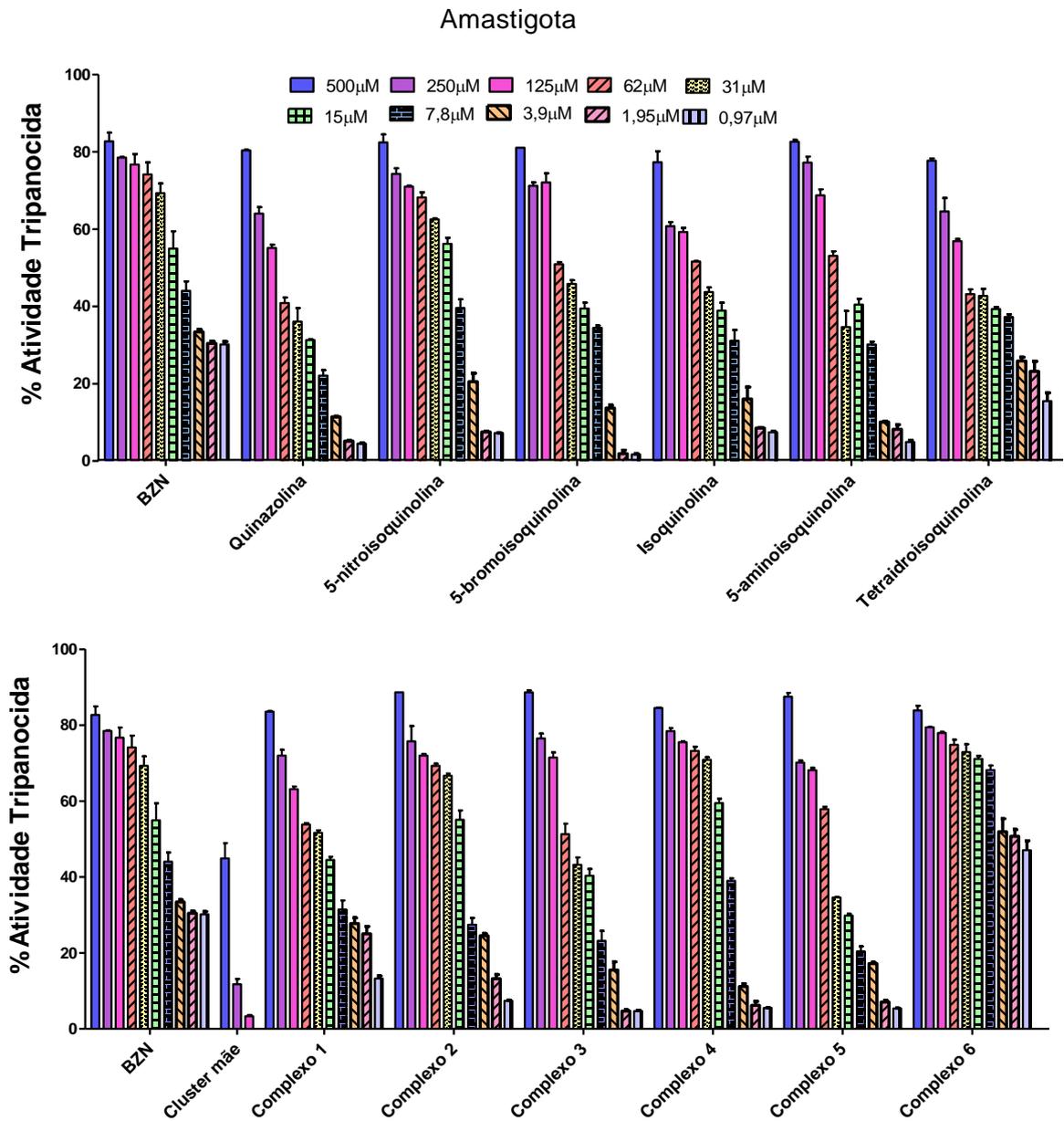
No caso particular dos complexos trinucleares apresentados, sua atividade dificilmente é causada somente pela perda dos três ligantes no interior do parasita (agindo como um carreador da espécie ativa), principalmente porque, embora superiores, os valores de IC₅₀ dos ligantes livres não variam numa mesma taxa quando comparados entre si.

Figura 70. Atividade tripanocida *in vitro* dos ligantes (superior) e dos respectivos complexos trinucleares (inferior) contra a fase tripomastigota do *T. cruzi*. A porcentagem da atividade tripanocida foi normalizada com o controle negativo



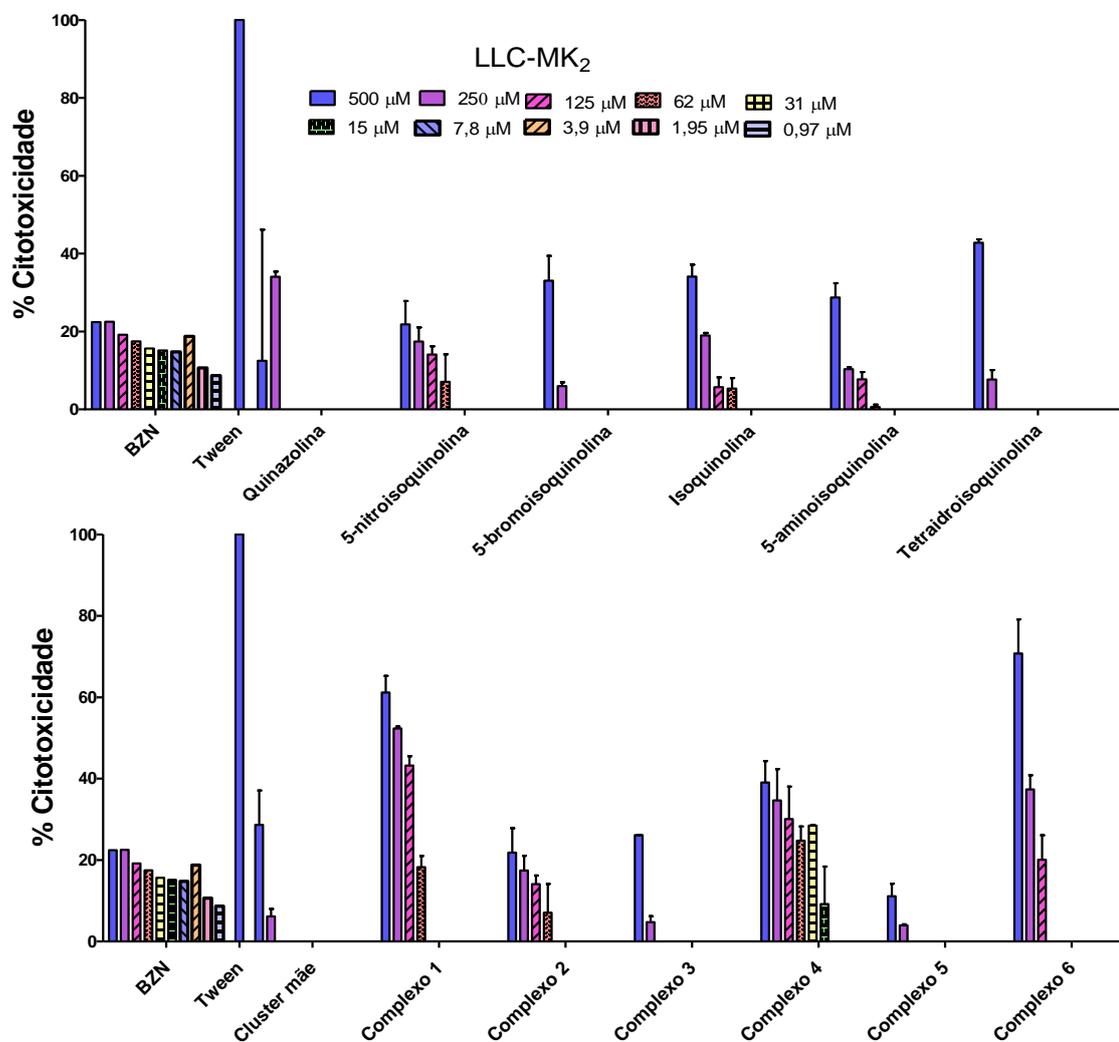
Fonte: Autora

Figura 71. Atividade tripanocida *in vitro* dos ligantes (superior) e dos respectivos complexos trinucleares (inferior) contra a fase amastigota do *T. cruzi*. A porcentagem da atividade tripanocida foi normalizada com o controle negativo



Fonte: Autora

Figura 72. Citotoxicidade *in vitro* dos ligantes (superior) e dos respectivos complexos trinucleares (inferior). O meio de cultura foi utilizado como controle negativo e Tween 20 como controle positivo



Fonte: Autora

Tabela 16. Dados obtidos da atividade tripanocida contra a fase tripomastigota e amastigota do *T. cruzi* (IC₅₀), valores da Dose Letal (DL₅₀) contra a linhagem LLC-MK₂ e o Índice de Seletividade (SI) para os compostos 1-6

Composto	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	DL ₅₀ (μM)	SI	SI
	tripomastigota	amastigota	LLC-MK ₂	tripomastigota	amastigota
Benzonidazol	5,19	10,77	266,2	51,2	24,7
“Cluster mãe”	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	160,0	209,0
tetraidroisoquinolina	182,8	53,23	396,1	2,1	7,4

Fonte: Autora

Era esperado que os compostos aqui apresentados se comportassem como outros complexos de coordenação com propriedades tripanocidas, como os complexos polipiridínicos contendo fenazinas (BENÍTEZ et al., 2009b), que são uma classe conhecida de intercaladores de DNA, já que a sua estrutura planar e hidrofóbica favorece este tipo de interação. Neste sentido, o complexo 4 seria o intercalador mais forte e apresentaria a maior atividade tripanocida, porque, como no caso das fenazinas, a estrutura aromática, planar e hidrofóbica da isoquinolina intercalar-se-ia ao DNA do parasita, diminuindo sua viabilidade, mas, como será discutido na próxima seção, o DNA não é necessariamente o alvo desta classe de complexos trinucleares, e, portanto, a pronunciada atividade biológica apresentada por eles está relacionada a outros tipos e alvos e/ou interações.

Para o caso da atividade tripanocida, o complexo 6, que tem os ligantes 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina, é o mais ativo da série e, surpreendentemente, mais ativo que o medicamento de referência tanto na fase tripomastigota quanto na fase amastigota do parasita *T. cruzi* (Figura 70, Figura 71, Tabela 16). Este complexo difere dos demais pela presença do segundo anel saturado, o que significa que o ligante perdeu a planaridade. Mesmo que qualquer tentativa, neste ponto, de relacionar estrutura e atividade seja especulativa, o aumento da toxicidade em função da saturação de compostos cíclicos já foi explorado na literatura (WOOD et al., 1976): para o caso do benzopireno, os metabólitos “tetraidro” tendem a ser mais tóxicos e mutagênicos do que os análogos insaturados.

Os altos valores da DL₅₀ mostram que uma quantidade relativamente grande dos compostos é necessária para serem tóxicos às células saudáveis. Isso mostra que, para o caso em que os compostos apresentam uma atividade tripanocida considerável, esta atividade é devida à morte do parasita e não um resultado falso positivo gerado à custa da morte da célula hospedeira.

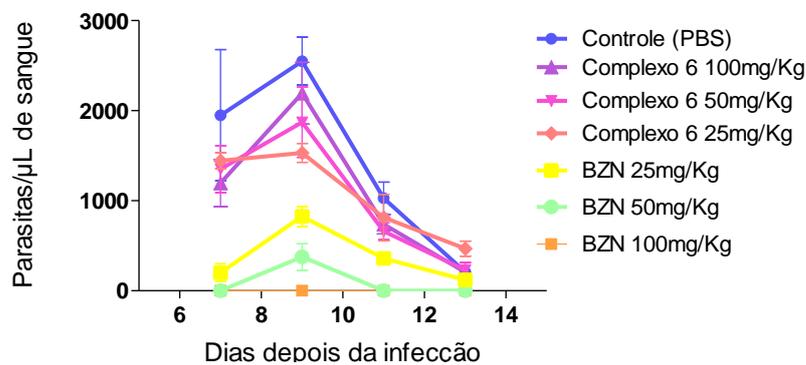
Selecionado como o melhor agente tripanocida da série, o complexo 6 apresenta um valor de DL₅₀ de 222, 4 µM, o que, associado aos baixíssimos valores de IC₅₀ para as fases tripomastigota e amastigota do *T. cruzi* (respectivamente 1,39 e 1,06 µM), garante que o Índice de Seletividade (razão entre DL₅₀ e o IC₅₀ de um composto) tenha um valor suficientemente alto para que o complexo seja um excelente candidato aos testes *in vivo*. O Índice de Seletividade é um valor numérico que a Organização Mundial da Saúde estabelece para mensurar o quanto um composto é seguro para prosseguir com os testes *in vivo*. Para o caso das doenças negligenciadas, o valor mínimo deve ser 10 (CHATELAIN, 2015), sendo que o complexo 6 apresenta, respectivamente, 160,0 e 209,0 para as fases tripomastigota e amastigota, não restando dúvidas de que realmente se trata de um excelente candidato aos testes *in vivo*.

b) *Estudos prévios da atividade in vivo*

Os estudos *in vivo* (Comitê de ética para o uso de animais FCFRP - USP Nº 15.1.713.60.7) foram realizados para a fase aguda da doença de Chagas (fase tripomastigota do parasita), utilizando o complexo 6. Para tanto, utilizou-se três

concentrações tanto para o complexo quanto para o benzonidazol. Estas concentrações são definidas pela faixa da atividade do benzonidazol, visando à comparação da eficiência do candidato contra a droga de referência. O benzonidazol apresenta uma excelente atividade contra a fase aguda da Doença de Chagas, e por isso, esta comparação torna-se ainda mais necessária. A Figura 73 mostra os resultados da parasitemia após o tratamento com os dois compostos:

Figura 73. Estudo da parasitemia dos camundongos tratados com o complexo 6 e com benzonidazol



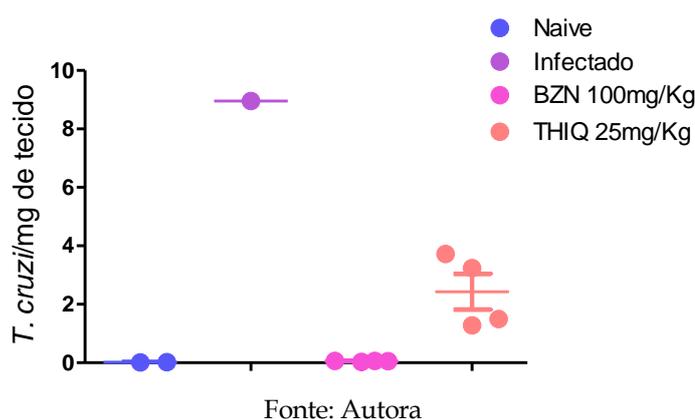
Fonte: Autora

Os dados obtidos a partir do estudo da parasitemia do complexo 6 e do benzonidazol mostram um perfil inesperado: o complexo 6 não só não elimina a infecção causada pelos parasitas, como faz o benzonidazol, mas aumenta-a, o que, num primeiro momento, parece ser um resultado bastante ruim. Mas observando os dados com mais cuidado, é possível notar que existe uma certa tendência no perfil do complexo 6: quanto menor a concentração de complexo, menor também a quantidade de parasitas por μL de sangue do camundongo, o que pode ser um indicativo de que, na verdade, a dose administrada foi muito alta e, ao invés de ajudar o organismo do camundongo a se recuperar da infecção, prejudicou-o. Para verificar essa hipótese, novos ensaios *in vivo* serão feitos com concentrações menores de composto.

A parasitemia no sangue não é o único experimento realizado após a exposição dos camundongos infectados ao complexo. A histologia de alguns tecidos também é feita a fim de verificar se o candidato a fármaco é capaz também de “limpar” a infecção nestes locais, além dos parasitas presentes na corrente sanguínea do animal.

Neste trabalho, verificou-se a presença de parasitas no tecido cardíaco, uma vez que sabe-se que o coração é um dos alvos do parasita na fase crônica da Doença de Chagas. Para tanto, fez-se um ensaio de PCR, que, resumidamente, consiste em amplificar regiões específicas do DNA, e, deste modo, detectar material genético exclusivo de *T. cruzi* no coração dos camundongos. Os resultados obtidos são mostrados pela Figura 74:

Figura 74. Resultados da PCR para o tecido cardíaco dos camundongos tratados com benzonidazol (100 mg/kg) e com o complexo com thiq (25 mg/kg)



Apesar de o complexo 6 não eliminar completamente a presença de parasitas no tecido cardíaco, observou-se uma diminuição considerável da infecção, mesmo em uma concentração quatro vezes menor do que o medicamento de referência. Este resultado, aliado àquele obtido nos estudos *in vitro* da atividade tripanocida contra a fase amastigota dos parasitas são indicativos de que é possível persistir nos ensaios *in vivo* contra a fase aguda, desde que as concentrações sejam ajustadas, e, principalmente, contra a fase crônica, que é justamente onde o benzonidazol não apresenta uma atividade tão pronunciada.

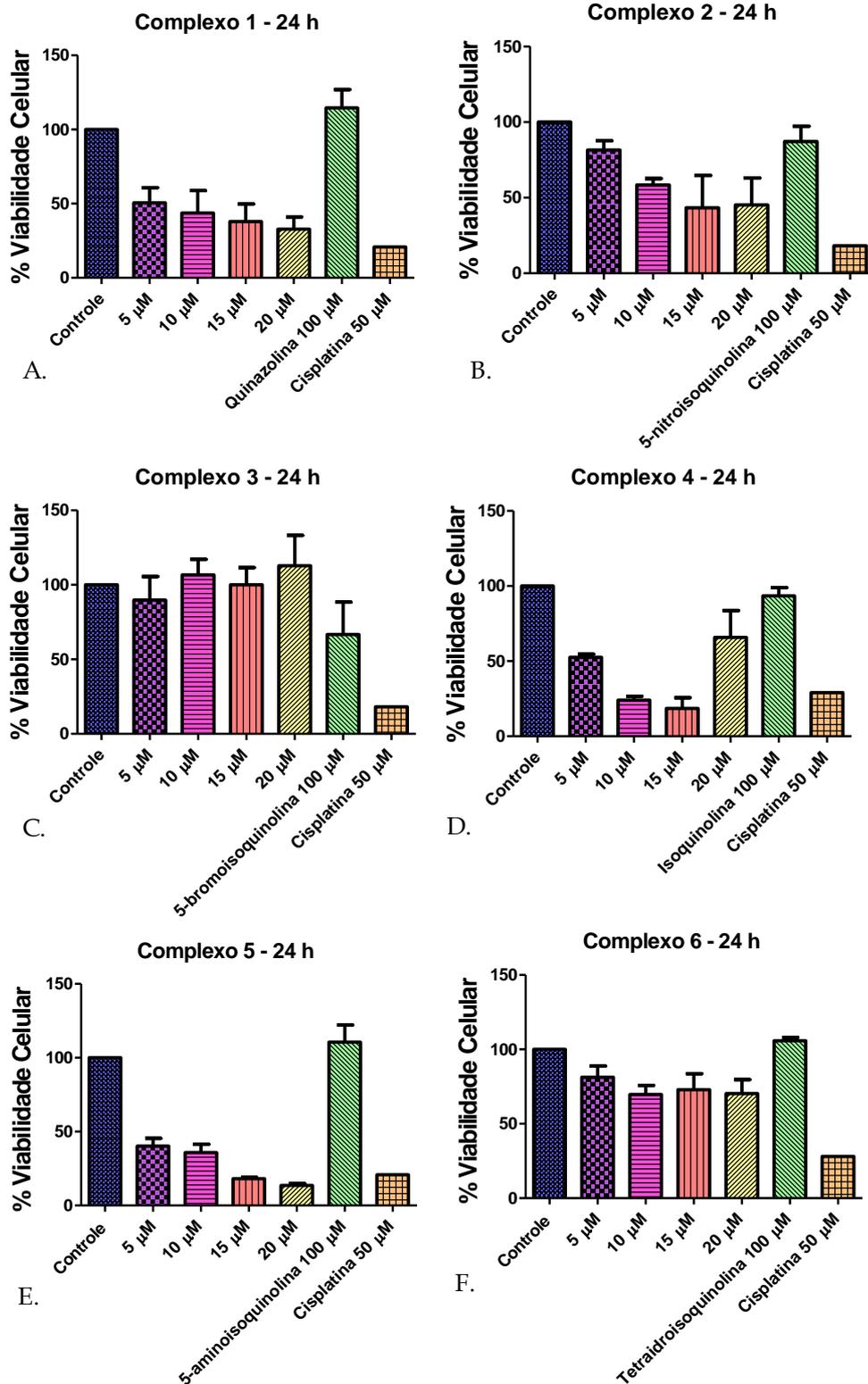
2. Atividade anticâncer

a) Avaliação preliminar da citotoxicidade contra a linhagem B16F10 (melanoma murino)

O mote para a síntese dos complexos com ligantes azanaftalenos foi que sua estrutura planar e hidrofóbica serviria como uma ponte para interação com biomoléculas, proporcionando o aumento da sua atividade biológica quando comparado a outros complexos simétricos (TAUCHMAN et al., 2014). Para tanto, a viabilidade celular da linhagem metastática de melanoma murino, B16F10, foi avaliada e

os dados comparados àqueles obtidos para os azanaftalenos como ligantes livres e para a cisplatina (Figura 75).

Figura 75 A-F. Efeito citotóxico, em células B16F10, da cisplatina (50 μM), dos ligantes livres (100 μM) e dos complexos 1-6 com concentrações de 5-20 μM , tempo de incubação de 24 h e ausência de estímulo luminoso



Fonte: Autora

Tabela 17. Resumo dos valores de viabilidade celular apresentados pelos complexos 1-6, ligante livre e cisplatina

	% Viabilidade celular					
	5µM	10 µM	15 µM	20 µM	Ligante livre	Cisplatina
					100 µM	50 µM
Complexo 1	50%	44%	38%	33%	114%	21%
Complexo 2	82%	58%	43%	45%	87%	18%
Complexo 3*	90%	107%	100%	113%	66%	18%
Complexo 4	52%	24%	18%	66%	94%	21%
Complexo 5	40%	36%	18%	14%	110%	21%
Complexo 6	81%	70%	73%	70%	106%	29%

(*) O complexo 3 precipitou durante os ensaios

Fonte: Autora

A partir dos dados apresentados, é possível notar que, na faixa de concentrações utilizada, os complexos 1, 2, 4 e 5 têm valores de viabilidade celular menores que 50% em pelo menos duas concentrações. Dentre esses quatro compostos, dois foram ainda melhores: o complexo 4 e o complexo 5.

Desde o início deste trabalho, pensava-se que o complexo 4, que tem os ligantes isoquinolina, seria o composto mais biologicamente ativo de toda a série, justamente pela estrutura planar e hidrofóbica da isoquinolina, como já foi apresentado anteriormente. Para o caso da atividade anticâncer, tal estrutura pode sim ter influência no bom resultado obtido no ensaio com as células B16F10, mas não porque o complexo 4 interage mais fortemente com DNA, como era suposto, mas porque sua estrutura pode facilitar a penetração nas células através da membrana celular, ou ainda, porque ele pode possuir uma grande afinidade por proteínas que, eventualmente, participam nos processos de manutenção e reparo do DNA, ou que desempenhem funções importantes de transporte nas células. O fato de o DNA não ser o alvo imediato do complexo, como será apresentado próxima seção, não é, de maneira nenhuma, inconveniente. Isto porque, uma vez que o alvo da cisplatina é o DNA, compostos que tenham um mecanismo de ação díspar podem agir em linhagens resistentes (LEVINA; MITRA; LAY, 2009). Somente em 20 µM observa-se um aumento da viabilidade celular, e isto

pode ser devido à precipitação do complexo. Por esses motivos, o complexo 4 foi escolhido para o teste preliminar com células saudáveis (L929), onde a faixa de concentrações utilizadas compreende aquela em que o complexo é mais ativo contra a linhagem B16F10.

Os mesmos argumentos apresentados para o complexo 4 são aplicáveis ao complexo 5, com o diferencial da presença do grupamento amino na posição 5 do ligante N-heterocíclico, que pode aumentar sua afinidade por biomoléculas que apresentem sítios para interações de hidrogênio e/ou especificidade para grupos NH₂.

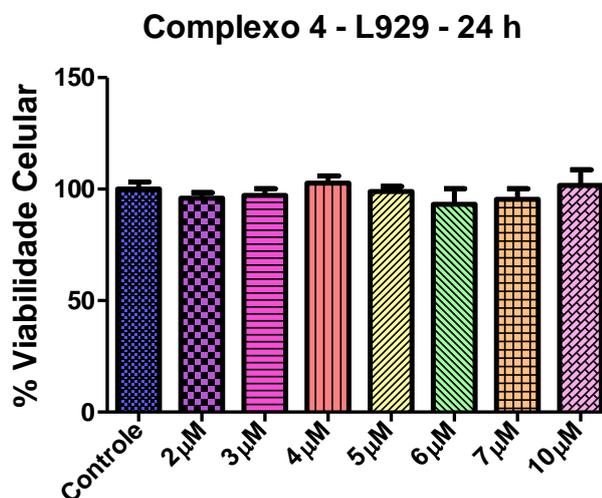
A concentração utilizada para os ligantes livres foi 100 µM, cinco vezes superior à maior concentração dos complexos, e isto foi feito para verificar que a atividade observada foi devida ao complexo como um todo e não apenas a um carreador de espécies ativas. Apenas no caso do complexo 3 a atividade do ligante foi superior à do complexo, isto porque o ligante 5-bromoisoquinolina é mais solúvel do que seu complexo trinuclear, cuja precipitação foi observada através de microscopia óptica durante o experimento: viu-se, claramente, a formação de pequenos aglomerados de coloração azul que ficavam por fora das células. Este resultado, aliado ao da atividade tripanocida corrobora a hipótese de que a coordenação a um centro metálico melhora a atividade biológica da nova espécie (FARRELL; WILLIAMSON; MCLAREN, 1984).

Por último, mas não menos importante, o fato de atividade observada para os complexos ser na ausência de estímulo luminoso mostra que os complexos 1, 2, 4 e 5 são bons candidatos a serem utilizados onde Terapia Fotodinâmica não é tão eficiente: nos melanomas. Os melanomas apresentam um mecanismo de defesa, a pigmentação, e para ser efetiva neste tipo de ambiente, a Terapia fotodinâmica precisa contornar esta limitação estando associada a terapias de imunestimulação (BALDEA; FILIP, 2012).

b) Avaliação preliminar da citotoxicidade do complexo 4 contra a linhagem L929 (fibroblasto murino)

A avaliação da citotoxicidade contra a linhagem L929 foi um experimento prévio realizado para o complexo 4, considerado o melhor da série para os ensaios de atividade anticâncer.

Figura 76. Efeito citotóxico, na linhagem celular L929, do complexo 4 numa faixa de concentrações de 2-10 μM



Fonte: Autora

Nos estudos da citotoxicidade contra a linhagem LLC-MK₂, o principal objetivo, além de avaliar a especificidade pelo *T. cruzi*, é, principalmente, mostrar se houve dano à célula hospedeira, pois sua morte interfere diretamente no ciclo de vida do parasita, gerando um resultado falso positivo. No caso dos estudos da atividade anticâncer, a análise da ação do composto contra uma linhagem considerada sadia visa ao entendimento do efeito citotóxico, ou seja, se o composto é tóxico somente às células cancerosas, que, sabidamente possuem fisiologia diferente das células saudáveis, ou se é tóxico a qualquer tipo de célula. Como será visto no próximo capítulo, o DNA não é o alvo direto dos complexos, e mesmo aqueles que apresentam constantes de ligação maiores, como é o caso do complexo 5, ainda assim, não são tão pronunciadas. Isso confere uma vantagem ao uso desses complexos, porque existe uma especificidade pelas células doentes.

Para o complexo 4, os resultados foram bastante promissores, porque, na faixa de concentrações trabalhada, ele não apresenta citotoxicidade alguma, e este dado é particularmente importante, pois mostra que existe uma especificidade para células cancerosas. Por este motivo, as próximas etapas compreendem o estudo com outras linhagens celulares de câncer, testar maiores concentrações do complexo 4, e também dos demais complexos, determinando qual a faixa de toxicidade apresentada por eles.

3. Conclusões parciais

Os dados apresentados mostraram que os complexos trinucleares de rutênio com ligantes azanaftalenos têm potencial para serem utilizados como metalofármacos. Isso porque, tanto para a atividade tripanocida, quanto para a atividade anticâncer, eles apresentam uma especificidade significativa pelo alvo. Os estudos aqui presentes, principalmente o da atividade anticâncer, foram apenas o primeiro passo, e, dado o êxito nos ensaios, haverá continuidade nas investigações sobre as possíveis aplicações biológicas destes novos compostos.

Sobre atividade antiparasitária de drogas que tenham atividade anticâncer prévia: este não é um tópico inexplorado na literatura (WILLIAMSON; SCOTT-FINNIGAN, 1978; FIGGITT et al., 1992), mas, curiosamente para os complexos apresentados aqui, o complexo 6, com maior atividade tripanocida, não repete o mesmo desempenho para matar as células B16F10. A recíproca é verdadeira, no caso dos complexos 4 e 5, que têm o melhor desempenho contra a linhagem de melanoma murino. E, apesar de ser um comportamento quase atípico, esta observação reforça a hipótese de que os complexos apresentam um alto grau de especificidade pelo alvo, parasita ou célula cancerosa.

CAPÍTULO 4

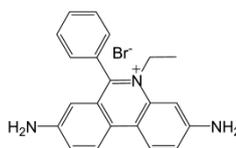
INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

1. Materiais e métodos

1. Reagentes

Tabela 18. Reagentes utilizados na etapa de interação com biomoléculas

Nome, pureza	Procedência
Ácido acético glacial, $\geq 99,7\%$	Fisher Scientific
Agarose, para biologia molecular	FisherBioreagents
Albumina de soro humano (HSA), $\geq 98\%$	Sigma
Azul de bromofenol, puro	Acros
Brometo de etídio, EB, para biologia molecular	Nalgene
Cloreto de sódio, NaCl, para cultura celular	Sigma
Dimetilsulfóxido (DMSO), para cultura celular	Aldrich
DNA de esperma de peixe, <i>fs</i> -DNA, $\leq 1\%$ de proteína	Sigma
DNA ladder, 1kb	Invitrogen
EDTA, $\geq 99\%$	Sigma
Plasmídeo pUC19, para biologia molecular	Fisher Scientific
Sacarose, para biologia molecular	Sigma
Tris, 99,8%	GE Healthcare



Fonte: Autora

2. Parte experimental

a) Interação com DNA - Deslocamento do brometo de etídio

O deslocamento do brometo de etídio é um experimento realizado com o intuito de verificar se os compostos analisados são bons intercaladores de DNA. O estudo de interação do *fs*-DNA com os complexos 1-6, a partir do deslocamento do brometo de etídio, foi monitorado por espectroscopia de fluorescência de acordo com o descrito na

literatura (GAO et al., 2009; ICSEL; YILMAZ, 2013; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Uma solução 50 μM de *fs*-DNA (tampão tris 50 mM, pH 7,4, 5 mM de NaCl) foi colocada em contato com brometo de etídio (EB, 5 μM , água) durante uma hora a uma temperatura constante de 25 $^{\circ}\text{C}$, que foi mantida durante as análises. Após este período, titulou-se a solução de *fs*-DNA com alíquotas de 2 μL de soluções 10 mM (DMSO) dos complexos 1, 4-6, numa faixa de concentrações 6,7 a 92,5 μM , e alíquotas de 3 μL de soluções 5 mM (DMSO) dos complexos 2 e 3 numa faixa de concentrações de 5 a 93,2 μM . As titulações nunca ultrapassaram a proporção final de 2% DMSO. A adição das alíquotas de complexo foi acompanhada por espectroscopia de fluorescência, uma vez que o brometo de etídio livre não tem a mesma intensidade de emissão que o complexo EB-DNA, que tem λ_{exc} em 526 nm, emitindo em 605 nm. Observou-se a região de 545-700 nm. A intercalação dos complexos ao DNA provoca uma supressão de fluorescência, que pode ser estudada pelo modelo de Stern-Volmer, detalhado no item “*Interação com Albumina de Soro Humano (HSA)*”. Além do modelo de Stern-Volmer, utilizou-se uma equação simplificada (ICSEL; YILMAZ, 2013; SINGH; SRIVASTAVA; PATRA, 2016) para determinação do K_{app} (constante de ligação aparente), baseada no valor da constante de ligação do brometo de etídio, K_{EB} :

Equação 2

$$K_{\text{EB}}[\text{EB}] = K_{\text{app}}[\text{complexo}]$$

onde $K_{\text{EB}} = 1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[\text{EB}] = 5 \mu\text{M}$, K_{app} é a constante de ligação aparente e $[\text{complexo}]$ é a concentração de complexo que suprime 50% da fluorescência do complexo EB-DNA.

b) *Interação com DNA - Titulação espectrofotométrica na região UV-visível*

A verificação da interação dos complexos com *fs*-DNA (*Fish Sperm* DNA, DNA de esperma de peixe) por espectroscopia de absorção na região do UV-visível foi feita de acordo com o descrito na literatura (TANIMOTO et al., 2012; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Nesse experimento, titulou-se soluções 10 μM dos complexos 1-6 (1% de DMSO, tampão tris 50 mM, 5 mM de NaCl, pH 7,4) com alíquotas de 2 μL de uma solução 47

mM de *fs*-DNA (tampão tris 50 mM, 5 mM de NaCl, pH 7,4), numa faixa de concentrações de 31,1-309 μ M.

A preparação da solução de *fs*-DNA é bastante simples, quando comparada à de *ct*-DNA (*Calf Thymus* DNA, DNA de timo de bezerro) (TANIMOTO et al., 2012). O DNA de espermatozoides de peixe é um pó de coloração amarelada e pode ser pesado de acordo com a concentração desejada. Para tanto, dissolveu-se 10 mg do *fs*-DNA em 10 mL do tampão tris, agitando-se a solução no vórtex até que não se observasse mais sólido em suspensão. A solução foi mantida em gelo durante a realização de todo o experimento, e utilizada por menos de quatro dias. Sua concentração foi determinada pela Lei de Lambert-Beer, $c = \frac{A}{\epsilon b}$, onde A é a absorção em 260 nm, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar do DNA em 260 nm ($6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e b é o caminho óptico da cubeta utilizada na leitura. A razão $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,5$ garante que o DNA está livre de proteínas (desenovelado das histonas) e bom para prosseguir nas análises.

Após a coleta dos espectros, os dados foram tratados de acordo com o modelo de Benesi-Hildebrand (BENESI; HILDEBRAND, 1949), que relaciona a variação da absorbância com a constante de ligação do complexo ao DNA, como mostra a Equação 3:

Equação 3

$$\frac{A}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} \times \frac{1}{K[DNA]}$$

onde A_0 é a absorbância do comprimento de onda estudado na ausência do DNA, A é do comprimento de onda estudado após as sucessivas adições de DNA, ϵ_G é o coeficiente de absorvidade molar do comprimento de onda estudado, ϵ_{GH} é o coeficiente de absorvidade molar do comprimento de onda estudado para o aduto complexo-DNA e K é a constante de ligação, dada pela razão entre os coeficientes linear e angular do gráfico $\frac{A}{A-A_0}$ versus $\frac{1}{[DNA]}$.

O experimento foi realizado em três temperaturas (25, 30 e 37 °C) para todos os complexos, e, portanto, através da equação de van't Hoff (Equação 4), foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos da interação dos complexos DNA

Equação 4

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

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

Calcula-se a variação entalpia através do coeficiente angular da reta de $\ln K_b$ versus $\frac{1}{T}$, e a variação de entropia pelo coeficiente linear deste mesmo gráfico. A partir dos valores obtidos, calcula-se a variação de energia através da Equação 5:

Equação 5

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

c) *Interação com plasmídeo pUC 19*

O estudo de interação com DNA plasmidial foi realizado juntamente com Ms. Elise Marques, em colaboração com o Prof. Dr. Arthur H. Cavalcante de Oliveira (DQ-FFCLRP-USP)

O estudo de interação dos complexos 1-6 com o plasmídeo pUC 19 foi feito com intuito de verificar se os compostos eram capazes de clivar o DNA circular. O experimento foi realizado de acordo com o descrito na literatura (ICSEL; YILMAZ, 2013), e, além da eletroforese em gel de agarose, utilizou-se também a Microscopia de Força Atômica para verificar possíveis mudanças na morfologia do DNA (BENÍTEZ et al., 2009b).

Para preparar o gel de agarose 0,8%, utilizou-se 0,28 g de agarose, que foi dissolvida em 35 mL solução 1:50 tampão TAE 50×1 (pH 8) : água MilliQ®. A mistura foi colocada no forno de microondas durante um minuto, e, após esse período, deixada resfriando até 40 °C, quando foi colocada na cuba eletroforética e lá mantida até que o processo de polimerização terminasse.

Num primeiro experimento, o plasmídeo pUC 19 ($10,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) foi incubado no termociclador a 37 °C com diferentes concentrações de cisplatina e do complexo 4 durante 2 e 24 h. Então, alíquotas de 2 μL foram retiradas e a elas adicionou-se o *loading*

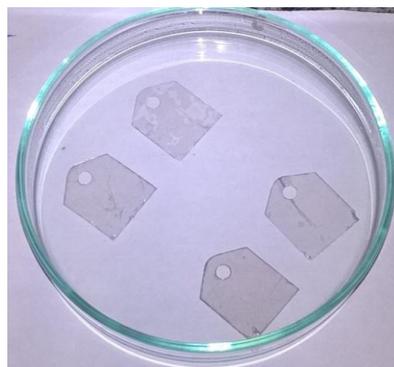
¹ O tampão TAE 50x é preparado utilizando-se tampão tris, EDTA e ácido acético glacial

buffer (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose), cuja função, além de marcar visualmente o DNA, é torná-lo mais “pesado”, prevenindo que ele escape do gel de agarose durante a eletroforese. Tendo em vista que o composto 4 não clivou o DNA nas concentrações utilizadas, na segunda etapa do estudo fez-se a avaliação dos complexos 1-6 com $r=5$, onde $r = \frac{[\text{complexo}]}{[\text{DNA}]}$, repetindo o mesmo procedimento do experimento anterior.

A revelação do gel de agarose após a eletroforese é feita com brometo de etídio. O gel deve ser retirado da cuba e deixado em contato com uma solução de brometo de etídio durante dez minutos e, depois, mais quinze minutos em contato com água deionizada para retirar o excesso do fluoróforo. Então o gel corado com o brometo de etídio é colocado num transiluminador UV e fotografado para análise posterior.

Para as análises de Microscopia de Força Atômica, utilizou-se pequenas placas de mica (Figura 77), que são divididas em duas imediatamente antes do uso, evitando, dessa forma, que haja contaminações de qualquer natureza. Gotejou-se 2 μL da solução contendo o DNA sobre a mica, deixando-se o solvente evaporar. As análises foram feitas num equipamento SPM-9600, da Shimadzu, no modo *tapping* (onde a ponteira faz contato intermitente com a amostra). Para a análise foram utilizadas pontas de silício da Nanosensors, tipo PPP-NCHR.

Figura 77. Mica utilizada como porta-amostras na Microscopia de Força Atômica



Fonte: Autora

d) *Interação com albumina de soro humano (HSA)*

Os estudos de interação com albumina foram realizados pela Ms. Natacha Cacita.

A interação dos complexos 1-6 com HSA foi investigada através de titulação espectrofotométrica, acompanhada por espectroscopia de fluorescência, de acordo com o descrito na literatura (CACITA; NIKOLAOU, 2016).

Preparou-se uma solução 1 μM de HSA em tampão tris (pH 7,4), e uma solução estoque dos complexos 1-6 em DMSO (1 mM). A interação foi observada a partir da titulação da solução de albumina com alíquotas de 3 μL da solução estoque dos complexos, atingindo uma faixa de concentrações de 2×10^{-3} - 2×10^{-2} μM . A porcentagem final de DMSO nos experimentos foi menor do que 2%.

Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados em um intervalo de 300 a 500 nm, com λ_{exc} 280 nm. A intensidade de fluorescência foi ajustada pela Equação 6, para minimizar a influência do Efeito Filtro.

Equação 6

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} + \exp\left[\frac{A_{\text{em}} + A_{\text{ex}}}{2}\right]$$

onde, F_{cor} e F_{obs} as intensidades de fluorescência corrigida e observada, A_{em} e A_{ex} as absorvâncias das amostras (HSA e complexo) nos comprimentos de onda de emissão e excitação respectivamente (LAKOWICZ, 2006).

Os valores das intensidades de fluorescência na ausência e na presença de quantidades progressivas de complexos foram utilizados no modelo de Stern-Volmer (Equação 7 e Equação 8) para supressão de fluorescência, utilizado para determinação das constantes K_{sv} (constante de Stern-Volmer), K_b (constante de ligação) e n (número de moléculas por sítio da proteína).

Equação 7

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

Equação 8

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

Onde, F e F_0 são, respectivamente, intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor, K_{sv} é a constante de Stern-volmer, K_b é a constante de ligação

aparente do supressor à HSA, [S] é a concentração do supressor, que, neste caso, são os complexos 1-6 e n a estequiometria da interação.

A determinação dos parâmetros termodinâmicos seguiu exatamente o que foi descrito em “*Interação com DNA - Titulação espectrofotométrica na região UV-visível*” e pode ser aplicado para a interação com albumina (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981; PAN et al., 2010).

3. Instrumentação

- Espectrofluorímetro, modelo *RF-5301PC*, Shimadzu;
- Espectrofotômetro UV-visível-NIR, modelo *HP8453*, Agilent;
- Espectrofotômetro, modelo *UV-vis 1800*, Shimadzu;
- Cuba eletroforética, *mini sub cell gt*, BioRad;
- Termociclador, *MyCycler*, BioRad;
- Transiluminador, *UV Transilluminator 2000*, BioRad;

2. Resultados e discussão

1. Interação com DNA

A avaliação da interação dos complexos 1-6 com DNA foi um passo imprescindível no desenvolvimento deste trabalho. As estruturas dos complexos com ligantes azanaftalenos aqui apresentados foram planejadas com a finalidade de terem pontes hidrofóbicas para interação com biomoléculas, mas a estrutura planar dos ligantes sugeria que os compostos seriam bons intercaladores de DNA, como já observado na literatura para compostos com fenazinas (BENÍTEZ et al., 2009b). Aliados a essa observação, os excelentes resultados nos ensaios biológicos também indicavam que os ligantes azanaftalenos potencializaram o efeito dos complexos, principalmente quando comparados a complexos análogos $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]^+$, onde L = imidazol, pirazol, tiazol, oxazol, benzimidazol, benzopirazol, benzotiazol e benzoxazol (TAUCHMAN et al., 2014).

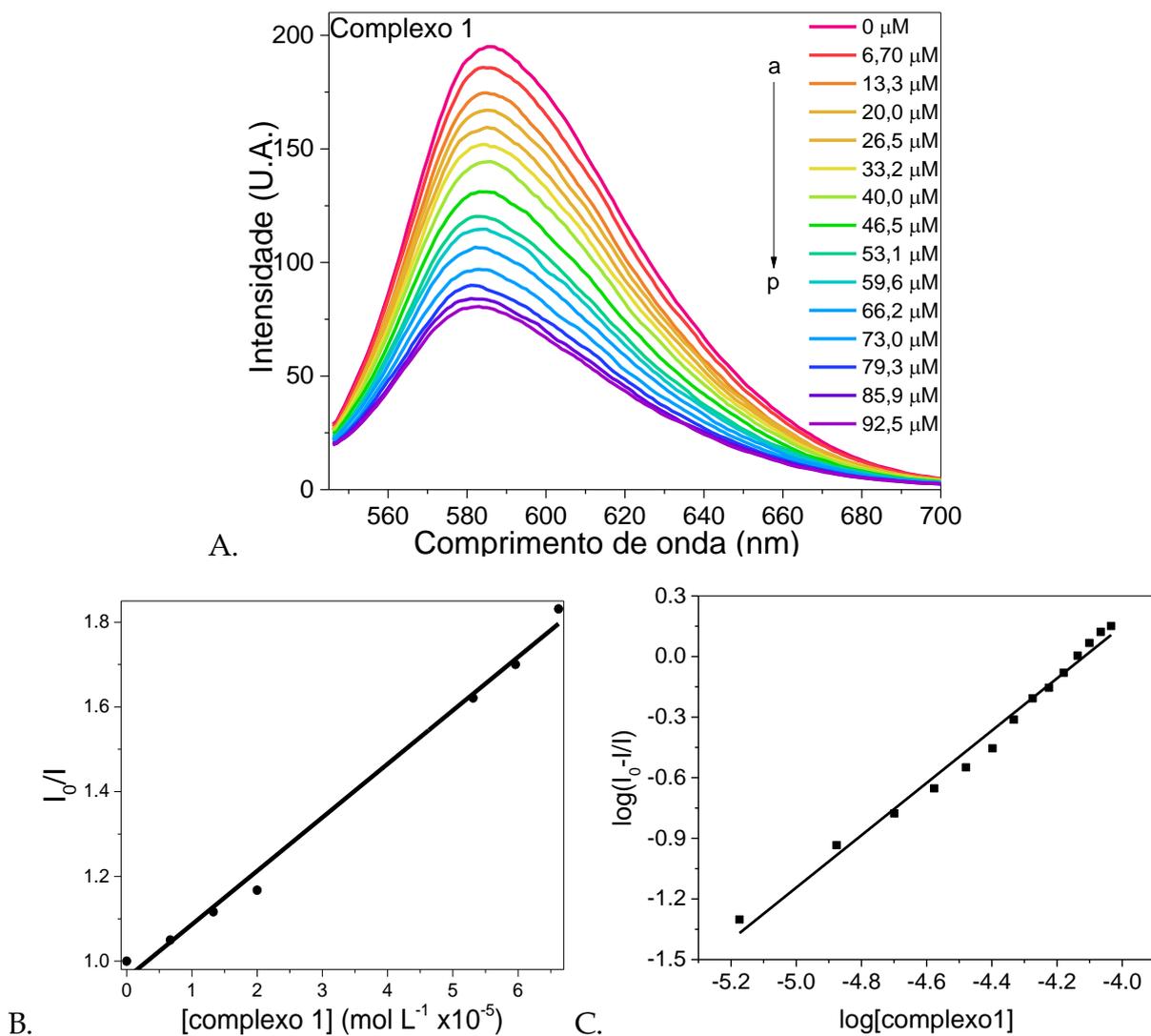
O primeiro passo para a avaliação da interação com DNA foi escolher qual tipo de DNA seria utilizado. Apesar do *ct*-DNA ser amplamente utilizado (SIRAJUDDIN; ALI;

BADSHAH, 2013), o altíssimo custo e impossibilidade de armazená-lo depois de aberto, uma vez que ocorre degradação, mesmo mantendo-o no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 126, ANEXO III) são fatos que devem ser levados em conta. Embora o *ct*-DNA seja retirado de um mamífero, não se pode justificar seu uso com base nisso, uma vez que a composição do DNA é a mesma, independente da fonte. Desta forma, uma boa opção é o *fs*-DNA, que é comercializado na forma de pó, podendo ser pesado de acordo com a necessidade de quem realiza o experimento e com um preço acessível (“Deoxyribonucleic acid from fish sperm | Sigma-Aldrich”). O DNA apresenta uma intensa banda de absorção em 260 nm devido às transições eletrônicas das bases nitrogenadas (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Com um valor de absorvidade molar conhecido, a determinação da sua concentração pode ser feita através da Lei de Lambert-Beer, como já apontado anteriormente. A razão $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,5$ mostra que o DNA está desovelado das histonas e pronto para ser utilizado nos experimentos de titulação, porém, por vezes, apenas a análise espectrofotométrica não é suficiente para determinar a integridade do DNA, que mesmo completamente desnaturado mantém a banda em 260 nm. Uma boa prática antes de qualquer experimento é verificar a integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose.

O primeiro experimento realizado utilizando o *fs*-DNA foi o de deslocamento do brometo de etídio, cujo objetivo é avaliar se um composto é um bom intercalador de DNA a ponto de substituir o brometo de etídio no interior da molécula. O brometo de etídio é um intercalador amplamente utilizado na rotina dos laboratórios de biologia molecular como marcador de DNA, porque, quando livre, tem sua fluorescência suprimida pelas moléculas de solvente, e intercalado às moléculas de DNA, a intensidade de fluorescência é bastante aumentada. Este é, justamente, o princípio do modelo (GAO et al., 2009; ICSEL; YILMAZ, 2013; WANG; GAO, 2014; SINGH; SRIVASTAVA; PATRA, 2016). Com relação à metodologia, não há um consenso sobre qual deve ser o excesso do titulante, concentração de DNA e de brometo de etídio. Desta forma, o excesso de complexo utilizado aqui foi dependente da porcentagem máxima de DMSO, utilizado como co-solvente. A faixa de concentrações utilizada foi de 5-93,2 μM , podendo variar em função da saturação do sistema. As figuras abaixo e a Tabela 19

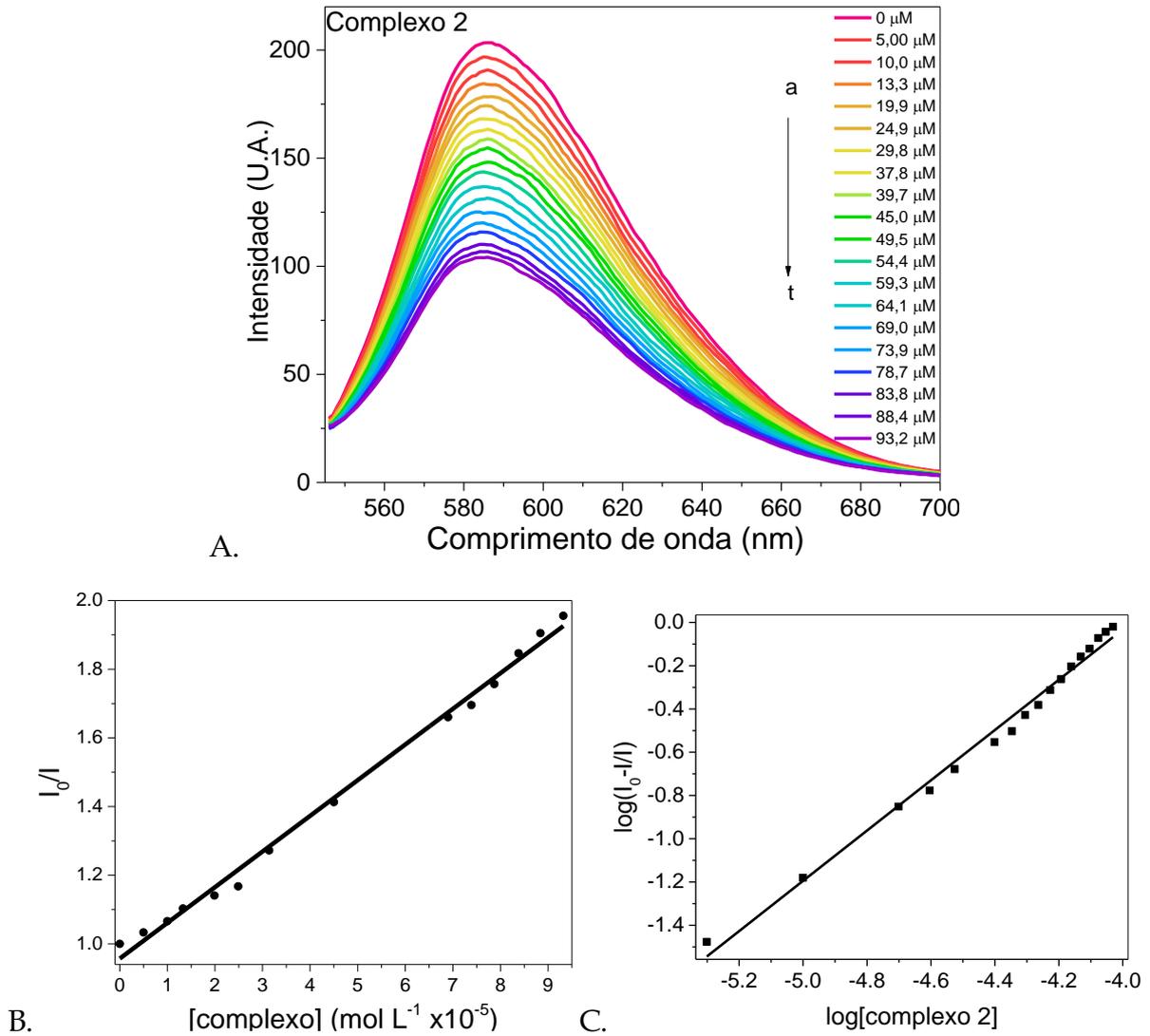
sumarizam os resultados encontrados para a série de complexos simétricos com ligantes azanaftalenos:

Figura 78. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 1 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-92,5 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas



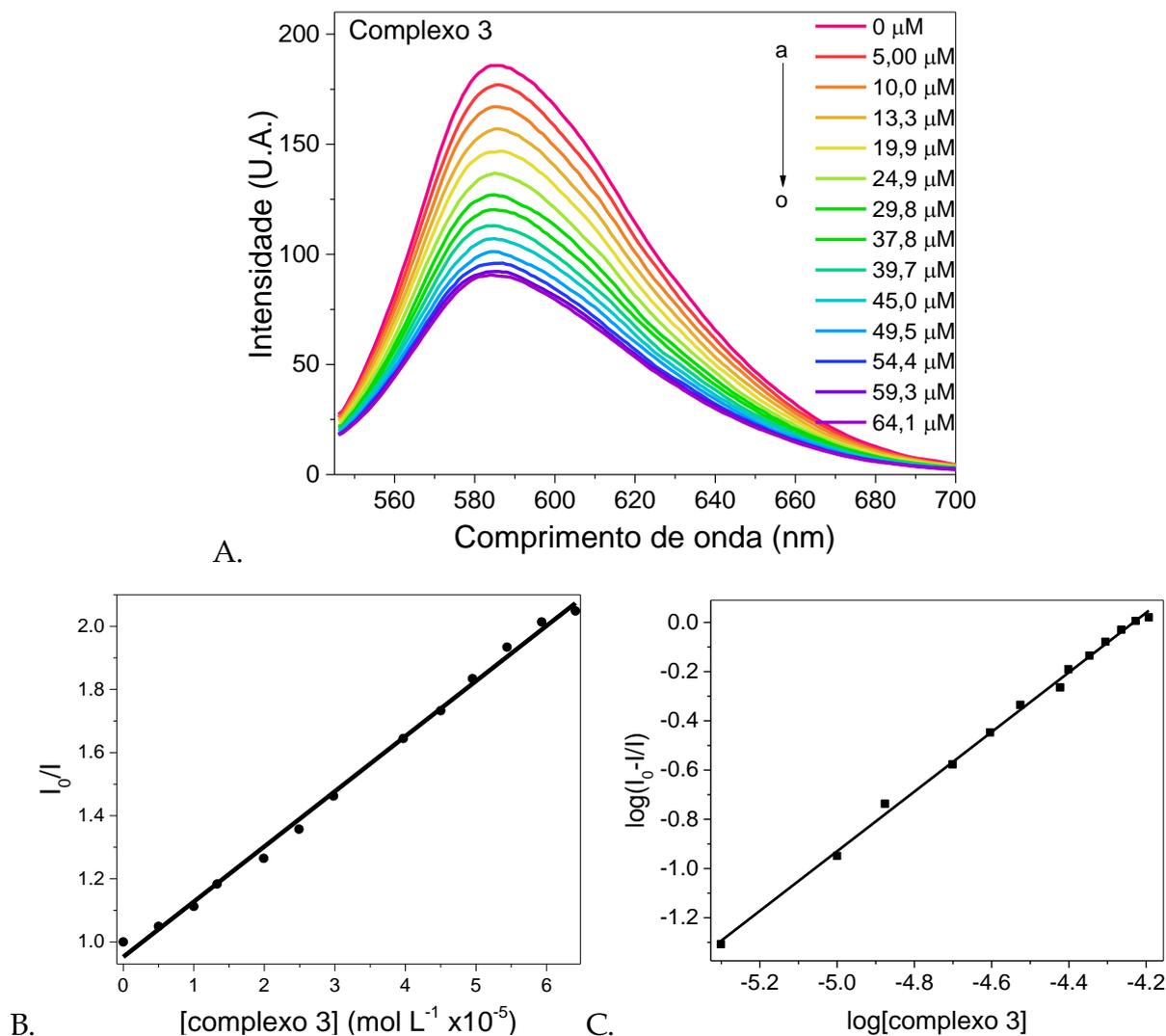
Fonte: Autora

Figura 79. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 2 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-93,5 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas



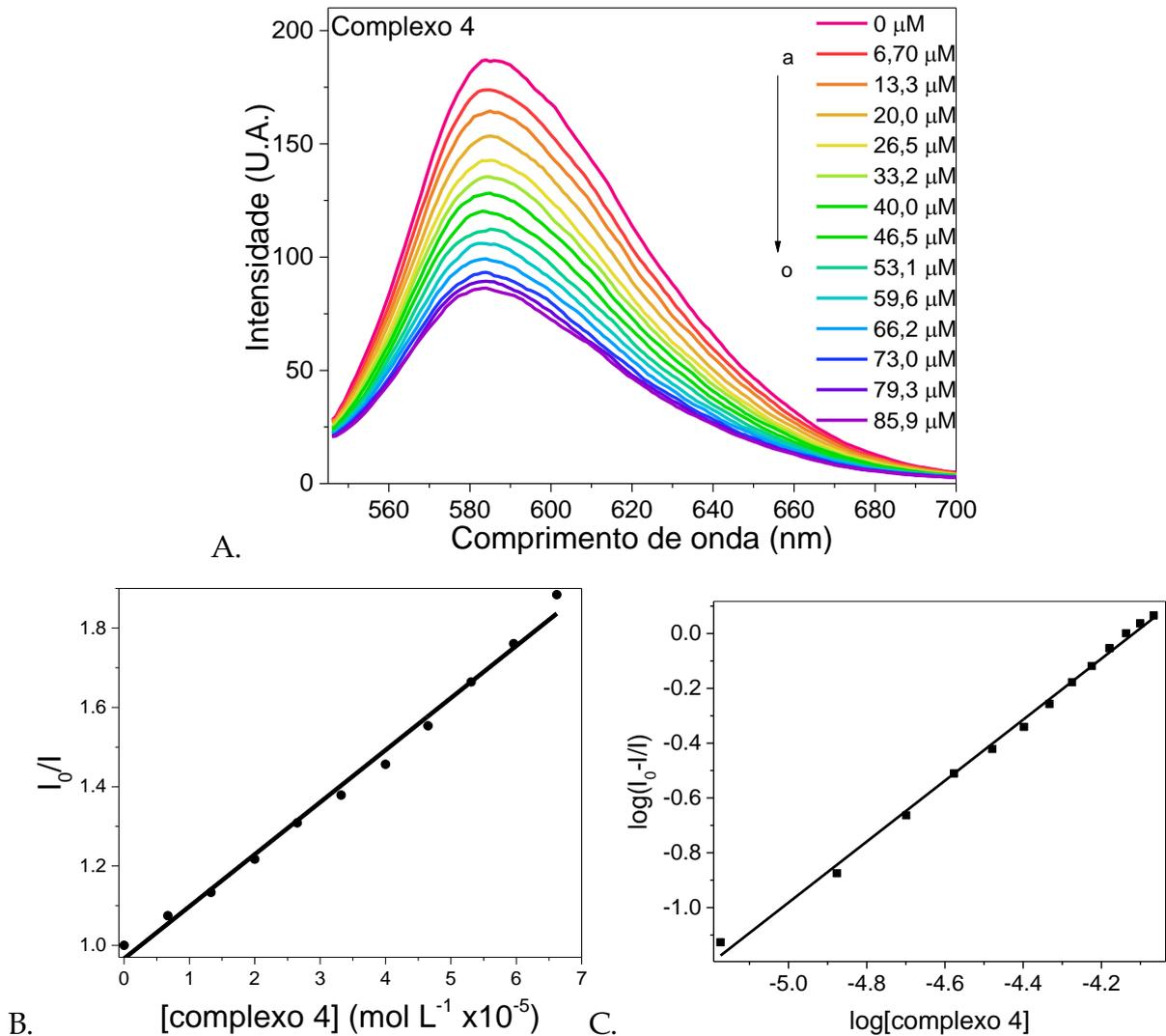
Fonte: Autora

Figura 80. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 3 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-64,1 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas



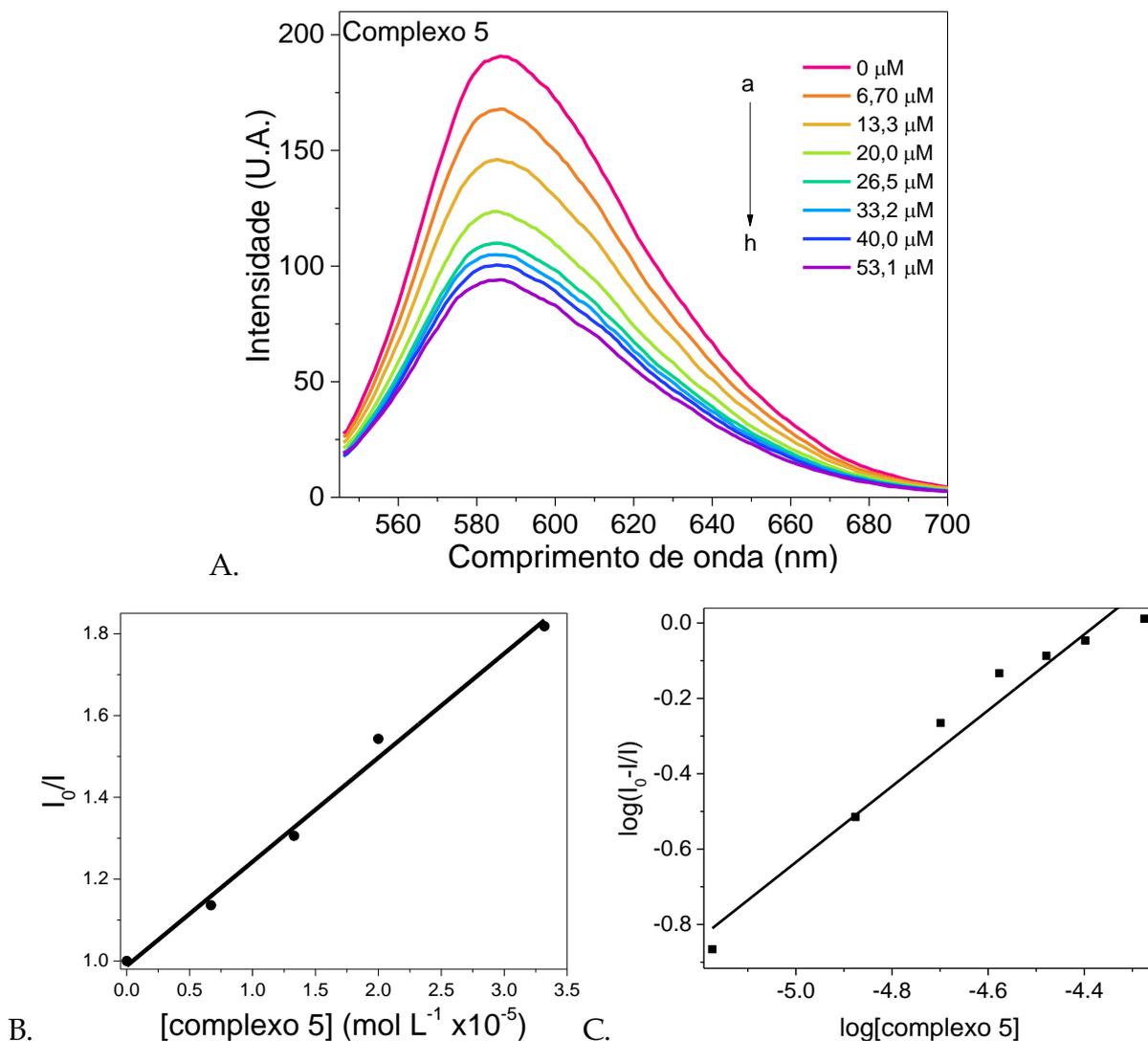
Fonte: Autora

Figura 81. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 4 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-85,9 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas



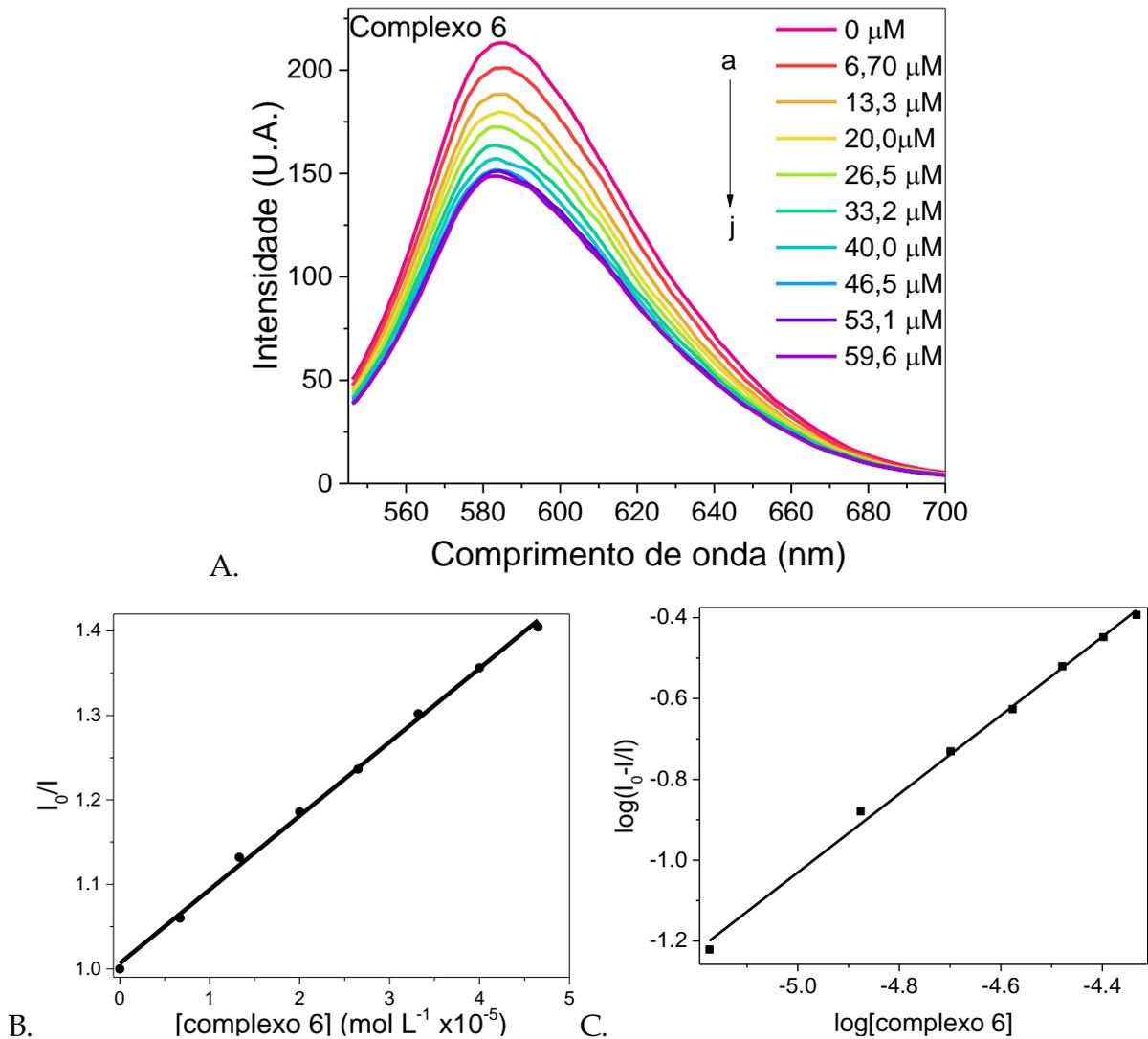
Fonte: Autora

Figura 82. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 5 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-53,1 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas



Fonte: Autora

Figura 83. A. Titulação espectrofotométrica do complexo EB-DNA com o complexo 6 acompanhada por espectros de fluorescência feita numa faixa de concentrações do titulante de 0-59,6 μM . B. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de supressão de fluorescência e C. Gráfico do modelo de Stern-Volmer para a determinação da constante de ligação e número de moléculas de brometo de etídio deslocadas



Fonte: Autora

Tabela 19. Resumo das constantes obtidas através do modelo de Stern-Volmer para o experimento do deslocamento do brometo de etídio

Complexo	K_{sv} ($10^4 M^{-1}$)	K_b ($10^4 M^{-1}$)	n	K_{app} ($10^5 M^{-1}$)
1, qui	1,26	21,4	1,3	6,85
2, 5-nitro	1,04	4,17	1,2	5,37
3, 5-briq	1,75	13,5	1,2	9,19
4, iq	1,31	3,80	1,1	6,85
5, 5-amiq	2,55	2,51	1,0	12,5
6, thiq*	0,87	0,68	1,0	-

(*) O complexo 6 não atingiu 50% de supressão da fluorescência do complexo EB-DNA

Fonte: Autora

Os dados obtidos mostraram que os compostos 1-5 são capazes de deslocar o brometo de etídio, mas, de certa forma, foram inesperados. Considerou-se que a supressão de fluorescência do DNA ocorreu pelos dois mecanismos - estático e dinâmico-, e, dessa forma, foi possível utilizar a Equação 8 para o cálculo do K_b . Apesar de apresentarem constantes de ligação e de supressão de fluorescência na ordem de $10^4 M^{-1}$, e a literatura trazer exemplos de complexos intercaladores onde o K_{sv} e o K_b têm ordem de 10^2 e $10^3 M^{-1}$ (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; PAGES et al., 2016), nenhum dos seis compostos apresentou constantes da mesma ordem da do brometo de etídio ($10^7 M^{-1}$), ou ainda, da ordem de $10^6 M^{-1}$, como intercaladores fortes apresentam (ICSEL; YILMAZ, 2013).

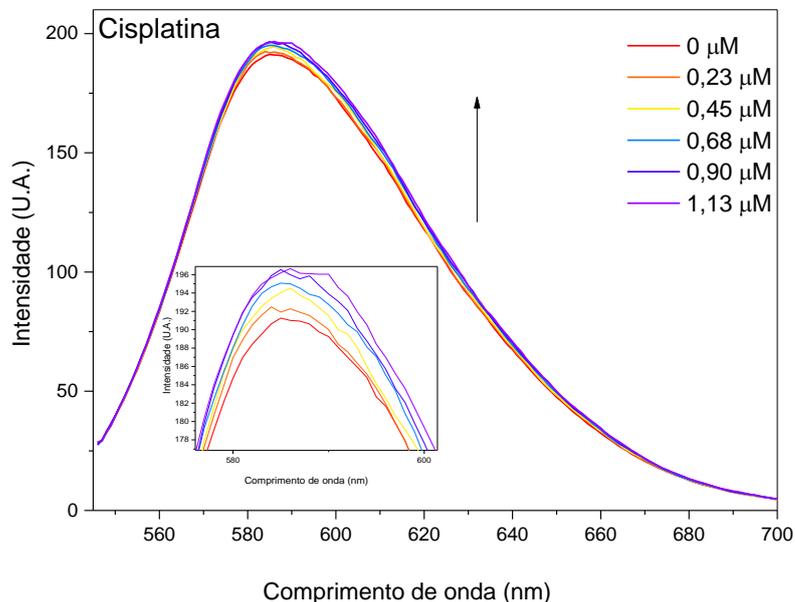
Desde o princípio do desenvolvimento deste trabalho, esperava-se que o complexo 4 fosse o intercalador mais forte, dada a estrutura planar e hidrofóbica da isoquinolina, mas o fato de o complexo 5 ter o maior valor de K_{sv} não é completamente inesperado, uma vez que os grupos amino dos ligantes 5-aminoquinolina devem facilitar a interação deste complexo com o DNA.

Os valores da constante aparente de intercalação são obtidos pela comparação aos valores já conhecidos para o brometo de etídio. O fato de nenhum deles apresentar um K_{app} da ordem de 10^7 mostra que, apesar de deslocarem o brometo de etídio, nenhum deles é um intercalador mais forte.

Um ponto muito importante a ser ressaltado é que as constantes não foram determinadas diretamente, porque, diferente dos ensaios de interação com albumina onde a proteína é fluorescente e o titulante é propriamente o supressor, no deslocamento do brometo de etídio, a medida da interação é dada indiretamente pela supressão da fluorescência do brometo de etídio. Portanto, os resultados obtidos através dele devem ser complementares às observações feitas em outros experimentos. Mas, não há dúvidas de que os dados obtidos são de extrema importância, porque, justamente por ser complementar às outras técnicas, a utilização dessa ferramenta torna o estudo mais completo.

A fim de verificar a flexibilidade da técnica, utilizou-se a cisplatina, que, sabidamente, liga-se covalentemente à molécula de DNA através das bases nitrogenadas (PIZARRO; SADLER, 2009), mas que não é um intercalador. A Figura 84 traz o resultado obtido:

Figura 84. Titulação espectrofotométrica acompanhada por espectros de fluorescência do complexo EB-DNA na presença de quantidades crescentes de cisplatina

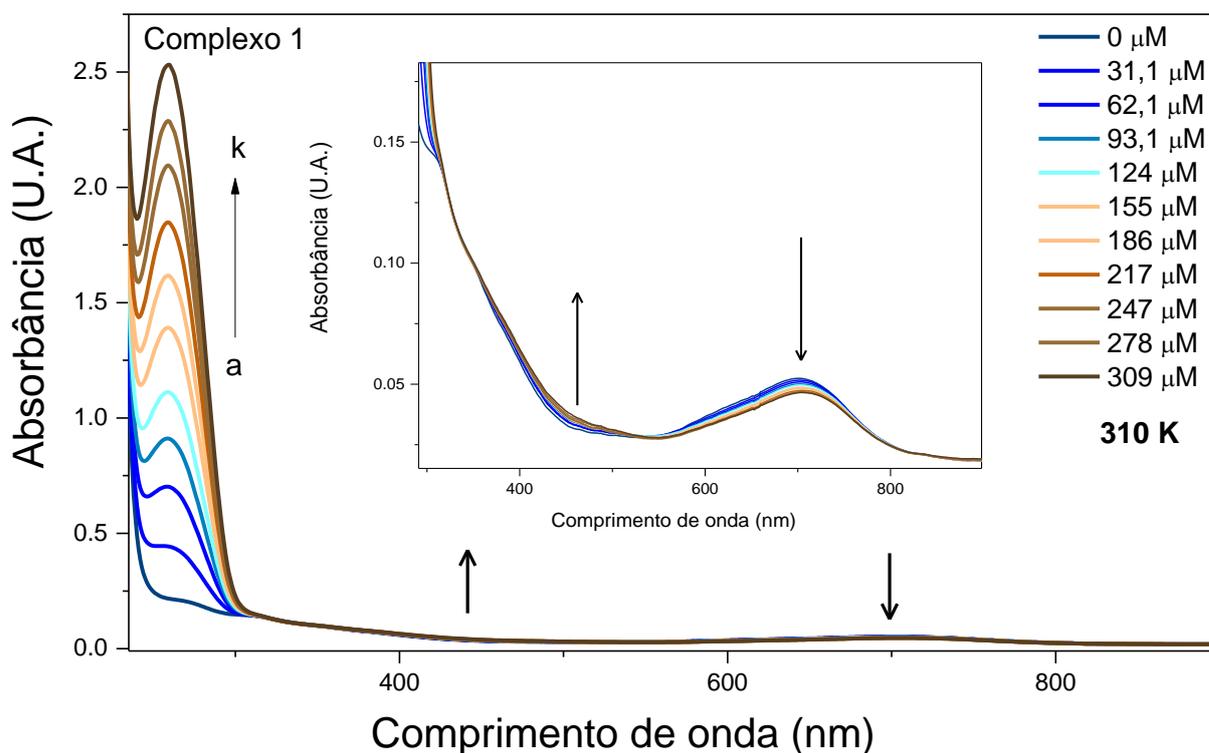


Fonte:Autora

Como pôde ser visto, a presença da cisplatina fez com que a fluorescência aumentasse, provavelmente porque sua ligação ao DNA permitiu que mais moléculas de brometo de etídio, eventualmente em solução, se intercalassem à dupla fita.

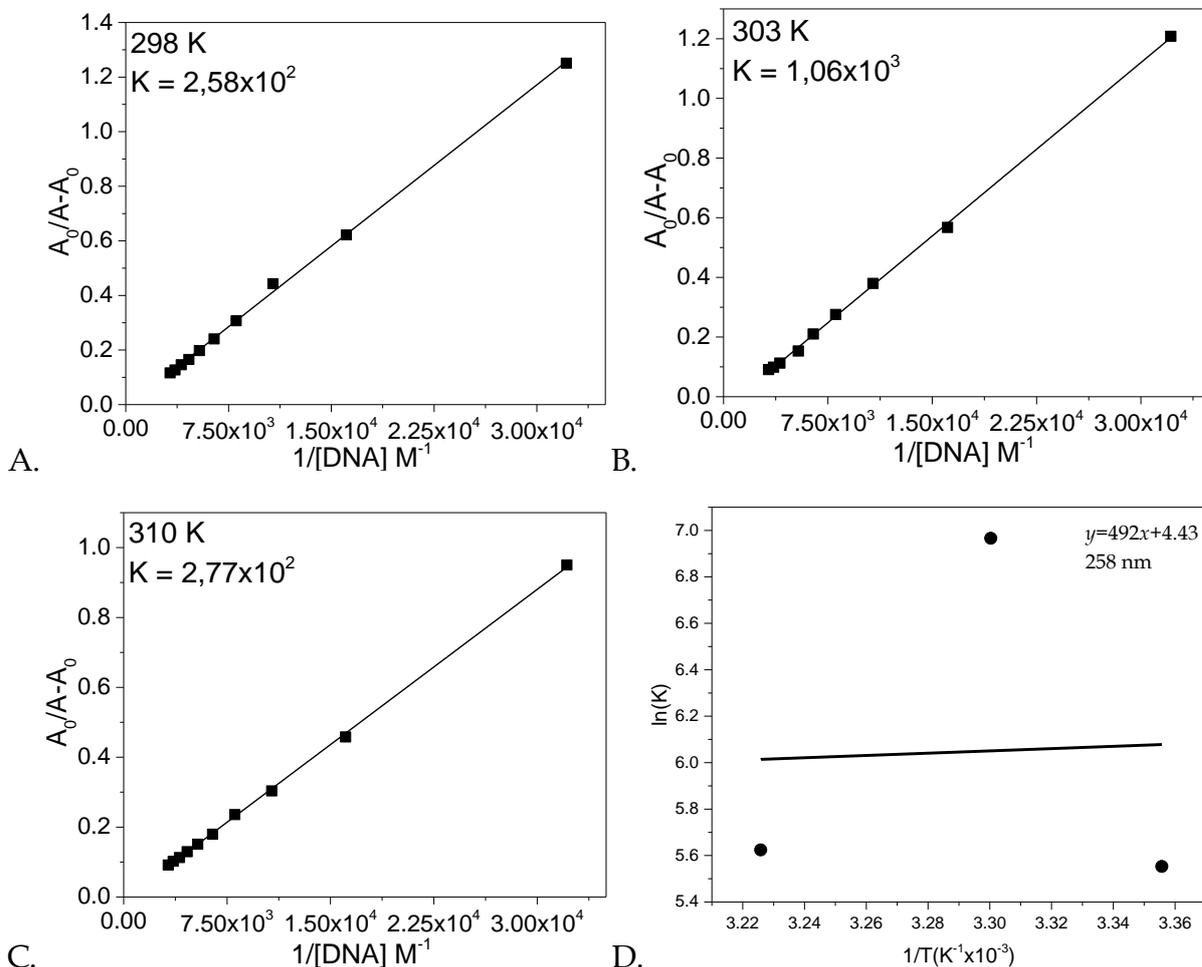
O próximo experimento realizado foi a titulação espectrofotométrica dos complexos 1-6 com *fs*-DNA. Este é um estudo ainda mais amplamente utilizado do que o anterior (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013), onde utilizam-se modelos matemáticos, neste caso, o modelo de Benesi-Hildebrand (Equação 3), para tratar a variação espectral em função da presença do DNA e extrair a constante de ligação da interação, cujo valor, em três temperaturas diferentes, fornece subsídio para utilização da equação de van't Hoff (Equação 4) e, conseqüentemente, a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação. As figuras abaixo trazem os espectros de absorção em 37 °C e as curvas obtidas através da aplicação do modelo de Benesi-Hildebrand e da equação de van't Hoff e a Tabela 20 sumariza os resultados obtidos. As variações espectrais em 25 °C e em 30 °C estão disponíveis no ANEXO III.

Figura 85. Titulação espectrofotométrica, a 37 °C, do **complexo 1** com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. *Inset*. Ampliação da variação espectral na região de 700 nm



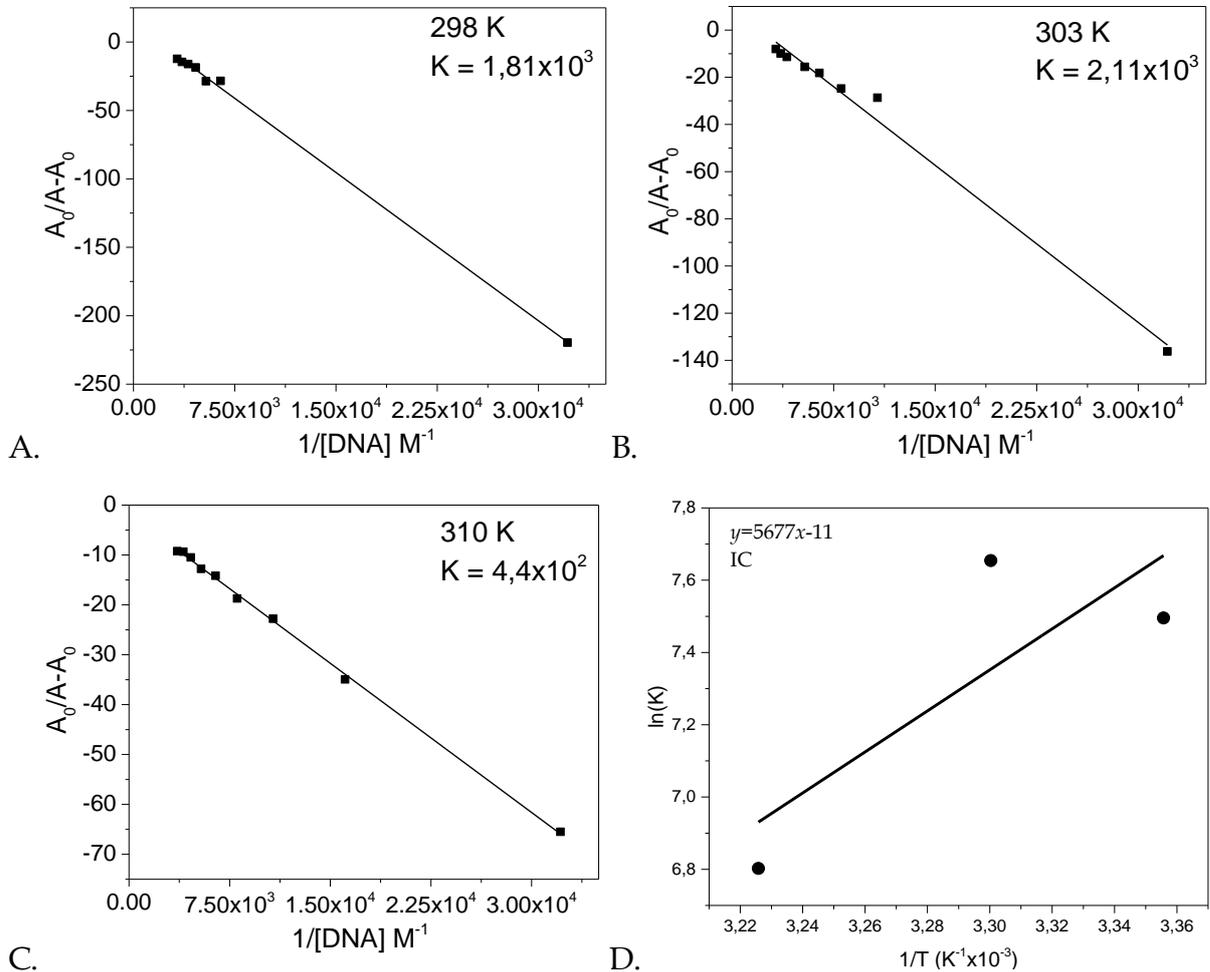
Fonte: Autora

Figura 86. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 258 nm do complexo 1 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



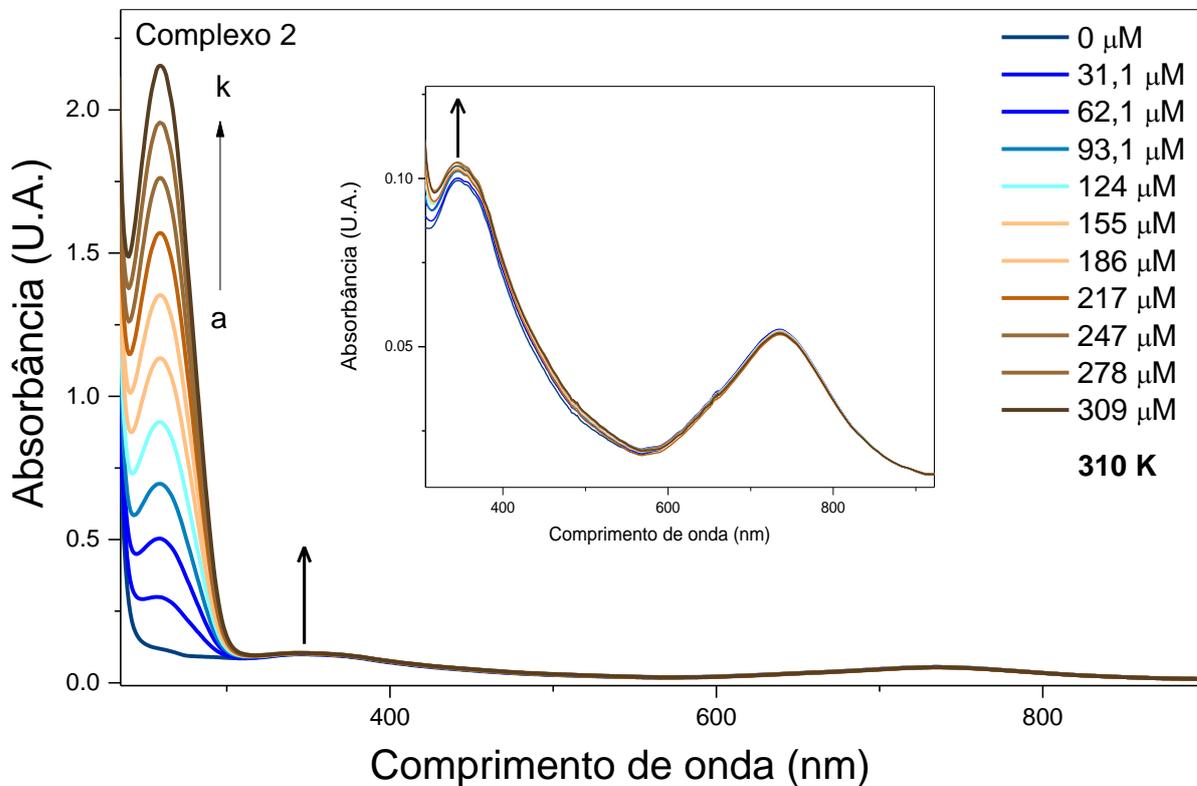
Fonte: Autora

Figura 87. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 1 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



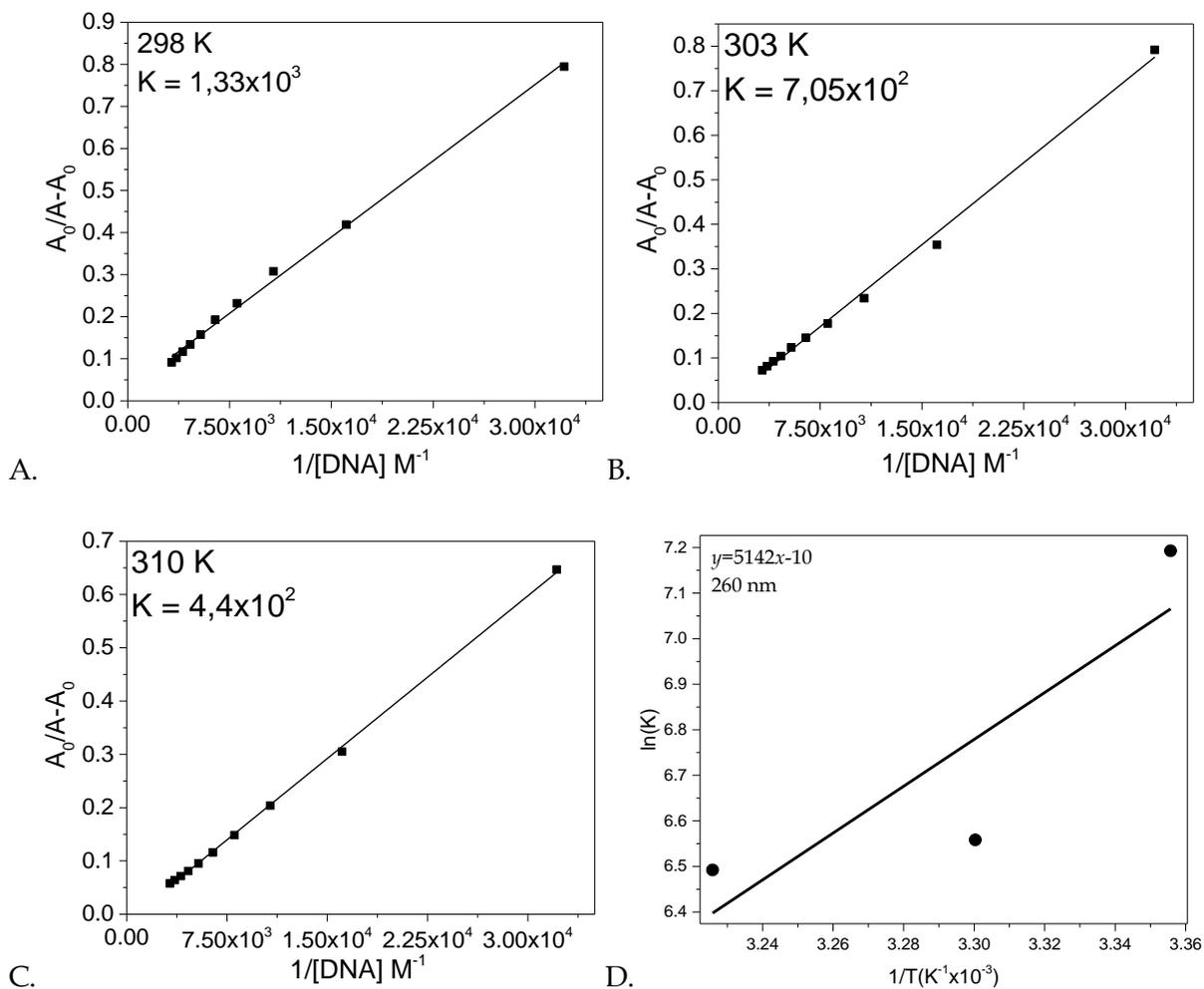
Fonte: Autora

Figura 88. Titulação espectrofotométrica do **complexo 2** com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. *Inset*. Ampliação da variação espectral na região de 350 nm



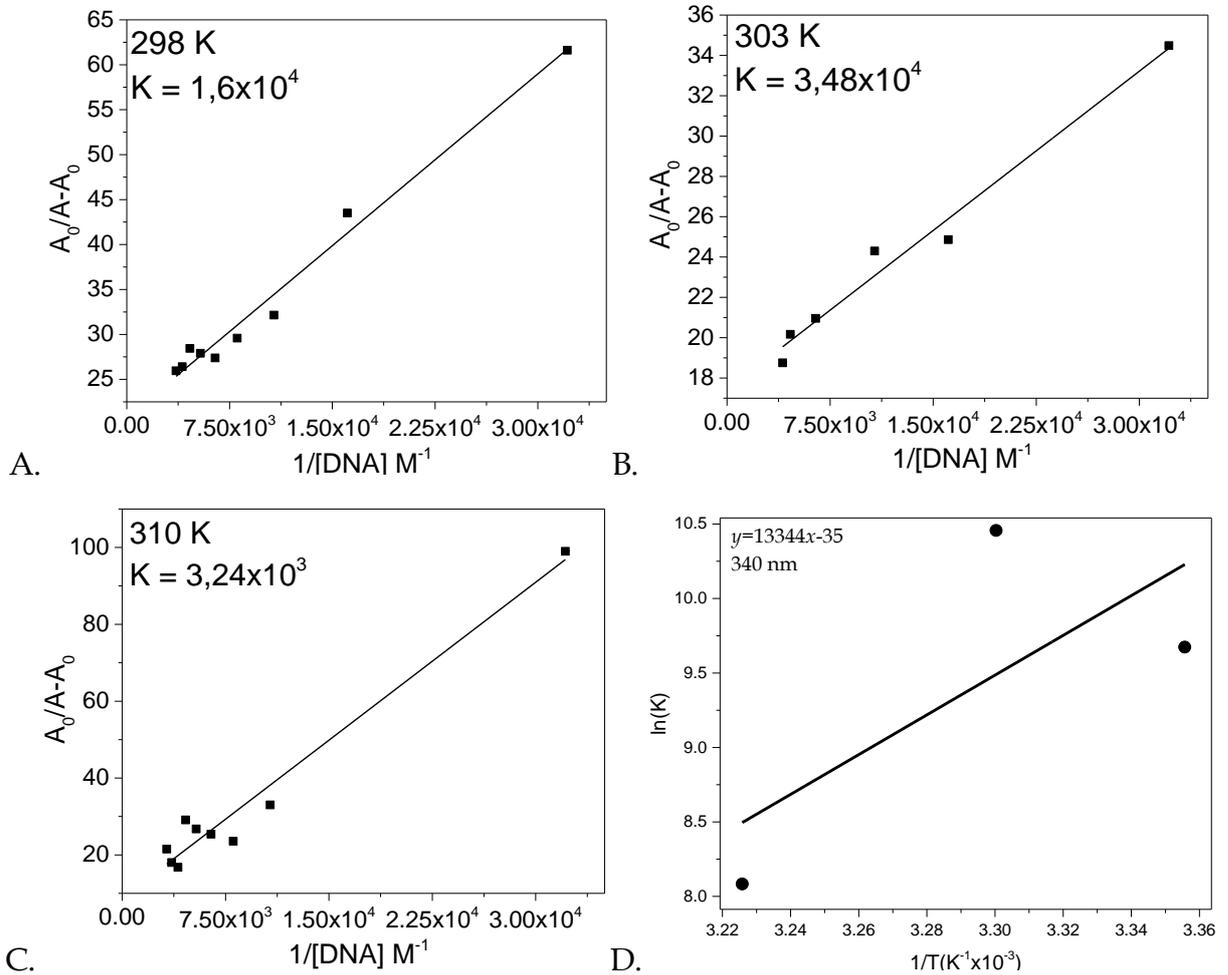
Fonte: Autora

Figura 89. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo 2 durante a titulação com o *fs*-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



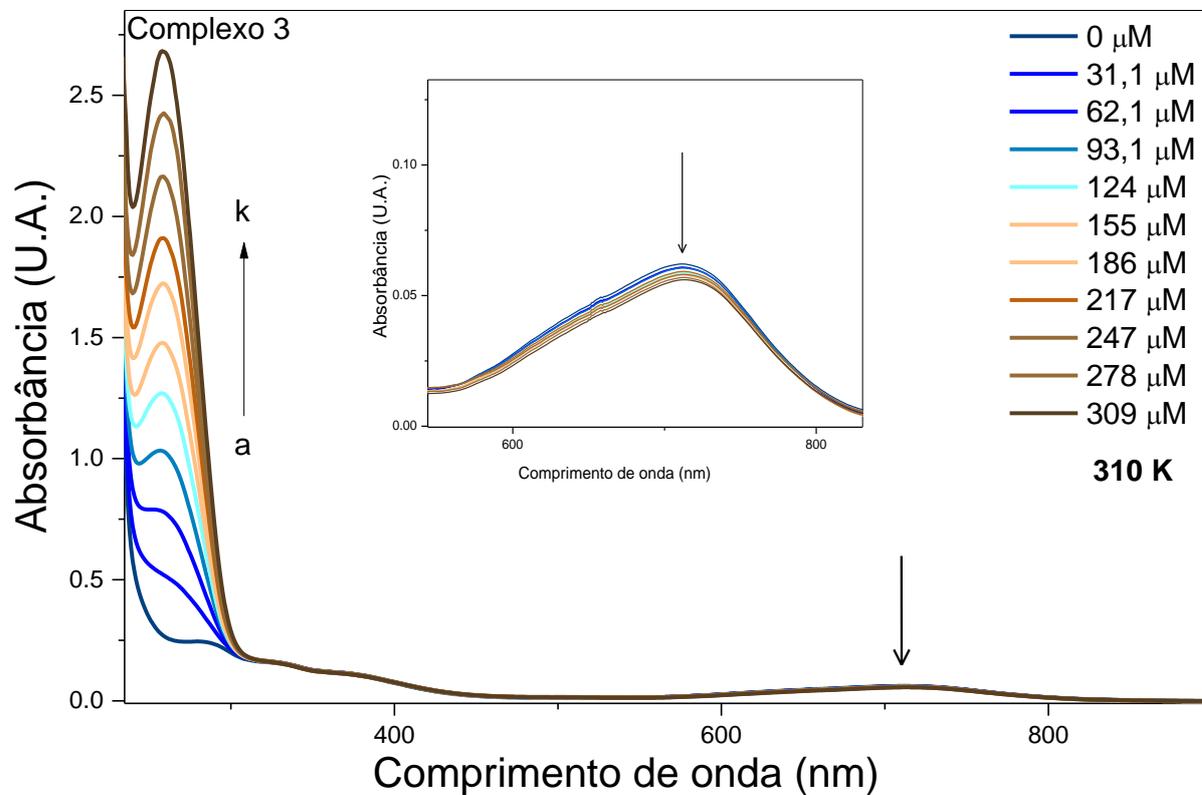
Fonte: Autora

Figura 90. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 340 nm do complexo 2 durante a titulação com o *fs*-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



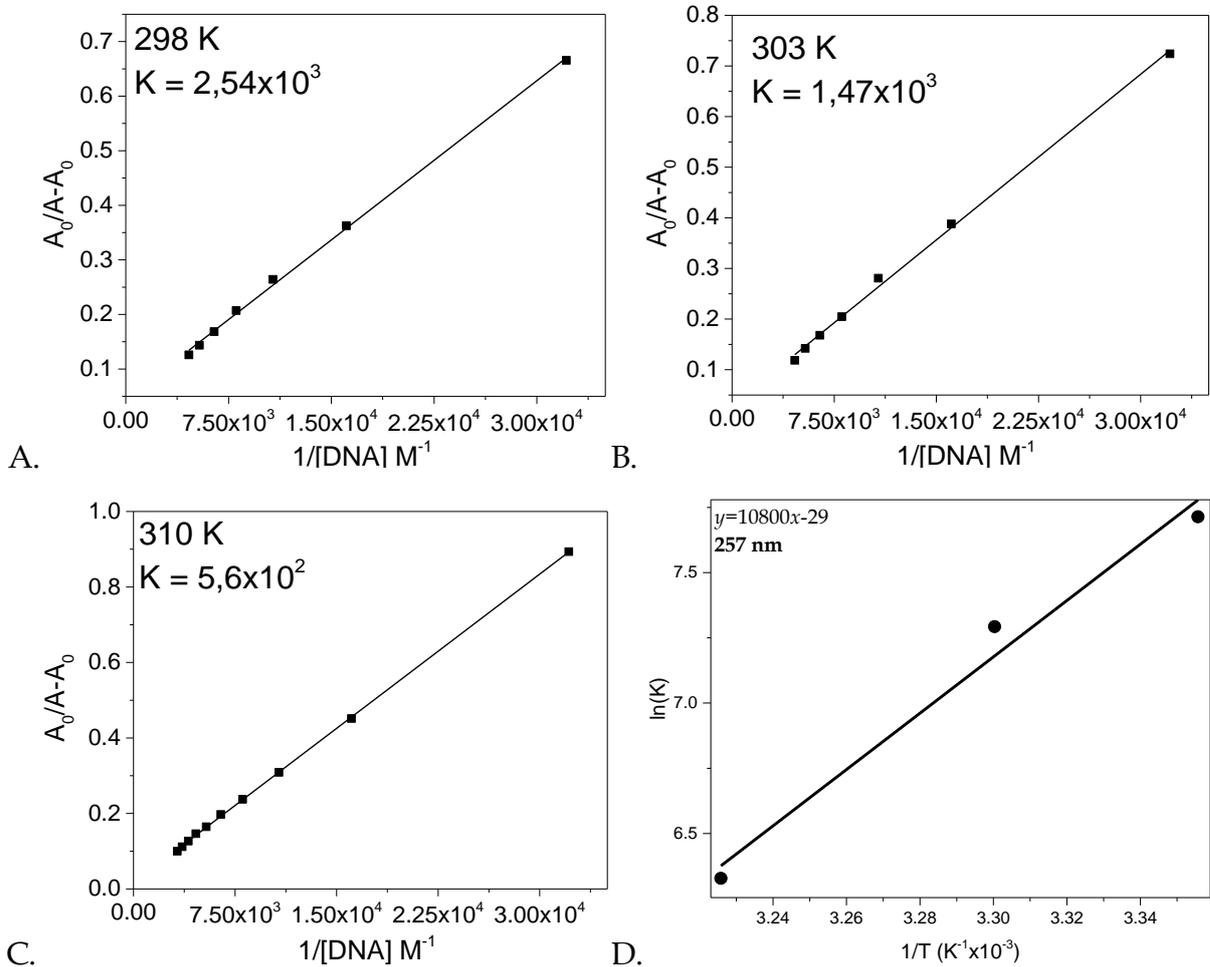
Fonte: Autora

Figura 91. Titulação espectrofotométrica do **complexo 3** com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. *Inset*. Ampliação da variação espectral na região de 700 nm



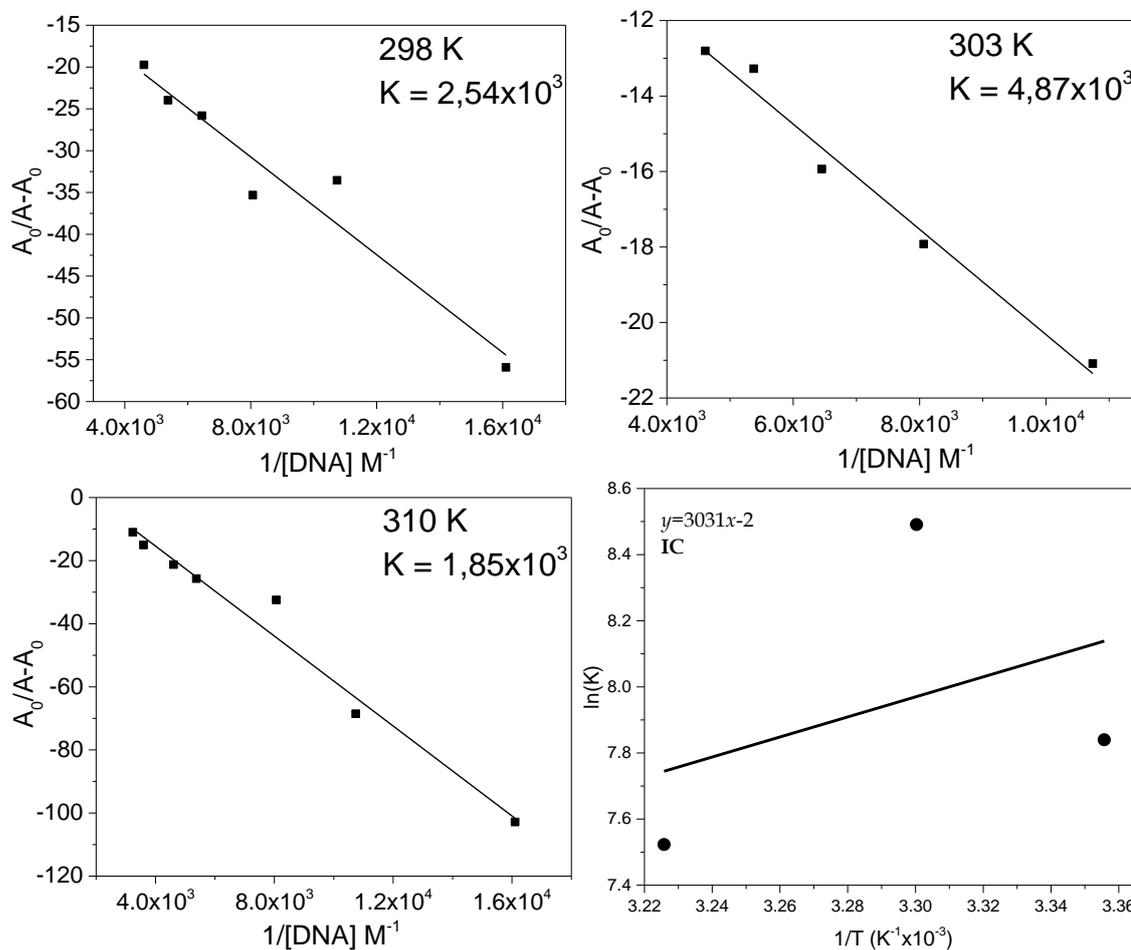
Fonte: Autora

Figura 92. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 257 nm do complexo 3 durante a titulação com o *fs*-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



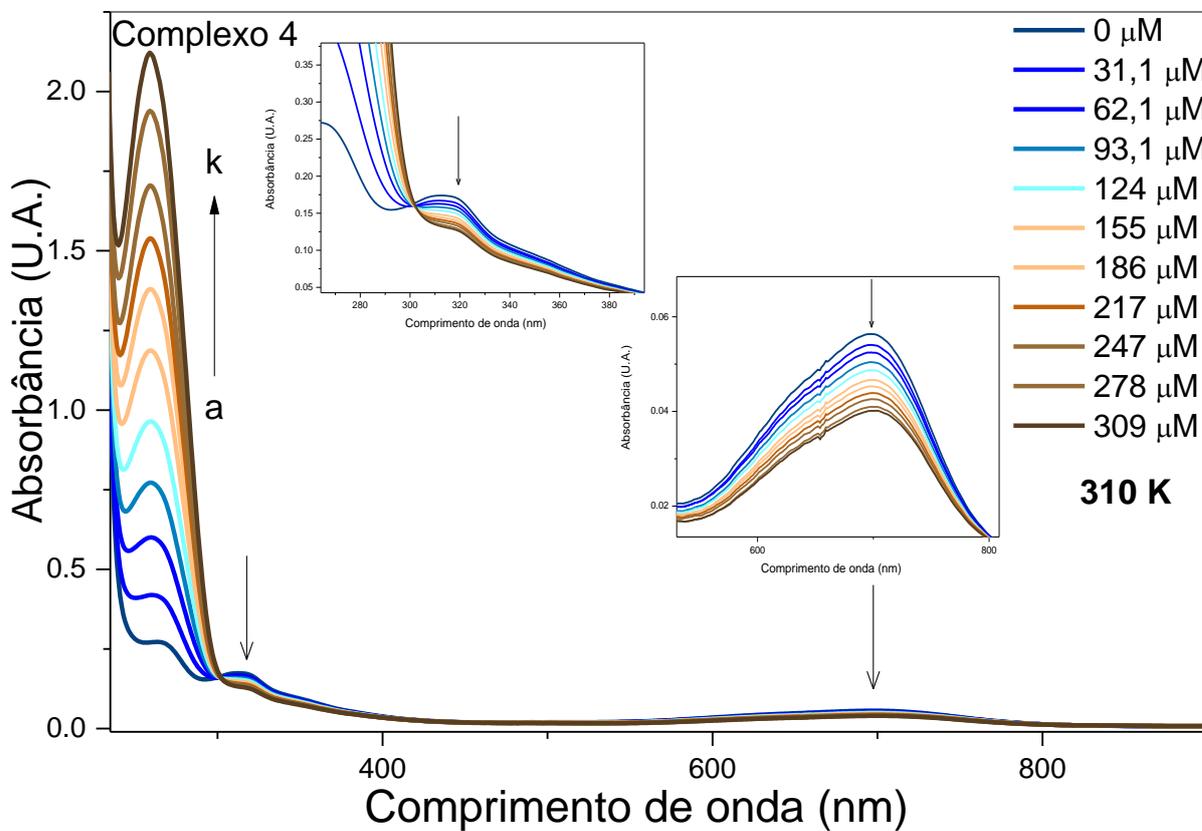
Fonte: Autora

Figura 93. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 3 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



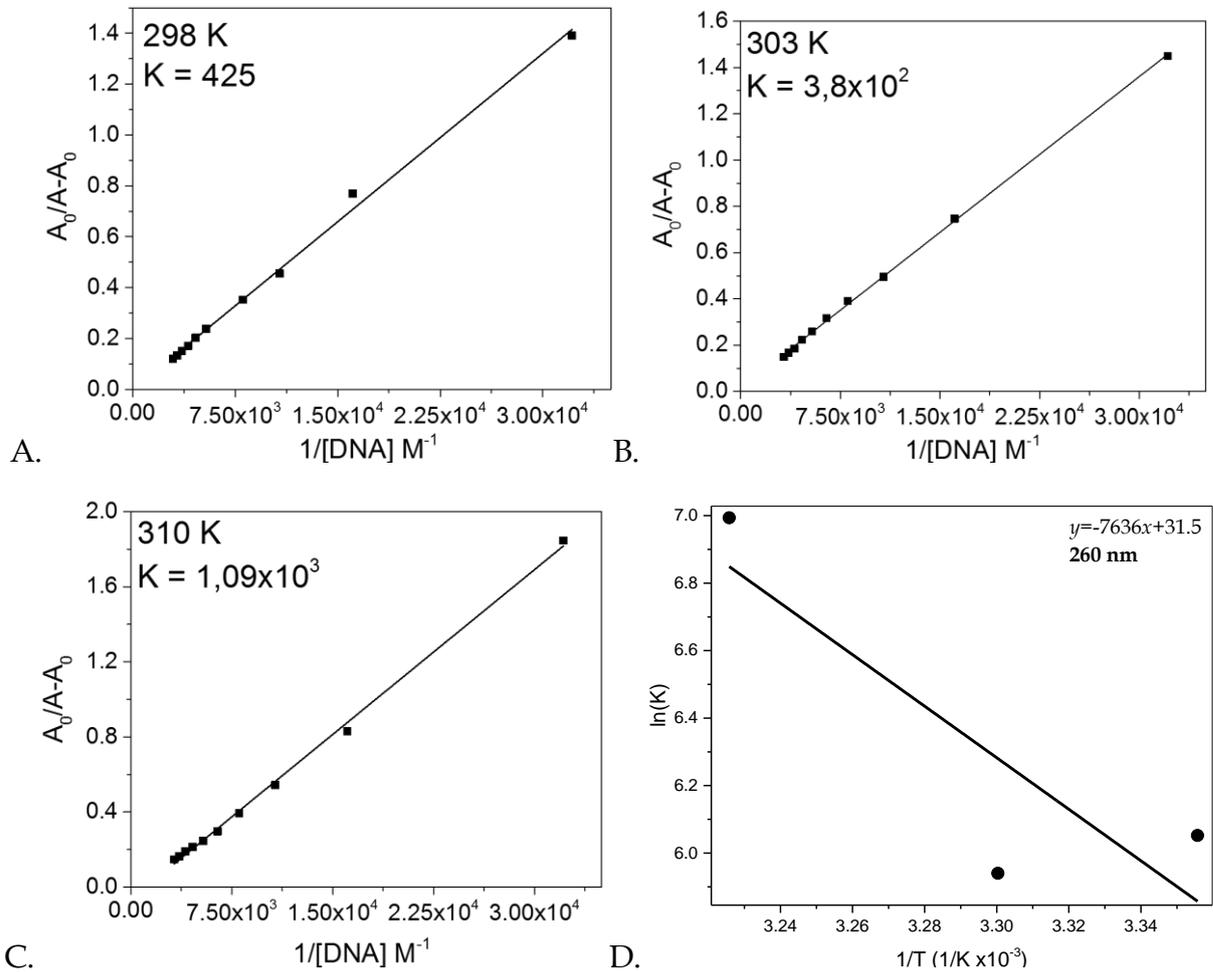
Fonte: Autora

Figura 94. Titulação espectrofotométrica do **complexo 4** com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. *Inset.* Ampliação da variação espectral na região de 320 e 700 nm



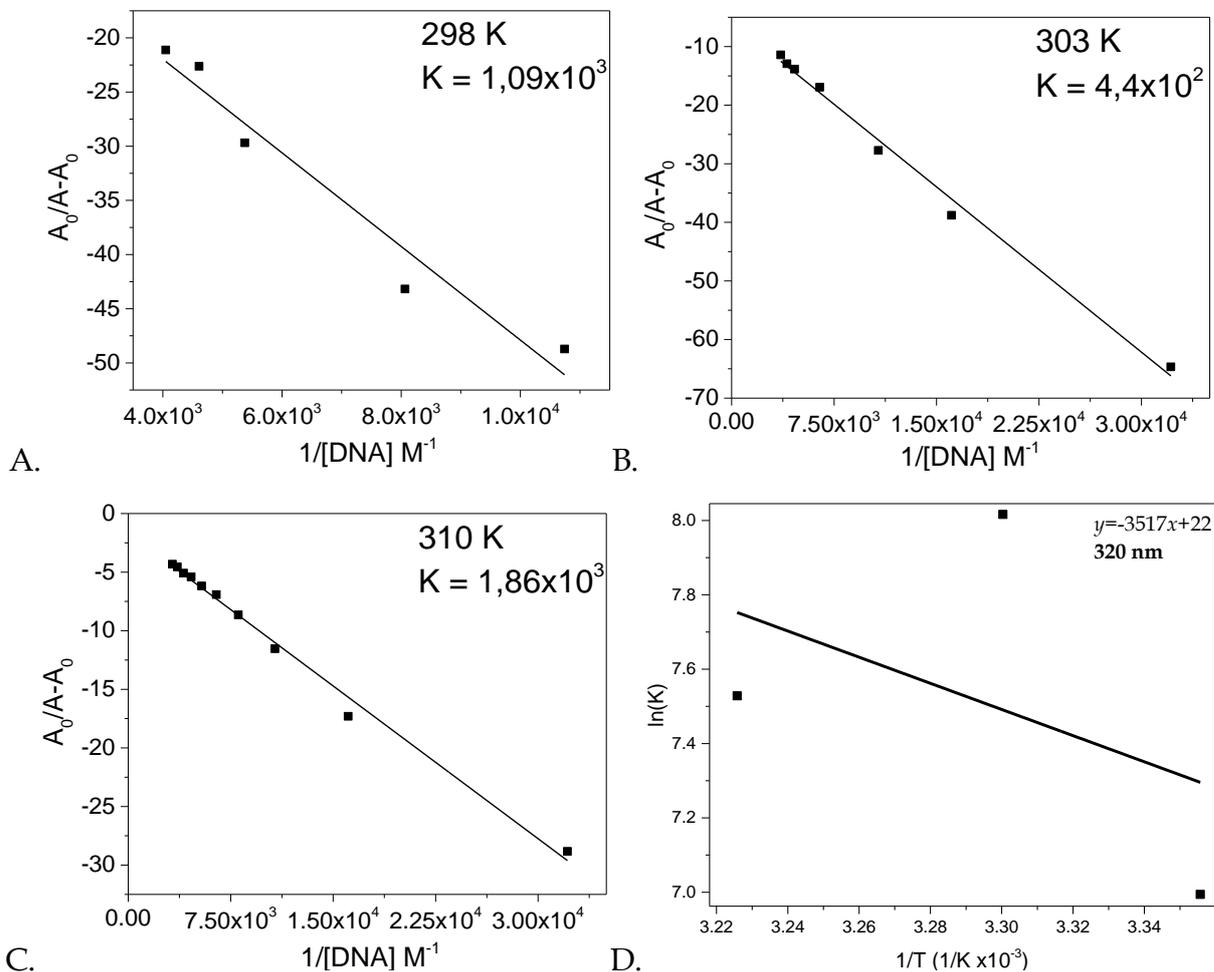
Fonte: Autora

Figura 95. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo 4 durante a titulação com o *fs*-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



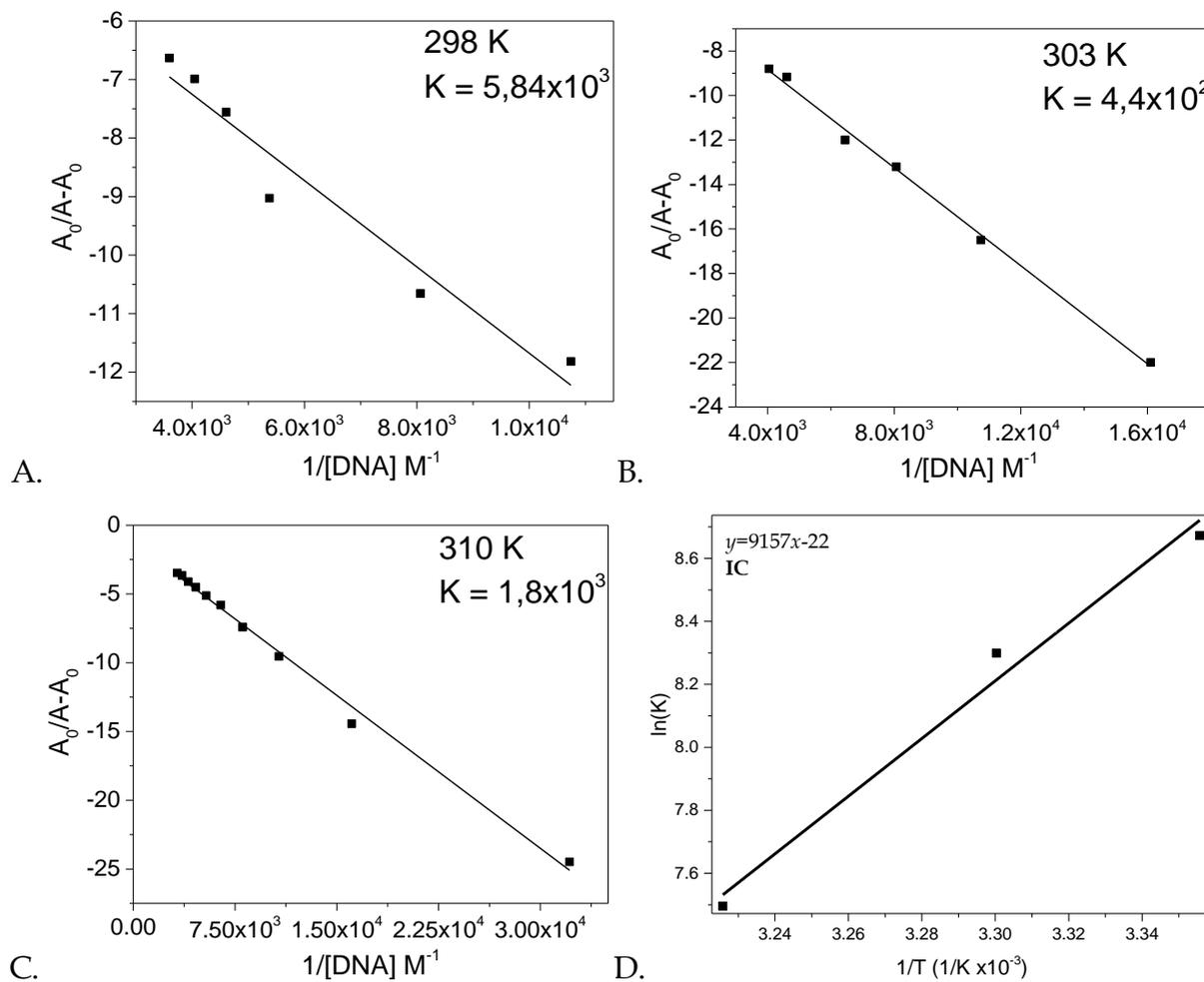
Fonte: Autora

Figura 96. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 320 nm do complexo 4 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



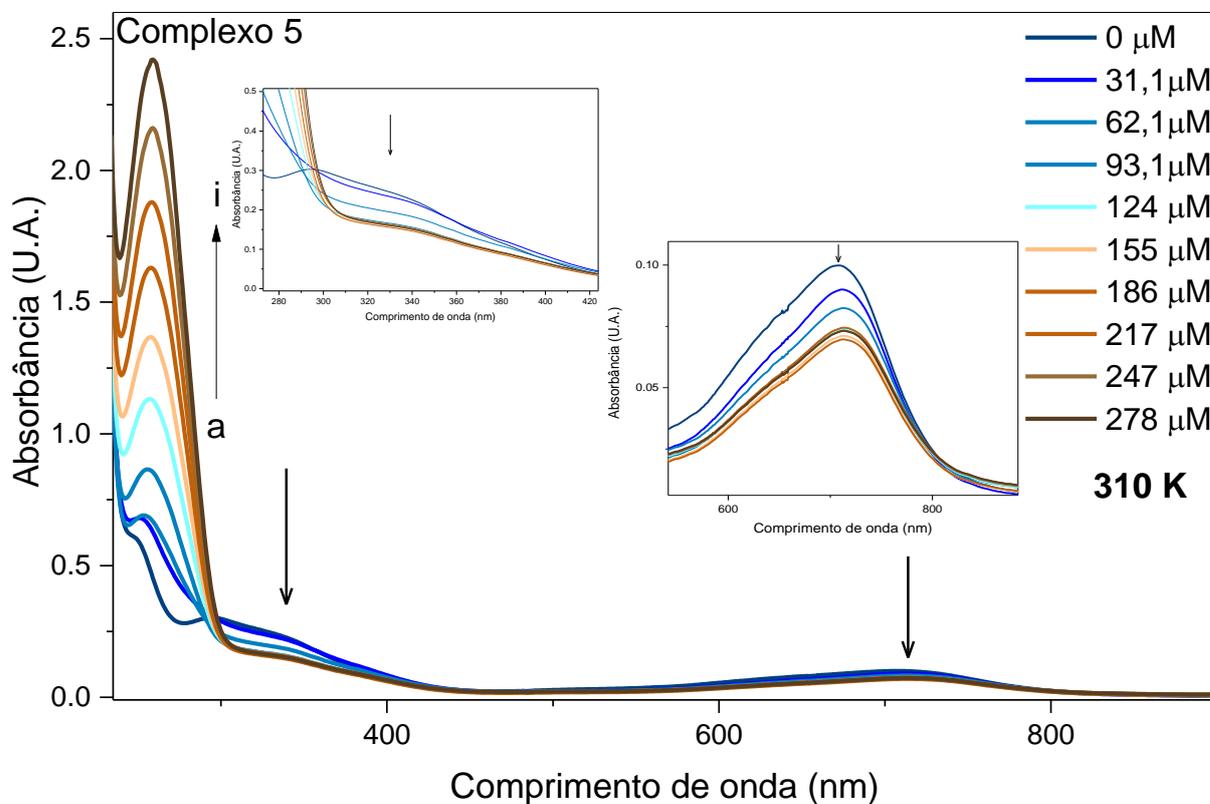
Fonte: Autora

Figura 97. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 4 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



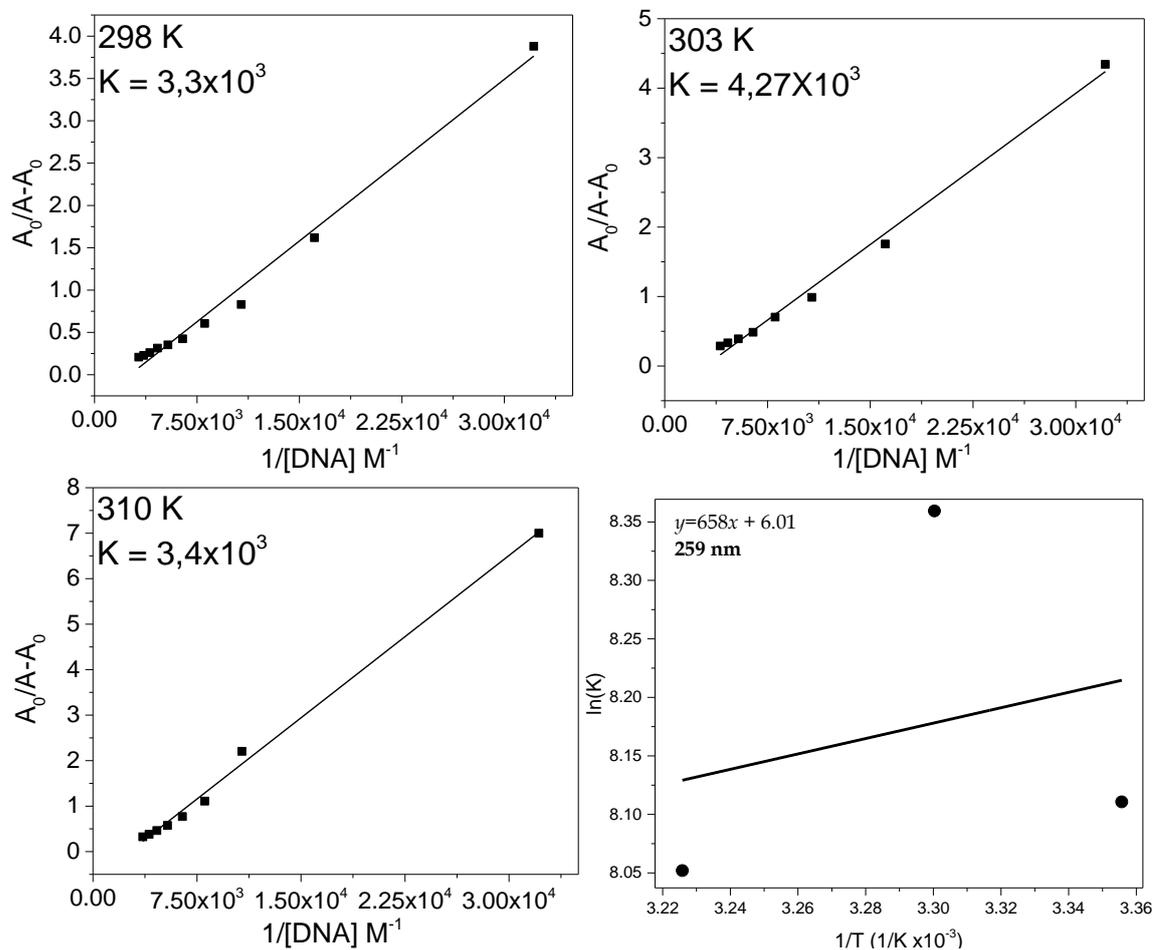
Fonte: Autora

Figura 98. Titulação espectrofotométrica do **complexo 5** com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. *Inset.* Ampliação da variação espectral na região de 350 e 700 nm



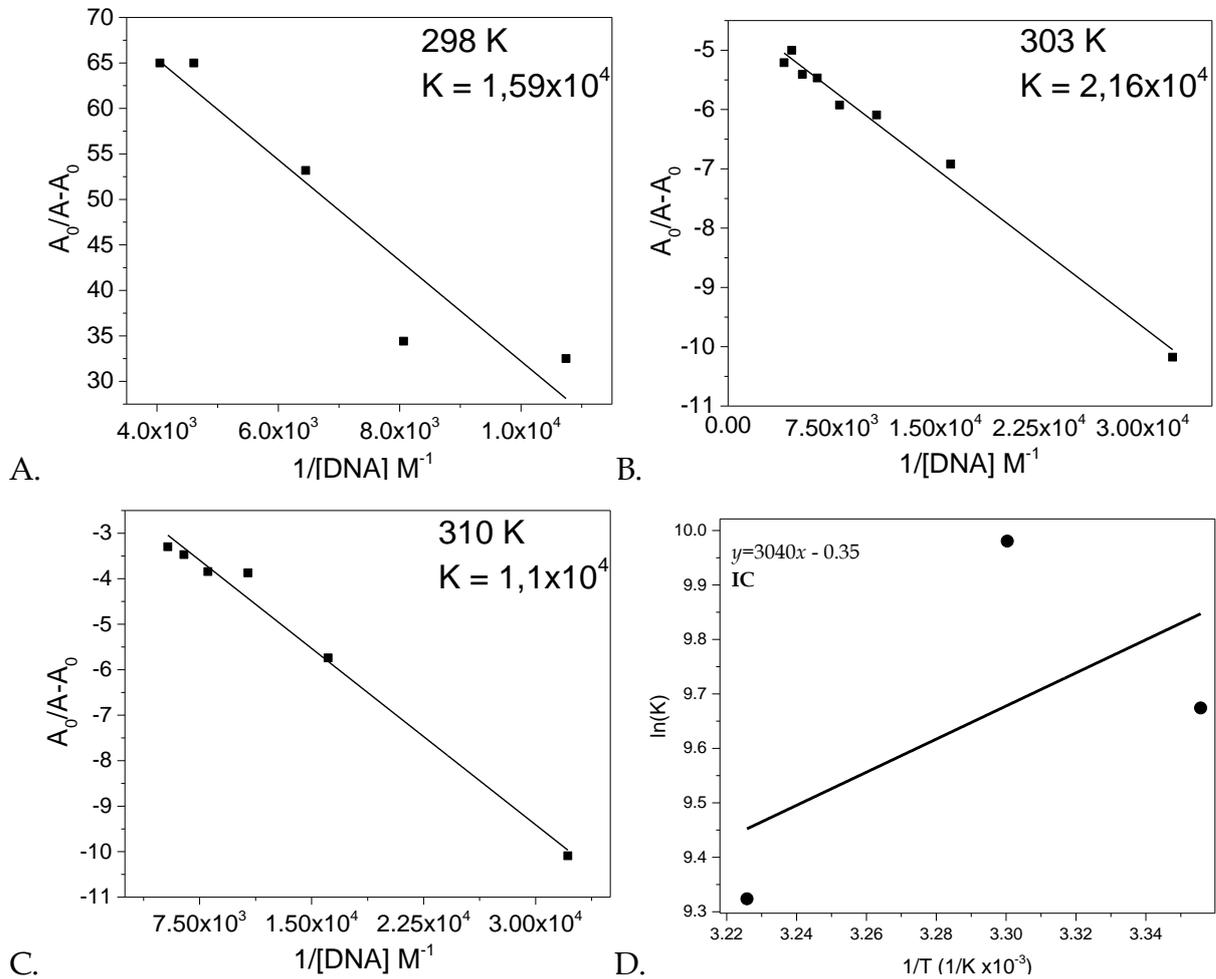
Fonte: Autora

Figura 99. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 259 nm do complexo 5 durante a titulação com o *fs*-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



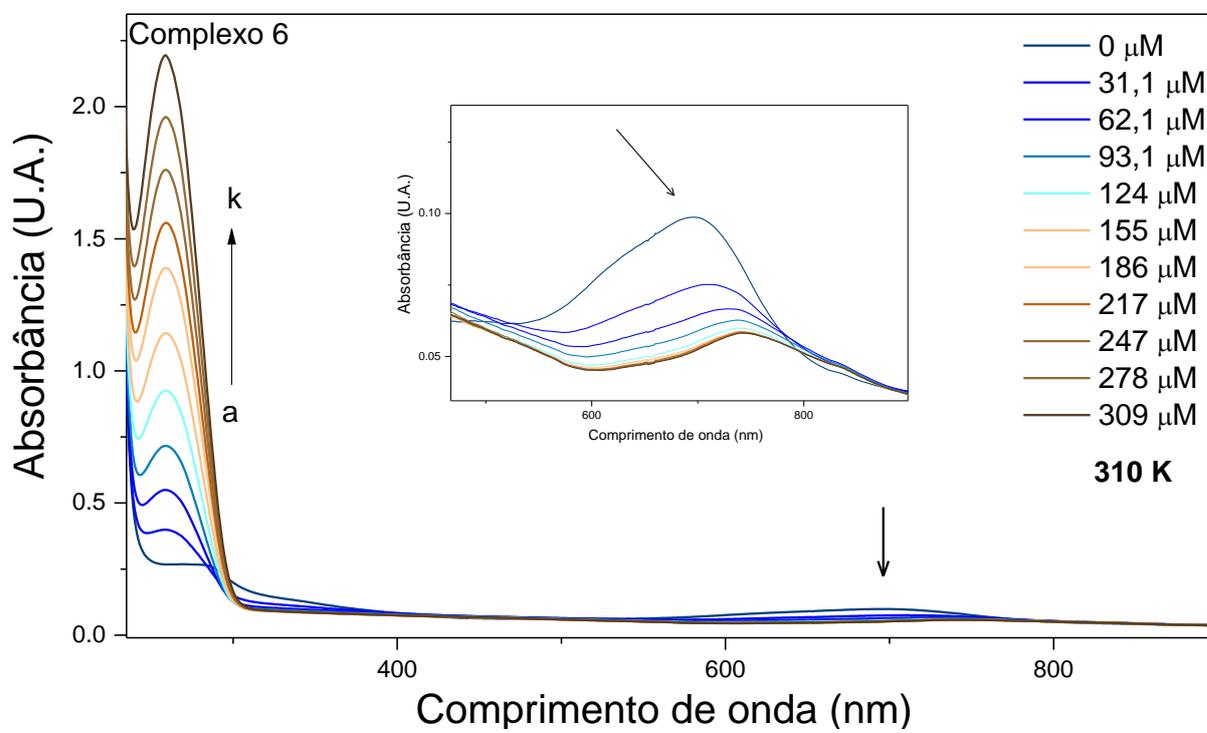
Fonte: Autora

Figura 100. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 5 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



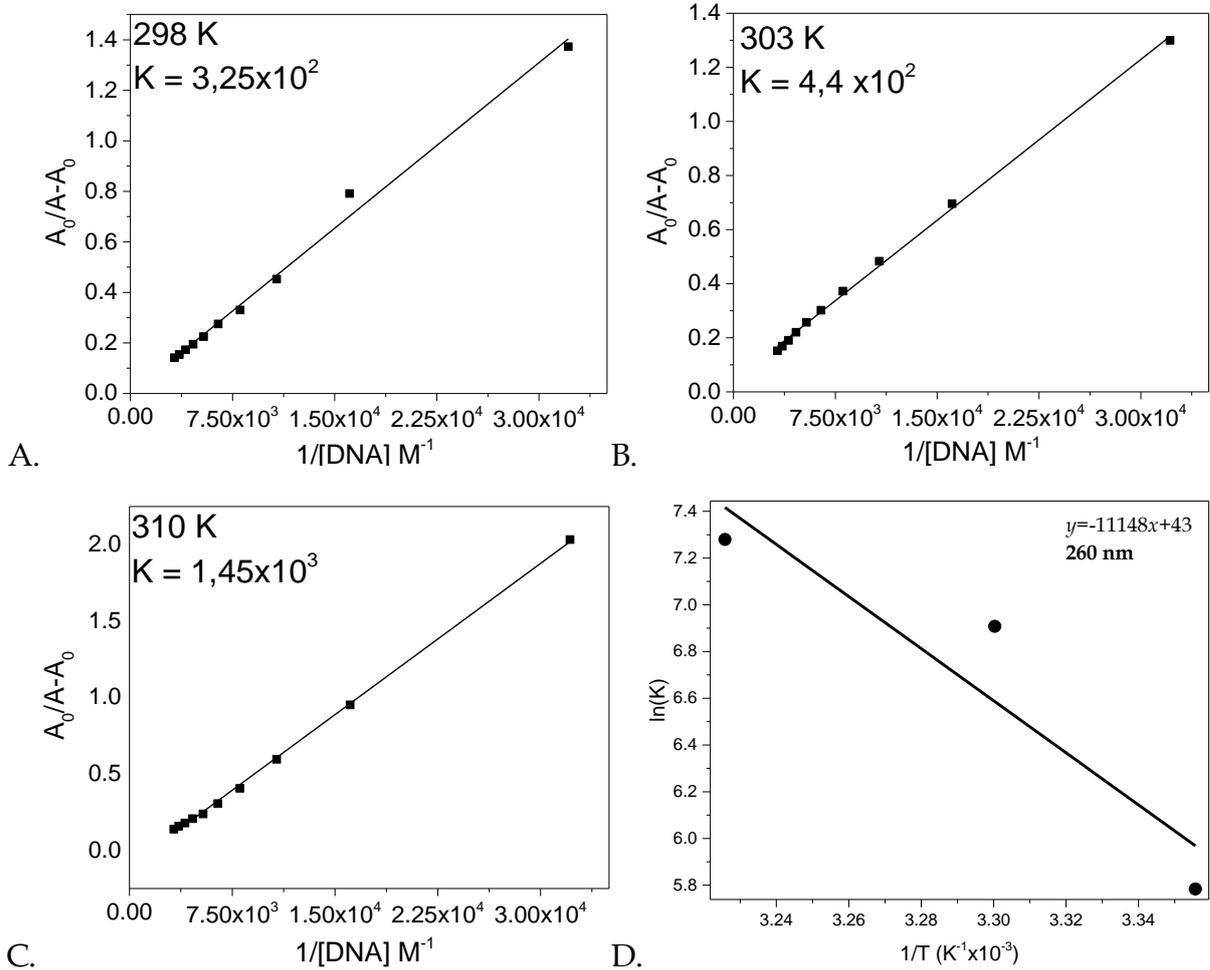
Fonte: Autora

Figura 101. Titulação espectrofotométrica do **complexo 6** com *fs*-DNA acompanhada por espectros de absorção na região do UV-visível. *Inset.* Ampliação da variação espectral na região de 700 nm



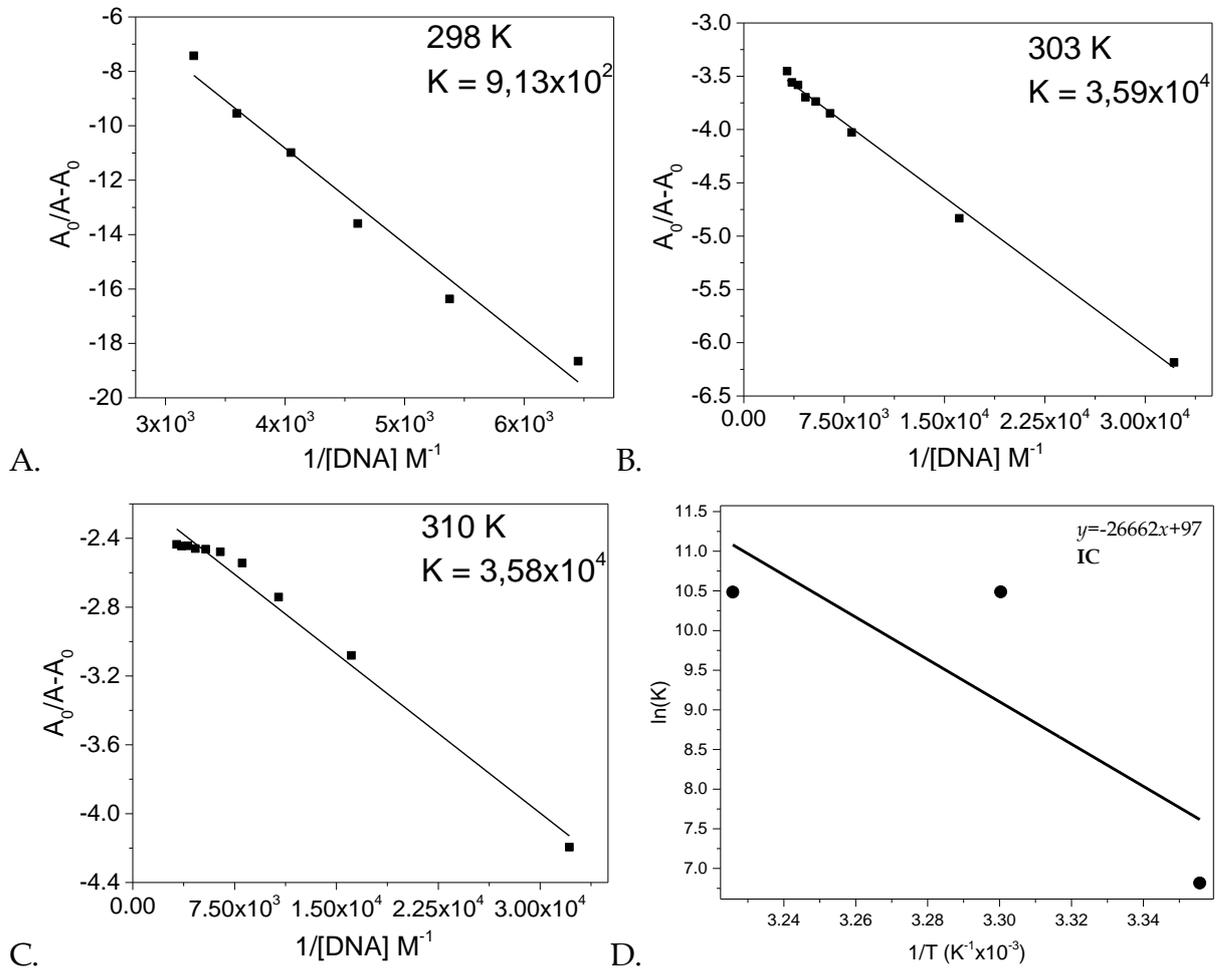
Fonte: Autora

Figura 102. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 260 nm do complexo 6 durante a titulação com o fs-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



Fonte: Autora

Figura 103. Curvas obtidas pelo modelo de Benesi-Hildebrand para a variação espectral em 700 nm do complexo 6 durante a titulação com o *fs*-DNA. A. 25 °C B. 30 °C C. 37°C. D. Curva obtida pela equação de van't Hoff utilizando as constantes obtidas nas três temperaturas



Fonte: Autora

Tabela 20. Resumo das constantes obtidas através das curvas geradas pelo modelo de Benesi-Hildebrand e parâmetros termodinâmicos obtidos através da equação de van't Hoff

Complexo 1, quinazolina									
	258 nm			700 nm					
T (K)	298	303	310	298	303	310			
K (M ⁻¹)	2,58x10 ²	1,06x10 ³	2,77x10 ²	1,80x10 ³	2,11x10 ³	9,00x10 ²			
lnK	5,55	6,97	5,62	7,50	7,65	6,80			
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-13,75	-17,56	-14,49	-18,58	-19,27	-17,53			
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-4,09			-94,65				
ΔS(J mol ⁻¹ K ⁻¹)		+36,83			-48,03				
Complexo 2; 5-nitroisoquinolina									
	260 nm			340 nm					
T (K)	298	303	310	298	303	310			
K (M ⁻¹)	1,33x10 ³	7,05x10 ²	6,60x10 ²	1,60x10 ⁴	3,48x10 ⁴	3,24x10 ³			
lnK	7,19	6,56	6,49	9,67	10,46	8,08			
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-17,81	-16,53	-16,73	-23,96	-26,35	-20,83			
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-42,75			-110,94				
ΔS(J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-84,70			-287,3				
Complexo 3; 5-bromoisoquinolina									
	257 nm			700 nm					
T (K)	298	303	310	298	303	310			
K (M ⁻¹)	2,24x10 ³	1,47x10 ³	5,60x10 ²	2,54x10 ³	4,87x10 ³	1,85x10 ³			
lnK	7,71	7,29	6,33	7,83	8,49	7,52			
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-19,10	-18,37	-16,32	-19,40	-21,39	-19,38			
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-89,79			-25,20				
ΔS(J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-236,6			-16,88				
Complexo 4, isoquinolina									
	260 nm			320 nm			700 nm		
T (K)	298	303	310	298	303	310	298	303	310
K (M ⁻¹)	425	3,80x10 ²	1,09x10 ³	1,09x10 ³	3,03x10 ³	1,86x20 ³	5,84x10 ³	4,02x10 ³	1,80x10 ³
lnK	6,05	5,94	6,99	6,99	8,02	7,53	8,67	8,30	7,50
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-14,99	-14,69	-18,02	-17,32	-20,20	-19,33	-21,48	-20,91	-19,33
ΔH (kJ mol ⁻¹)		+63,49			+29,24			-76,13	
ΔS(J mol ⁻¹ K ⁻¹)		+261,7			+158,8			-182,9	
Complexo 5; 5-aminoisoquinolina									
	259 nm			700 nm					
T (K)	298	303	310	298	303	310			
K (M ⁻¹)	3,33x10 ³	4,27x10 ³	3,14x10 ³	1,59x10 ⁴	2,116x10 ⁴	1,12x10 ⁴			
lnK	8,11	8,36	8,05	9,67	9,98	9,32			
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-20,09	-21,06	-20,75	-23,96	-25,14	-24,02			
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-5,47			-25,27				
ΔS(J mol ⁻¹ K ⁻¹)		+49,88			-2,94				
Complexo 6; 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina									
	260 nm			700 nm					
T (K)	298	303	310	298	303	310			
K (M ⁻¹)	3,25x10 ³	1,00x10 ³	1,45x10 ³	9,13x10 ²	3,59x10 ⁴	3,58x10 ⁴			
lnK	5,78	6,91	7,28	6,82	10,49	10,49			
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-14,32	-17,41	-18,76	-16,90	-26,43	-27,04			
ΔH (kJ mol ⁻¹)		+92,68			+221,67				
ΔS(J mol ⁻¹ K ⁻¹)		+360,63			+807,17				

Fonte: Autora

A primeira observação a ser feita é que todos os complexos apresentam outras mudanças espectrais além da banda na região de 260 nm. Isto mostra que os orbitais dos complexos foram perturbados pela interação com o DNA de tal maneira que as transições eletrônicas mudaram em energia e/ou intensidade, o que está diretamente ligado à força da interação, ou seja, apesar de não apresentarem constantes da ordem da do brometo de etídio, os complexos 1-6 têm afinidade pela molécula de DNA, como será discutido a seguir.

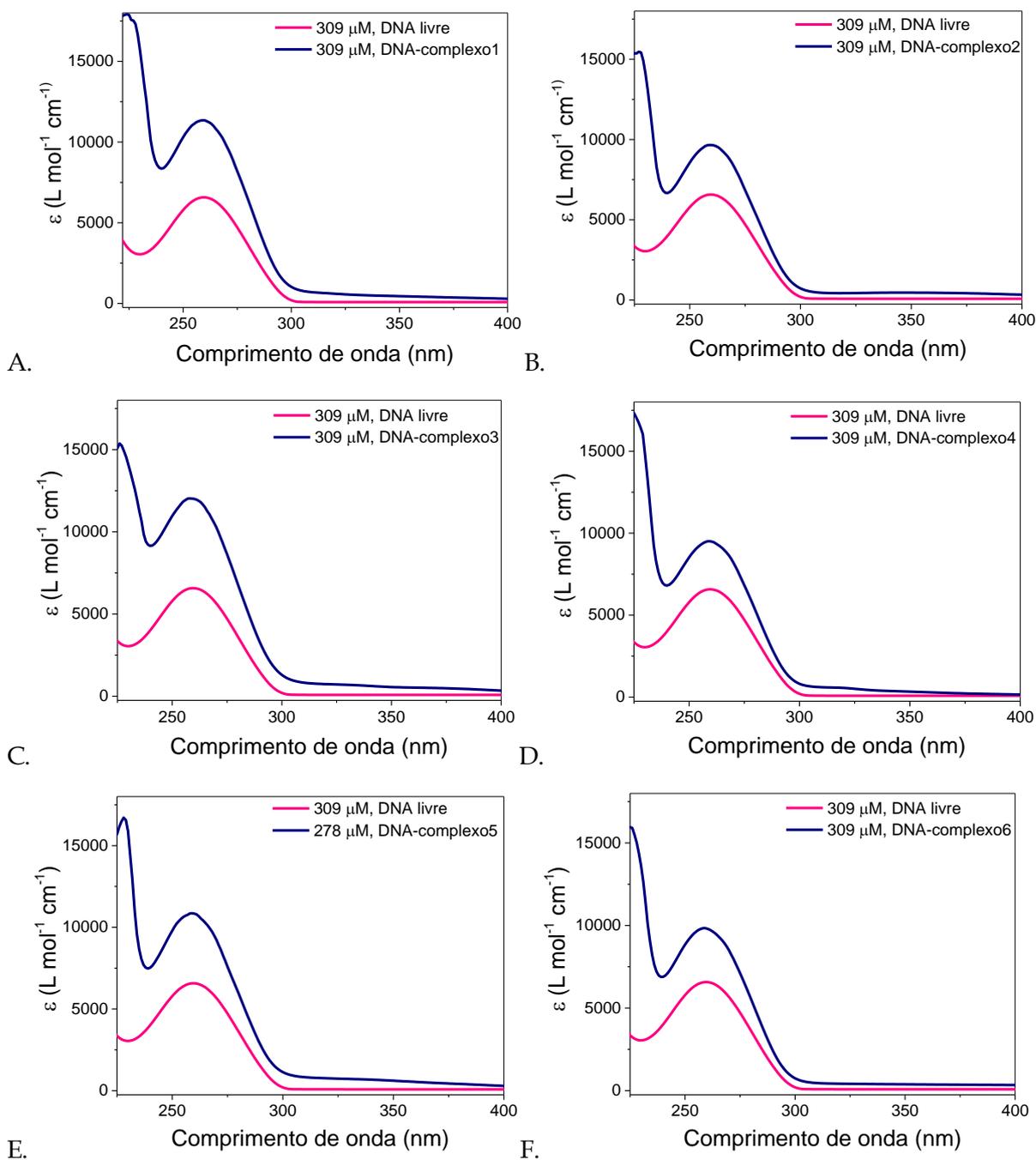
O primeiro ponto a ser discutido é como a literatura, muitas vezes, não é consistente acerca de como o experimento deve ser realizado, qual faixa de concentrações é mais adequada, qual deve ser o excesso de DNA e, em outros momentos, como todos os caminhos apontam para as mesmas “regras” que não levam em consideração as particularidades do sistema.

Os complexos trinucleares simétricos, por exemplo, apresentam em sua maioria, pelo menos três bandas de absorção no espectro UV-visível (TOMA; CUNHA; CIPRIANO, 1988; TOMA et al., 2001), e, como foi visto, uma interação razoavelmente forte com DNA causou alterações espectrais nas bandas dos complexos 1-6. Porém, não é incomum encontrar artigos onde os autores escolheram uma banda apenas para analisar (GAO et al., 2009; ESHKOURFU et al., 2011; ICSEL; YILMAZ, 2013; PAGES et al., 2016), e como, inclusive na descrição dos métodos matemáticos, muitos se referem ao ϵ como “coeficiente de absorvidade molar do composto” (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Nós acreditamos que informações valiosas estão contidas nas diferentes alterações, e, portanto, neste trabalho, analisar-se-á todas aquelas que apresentaram uma tendência nítida de variação.

Há quem não considere o efeito de hipercromismo em 260 nm (PRAVIN et al., 2016) por se tratar da região onde as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das bases nitrogenadas aparecem, e a crescente intensidade da banda indicar pura e simplesmente um aumento na concentração de DNA no meio. Mas, especificamente para os compostos analisados neste trabalho, todas as bandas correspondentes ao último ponto da titulação (309 μM para complexos 1-4 e 6 e 278 μM para o composto 5) são mais intensas do que a concentração correspondente do DNA livre, como mostra a Figura 104. Além disso, se

observarmos as primeiras curvas, correspondentes às concentrações 31,1, 62,1, 93,1 e 124 μM , a banda do DNA sofre uma mudança de forma, que pode ser indicativa da formação do aduto DNA-complexo. E, por fim, todos os complexos apresentam transições eletrônicas de natureza do ligante na mesma região, podendo-se notar, nas concentrações supracitadas, um leve deslocamento hipsocrômico (~ 3 nm).

Figura 104. A-F. Comparação entre a intensidade da última curva da titulação espectrofotométrica e a concentração equivalente de *fs*-DNA livre



Fonte: Autora

A racionalização dos modos de interação dos complexos com o DNA será feita com base no trabalho de revisão feito por Sirajuddin e colaboradores (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Existem dois tipos de interação que ocorrem no DNA: covalentes e não-covalentes. As interações covalentes são aquelas do tipo da cisplatina, onde a platina coordena-se fortemente aos nitrogênios livres das bases nitrogenadas, causando um dano irreversível, característica principal desse tipo de interação. Levando-se em conta a magnitude das constantes obtidas para os compostos 1-6, pode-se considerar que todos apresentam interações não-covalentes, as quais, muitas vezes são preferíveis com relação às primeiras, porque existe a possibilidade de, em meio biológico, haver um metabolismo facilitado do composto, evitando efeitos colaterais tóxicos.

As interações não-covalentes podem ocasionar mudanças conformacionais no DNA, modificar a torção, interromper a interação DNA-proteína e causar a quebra da dupla fita. Elas dividem-se em intercalação, *groove binding* (interação nos sulcos, traduzido livremente), ligação externa.

As variações espectrais que permitem a investigação dos tipos de interação não-covalentes são: hipocromismo associado a batocromismo em bandas do complexo apontam para intercalação; hipercromismo e hipsocromismo em bandas do complexos evidenciam a interação nos sulcos e, como será discutido a seguir, hipercromismo e hipsocromismo da banda do DNA mostram que houve a ligação externa.

Todos os compostos apresentaram o efeito hiper-crômico na banda do DNA, e, segundo Sirajuddin e colaboradores (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013), “a absorvância da fita simples é 40% maior do que da dupla fita” (tradução livre), ou seja, a interação dos complexos com o DNA gerou um rompimento parcial da dupla fita, expondo as bases nitrogenadas, aumentando a intensidade da transição. E este efeito não é apenas do aumento da concentração do DNA na titulação, porque o aumento da absorvância aconteceu numa faixa de 31-45%.

Para o caso dos complexos 1, 3, 4 e 5, houve o hipocromismo associado a um discreto deslocamento batocrômico das bandas na região de 700 nm, o que sugere a intercalação desses complexos entre os pares de bases adjacentes no DNA. E é possível dizer que

esses compostos, de fato, são intercaladores pois esse resultado está de acordo com o observado no deslocamento do brometo de etídio. As forças que mantêm a intercalação, além do próprio DNA, são interações de hidrogênio, forças de van der Waals e interação hidrofóbica, e as constantes termodinâmicas, determinadas indiretamente pelas constantes de ligação resultantes do modelo de Benesi-Hildebrand, apontam que a interação do DNA com os compostos supracitados apresenta, em sua maioria, forças de van der Waals. Vale ressaltar que cada transição do complexo sente a interação de uma maneira diferente, dado que cada transição tem uma composição orbital diferente. Os complexos 4 e 5 têm também suas transições de transferência de carga afetada pela intercalação ao DNA.

Para o caso do complexo 2, apesar de haver o deslocamento do brometo de etídio, os resultados apontam para o modo de interação do tipo *groove binding*, ou seja, há no ligante 5-nitroisoquinolina alguma característica que facilite a ligação aos sulcos do DNA, e isto vai ao encontro do fato desse ligante deslocar a densidade eletrônica do complexo para sua periferia, tornando a unidade $[Ru_3O]^+$ mais pobre em elétrons, gerando um δ^- nas extremidades do ligante. Isso facilita, e muito, a formação de ligações de hidrogênio, mas, principalmente, de interações de van der Waals, sendo que as duas mantêm o *groove binding*. E não é à toa que as constantes termodinâmicas apontam para esse fato, mostrando $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$. É possível dizer que o efeito fica localizado no ligante porque a variação espectral ocorre na transição de transferência de carga, mas não na intracuster, o que demonstra que a interação não perturbou os orbitais com característica metálica, envolvidos na transição intracuster. O fato de haver supressão da fluorescência do complexo EB-DNA pode estar ligado não necessariamente ao deslocamento, mas a mudança na conformação do DNA, forçando a perda da afinidade do brometo de etídio pelas bases nitrogenadas.

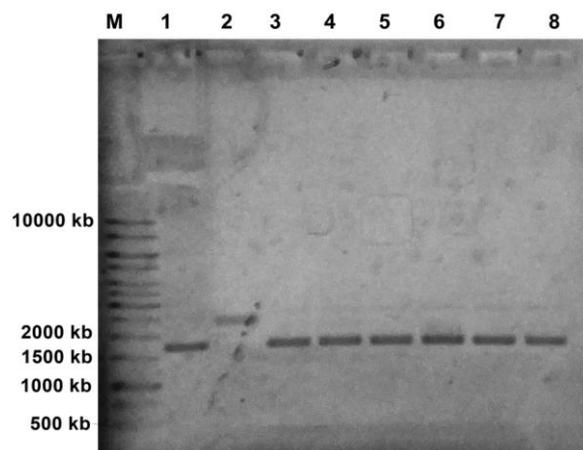
Por último, mas não menos importante, o complexo 6 apresenta um perfil legítimo de intercalação, dado pelo forte efeito hipocrômico e batocrômico na banda intracuster do complexo, mas não há deslocamento do brometo de etídio na titulação acompanhada por espectroscopia de fluorescência. Na verdade, se olharmos mais atentamente à mudança espectral do complexo 6, ela é, sem dúvida, a mais intensa, o que sugere que a

interação também é forte (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). De fato, junto com os complexos 2 e 4, o complexo 6 apresenta constantes de ligação da ordem de 10^4 . Além disso, as constantes termodinâmicas apontam para interações hidrofóbicas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$), e essa pode ser a chave para elucidar o porquê desse complexo ter uma atividade tão pronunciada contra a Doença de Chagas, por exemplo. Mas experimentos de dicroísmo circular poderiam dizer qual tipo de mudança estrutural ocorreu no DNA, causada pelo complexo 6.

Sobre as constantes termodinâmicas, é imprescindível ressaltar que a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) para todos os complexos nas três temperaturas foi menor que zero, indicando que a interação com DNA é um processo espontâneo (BALL, 2004). Ademais, os valores de ΔH e ΔS foram utilizados para racionalizar o tipo de interação dos complexos com o DNA (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Quando $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, considera-se que a natureza da interação é hidrofóbica. Se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, então forças de van der Waals predominam. Mas se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, então a interação tem natureza eletrostática.

Tendo em vista todos os pontos discutidos sobre a extensão da interação dos complexos com DNA, o experimento de interação com DNA plasmidial pode ilustrar qual o tamanho do dano causado ao DNA (ICSEL; YILMAZ, 2013), uma vez que o plasmídeo, nesse caso pUC19, encontra-se naturalmente na forma *supercoiled* (superenovelada, traduzido livremente), e qualquer alteração a essa estrutura muda seu perfil eletroforético. Neste experimento, utilizou-se a cisplatina como controle, uma vez que o dano causado por ela à estrutura do DNA é bastante conhecido (PIZARRO; SADLER, 2009). A Figura 105 e a Figura 106 trazem a fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese após incubação do DNA plasmidial com os complexos 1-6, cisplatina e 1% DMSO (controle).

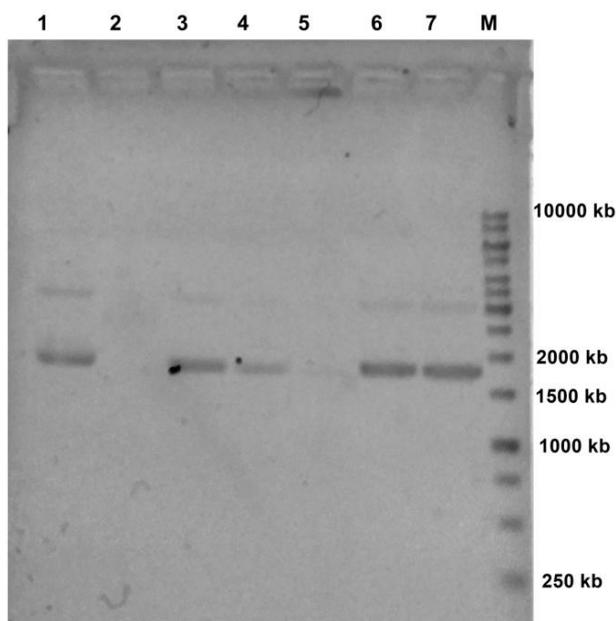
Figura 105. Interação dos complexos 1-6 e cisplatina com o DNA plasmidial (2 horas)



Gel de agarose 0,8% referente à incubação do plasmídeo pUC19, durante 2 horas, na presença de diferentes concentrações dos complexos da série ($r = [\text{complexo}] / [\text{DNA}] = 5$), utilizando cisplatina como controle positivo ($r=5$). **M** - Marcador de peso molecular 1kb; 1- Controle negativo DNA ($[\text{pUC19}] = 10,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); 2- Controle positivo (cisplatina, $r=5$); 3- Complexo 4 (iq, $r=5,0$); 4- Complexo 5 (5-amiq, $r=5,0$); 5- Complexo 6 (thiq, $r=5,0$); 6- Complexo 1 (qz, $r=5,0$); 7- Complexo 2 ($r=5,0$); 8- Complexo 3 (5-briq, $r=5,0$).

Fonte: Autora

Figura 106. Interação dos complexos 1-6 e cisplatina com o DNA plasmidial (24 horas)



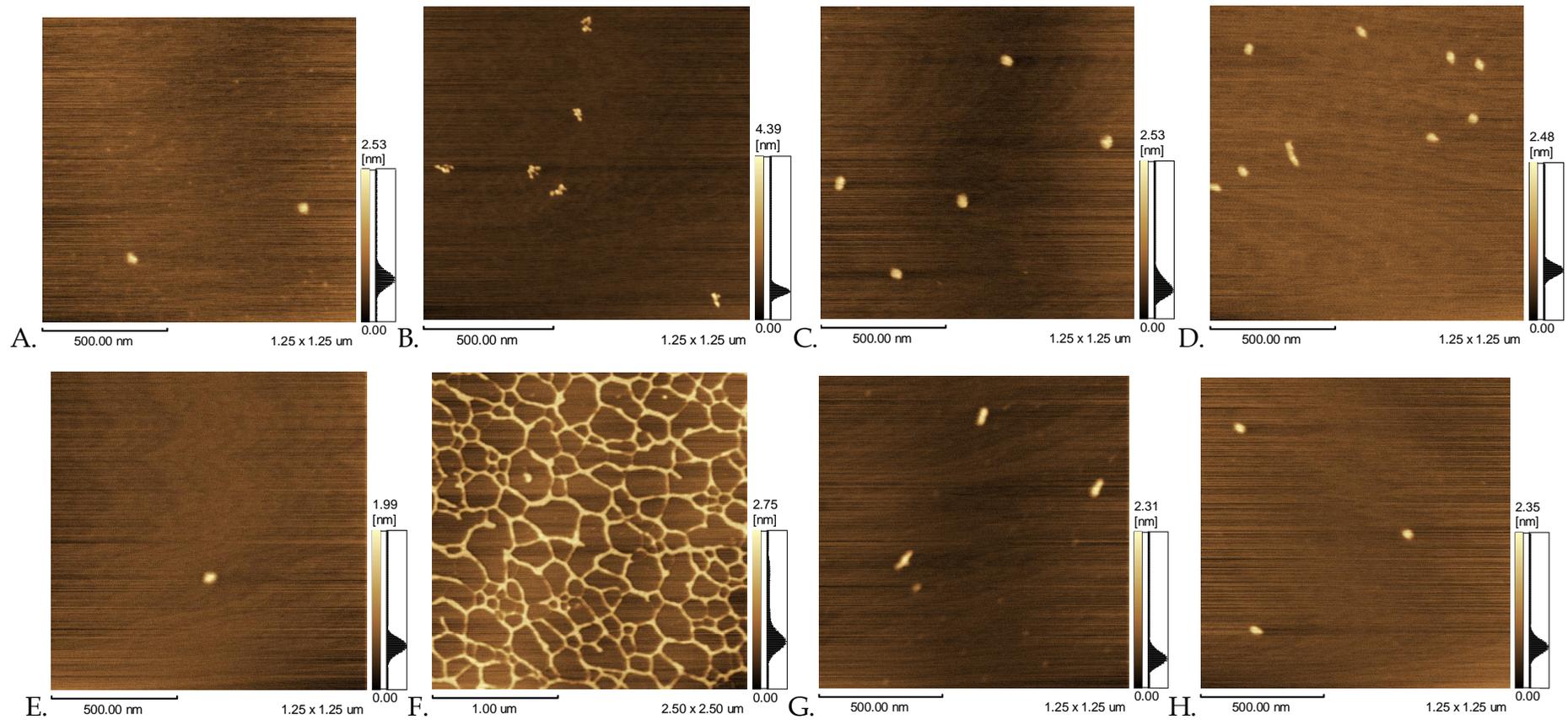
Gel de agarose 0,8% referente à incubação do plasmídeo pUC19, durante 24 horas, na presença de diferentes concentrações dos complexos da série ($r = [\text{complexo}] / [\text{DNA}] = 5$), utilizando cisplatina como controle positivo ($r=5$). 1- Controle negativo DNA ($[\text{pUC19}] = 10,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); 2- Controle positivo (cisplatina, $r=5$); 3- Complexo 4 (iq, $r=5,0$); 4- Complexo 5 (5-amiq, $r=5,0$); 5- Complexo 6 (thiq, $r=5,0$); 6- Complexo 1 (qz, $r=5,0$); 7- Complexo 2 ($r=5,0$); 8- Complexo 3 (5-briq, $r=5,0$); **M** - Marcador de peso molecular 1kb.

Fonte: Autora

A ausência de qualquer modificação na forma e/ou posição da banda do plasmídeo no gel sugere que os complexos não são capazes de clivar o DNA e/ou degradá-lo no

tempo do estudo, diferentemente da cisplatina, que passa todo DNA da forma superenovelada para a forma linear em apenas duas horas. Num primeiro momento, pode-se pensar que isso é uma desvantagem, mas o fato de o modo de interação dos complexos com DNA ser diferente do da cisplatina é muito fortuito, uma vez que existem muitas linhagens de células cancerosas resistentes ao tratamento com o metalofármaco (LEVINA; MITRA; LAY, 2009). Como pôde ser visto na Figura 106, a ausência da banda do DNA após 24 horas de incubação com a cisplatina indica que ela degradou completamente o DNA (linha 2), enquanto que, na linha 5, era possível notar a presença do DNA, mas em baixa concentração, porque uma alíquota maior havia sido retirada para análise por Microscopia de Força Atômica (AFM). As imagens de AFM foram feitas a fim de elucidar se, de fato, não houve nenhuma mudança estrutural no pUC19. Essa técnica já foi utilizada por Gambino e colaboradores (BENÍTEZ et al., 2009b). A Figura 107 mostra os resultados:

Figura 107. A-H. Imagens obtidas através de AFM. A. Controle negativo (1% de DMSO); B. Cisplatina ($r=5$, 2h de incubação); todos os complexos



Fonte: Autora

Através das imagens e dos dados gerados sobre o tamanho das partículas, é possível notar que o controle negativo apresenta uma forma circular com dimensões aproximadas de 48x48 nm. Após a incubação com cisplatina, observa-se uma mudança severa na forma do DNA, corroborando o resultado da eletroforese em gel, que mostrou que o plasmídeo passou da forma superenovelada para a forma linear. Mas, apesar de não linearizar o pUC19, os compostos foram capazes de modificar o tamanho e forma das partículas, mas sutilmente, de maneira que através da eletroforese não foi possível notar a diferença. Após a exposição aos complexos, as partículas passaram a ter, aproximadamente, as seguintes dimensões: 59x38 nm (Complexo 1), 110x35 nm e 35x41 nm (Complexo 2), 55x47 nm (Complexo 3), 98x36 nm (Complexo 5), 40x33 nm (Complexo 6), e complexo 4 formou uma espécie de rede, um agregado, cujas linhas têm espessura de, aproximadamente, 38 nm. A formação desse agregado pode ter ocorrido durante a secagem da amostra, porque uma estrutura dessa magnitude deveria apresentar um menor deslocamento na eletroforese, afetando a posição da banda do DNA.

De maneira geral, as mudanças na forma do DNA plasmidial não foram tão severas a ponto de existir alteração na posição da banda na eletroforese, isto é, não houve clivagem, decomposição ou desenovelamento, e sim interações reversíveis, como mostrado através das titulações espectrofotométricas, fato que foi confirmado pela Microscopia de Força Atômica, que foi capaz de detectar alterações sutis na forma das partículas de DNA.

2. Interação com Albumina de Soro Humano (HSA)

Como dito anteriormente, a interação dos complexos 1-6 com HSA foi avaliada através de espectroscopia de fluorescência, uma vez que, quando há interação, ocorre a supressão da fluorescência da proteína, e, a partir dos dados obtidos nesse experimento, uma série de parâmetros pode ser determinada.

Antes de serem discutidos os resultados específicos, é importante destacar que a literatura reporta a existência de dois tipos de mecanismos de supressão de fluorescência: dinâmico e estático. O mecanismo dinâmico ocorre quando o supressor se difunde até o fluoróforo durante o tempo de vida de seu estado excitado, e quando em

contato com o fluoróforo, este volta ao estado fundamental sem a emissão de um fóton. Enquanto no mecanismo estático, ocorre a formação de uma nova espécie no estado fundamental antes do fluoróforo ser excitado (MIN et al., 2004), culminando na diminuição da proteína livre que pode ser excitada e, conseqüentemente, na diminuição de emissão pela espécie luminescente.

A equação de Stern-Volmer descreve ambos os processos, estático e dinâmico:

Equação 9

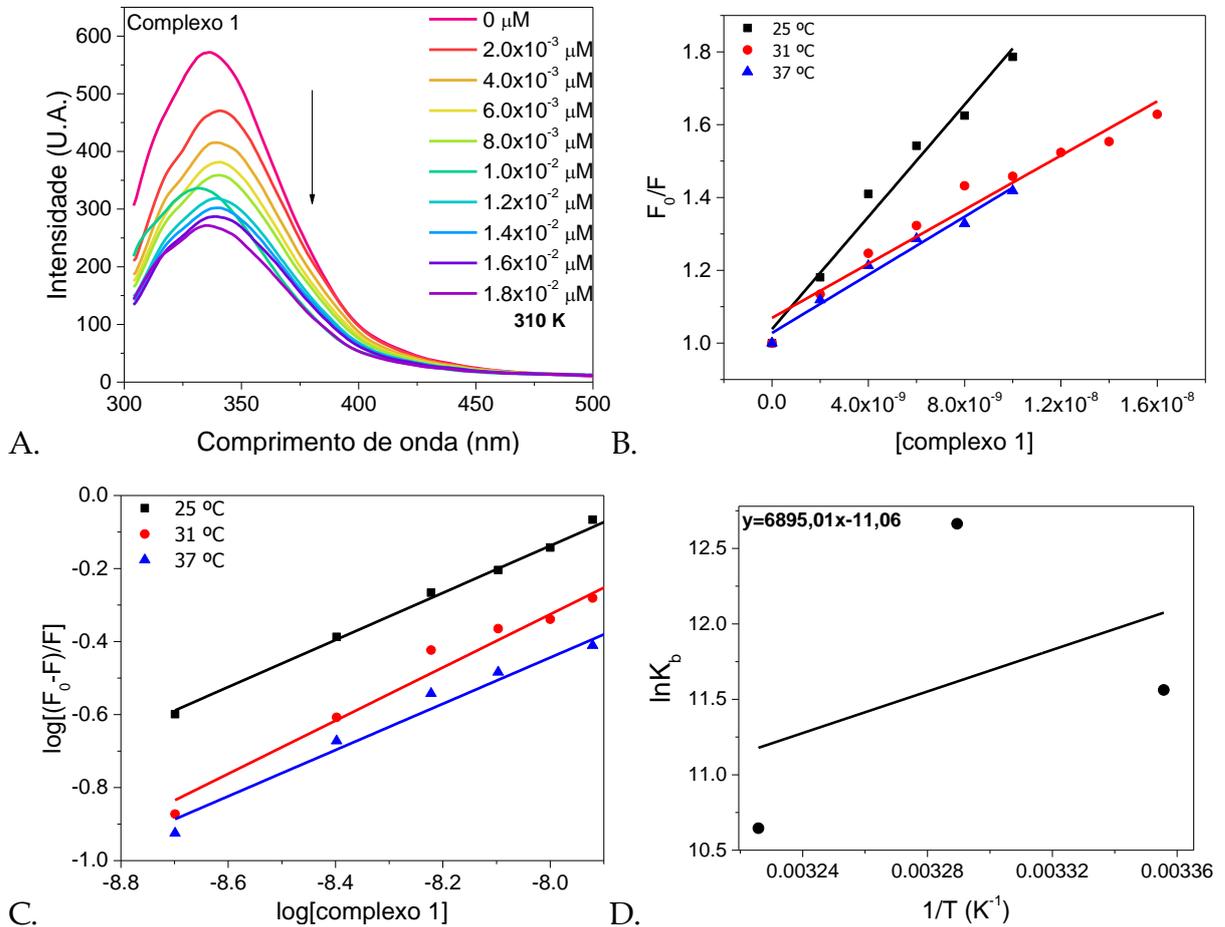
$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_S \tau_0 [S] = 1 + K_{SV} [S]$$

onde: F e F₀ são intensidade de fluorescência na presença e ausência do supressor respectivamente; [S] é concentração do supressor; τ₀ = tempo de vida do fluoróforo no estado excitado que, no caso da HSA, tem valor de aproximadamente 10⁻⁸ s; k_s é a constante de velocidade de supressão bimolecular; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, relacionada ao tipo de supressão de fluorescência (GORINSTEIN et al., 2000; HU et al., 2004).

Quando K_{SV} cresce com o aumento da temperatura, entende-se que há um mecanismo predominantemente dinâmico, o qual é justificado pelo aumento da difusão do supressor no meio, com o aumento da temperatura (HOU et al., 2008). Outra maneira de se verificar o tipo de mecanismo envolvido no processo consiste em comparar a constante de velocidade de supressão bimolecular com a constante de difusão, a qual limita os processos bimoleculares (k_{diff} = 2×10¹⁰ M⁻¹s⁻¹) (WARE, 1962; MAURICE; CAMILLO, 1981; JIANG; GAO; HE, 2002; LAKOWICZ, 2006; XIE et al., 2006). Por sua vez, a de supressão de fluorescência pelo mecanismo estático é caracterizada pela formação de um aduto HSA-complexo não fluorescente, o que culmina na constante de velocidade de supressão bimolecular possuir valores maiores do que a constante de difusão (LIU et al., 2012; MAZURYK et al., 2012; RAY et al., 2012; TABASSUM et al., 2012).

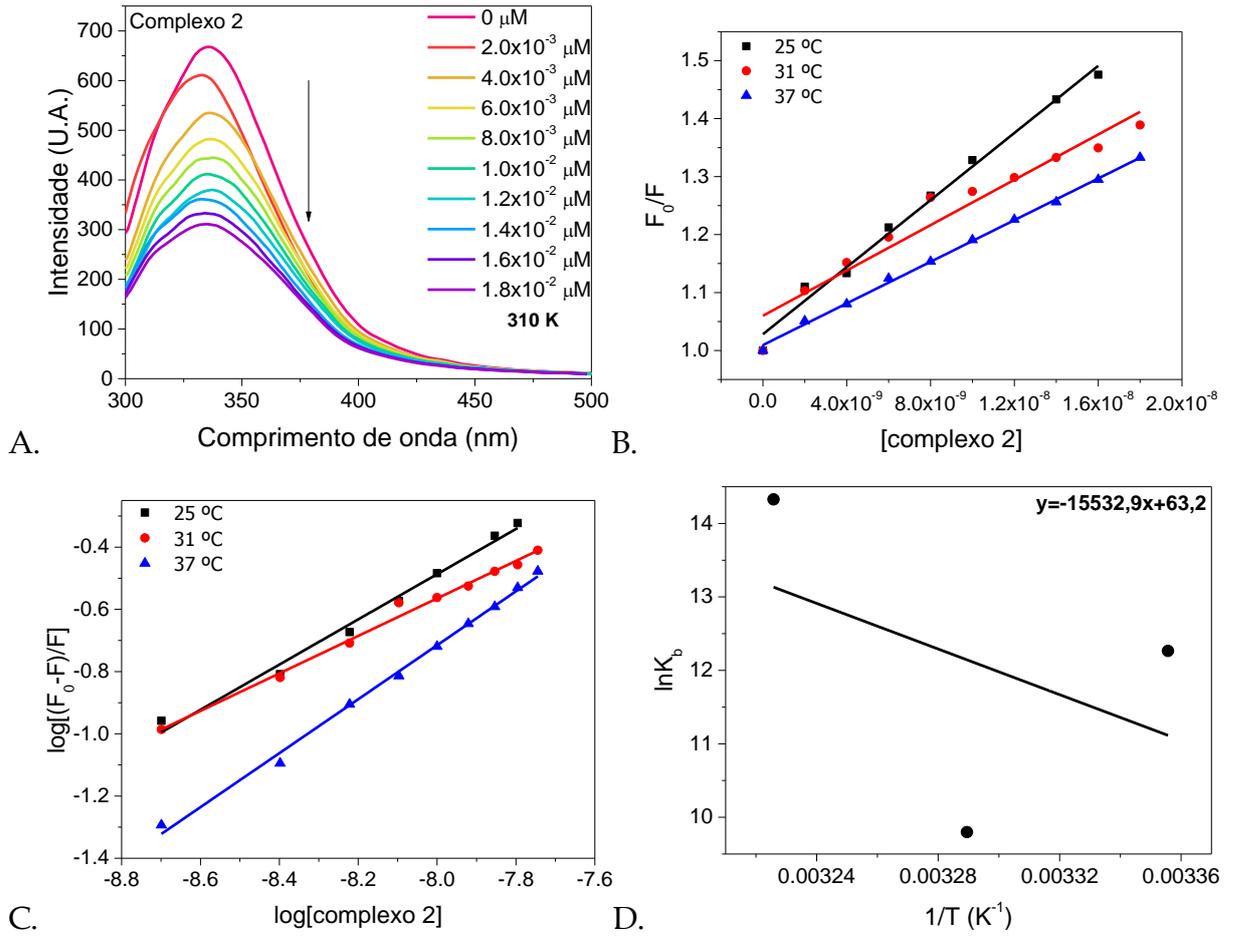
As figuras abaixo trazem a titulação da HSA com os complexos 1-6, acompanhada por espectros de fluorescência. Além disso, apresentam também as curvas referentes ao tratamento matemático dos dados utilizando o modelo de Stern-Volmer e a equação de van't Hoff. A Tabela 21 sumariza os resultados obtidos.

Figura 108. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o **complexo 1**, acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação



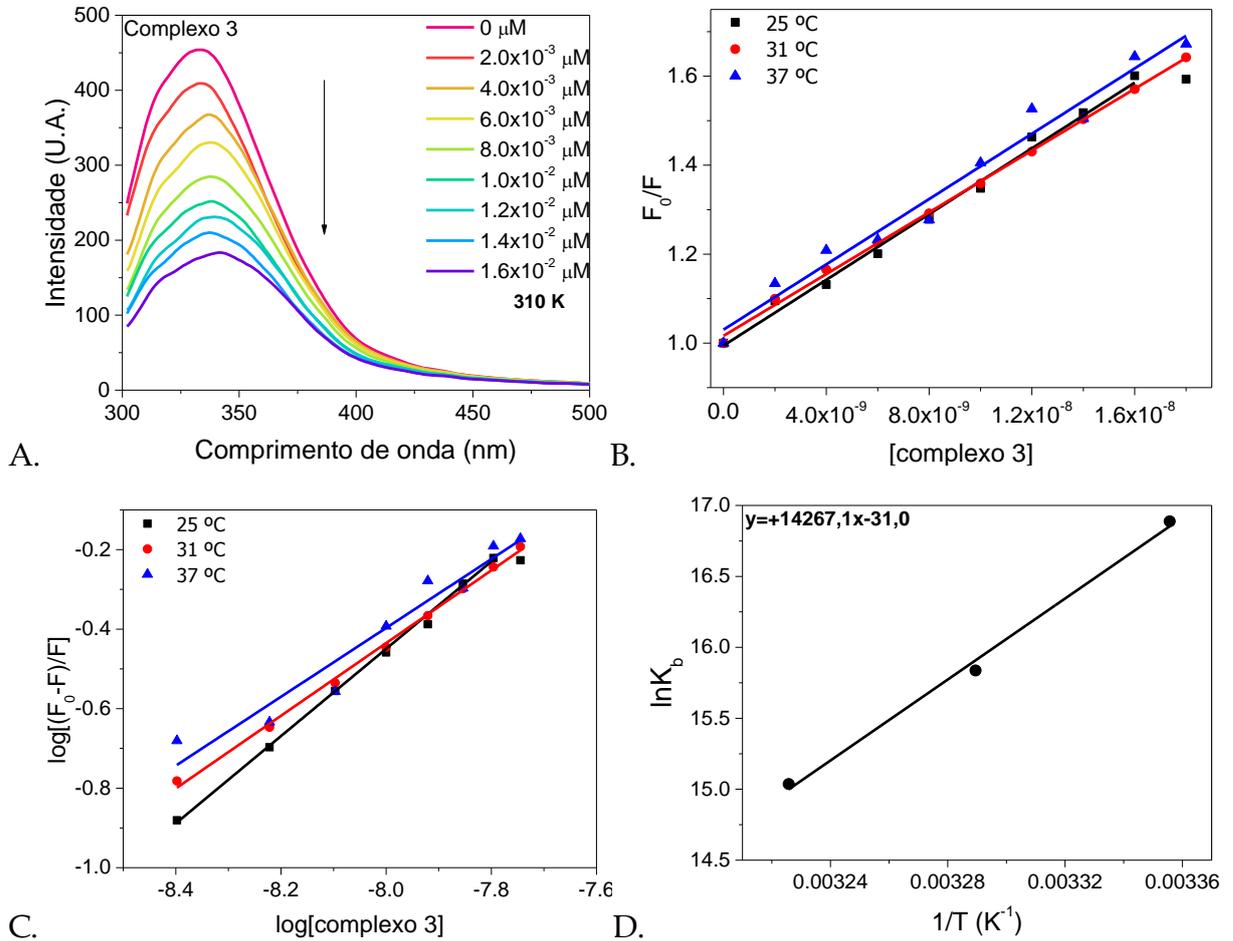
Fonte: Autora

Figura 109. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o **complexo 2**, acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação



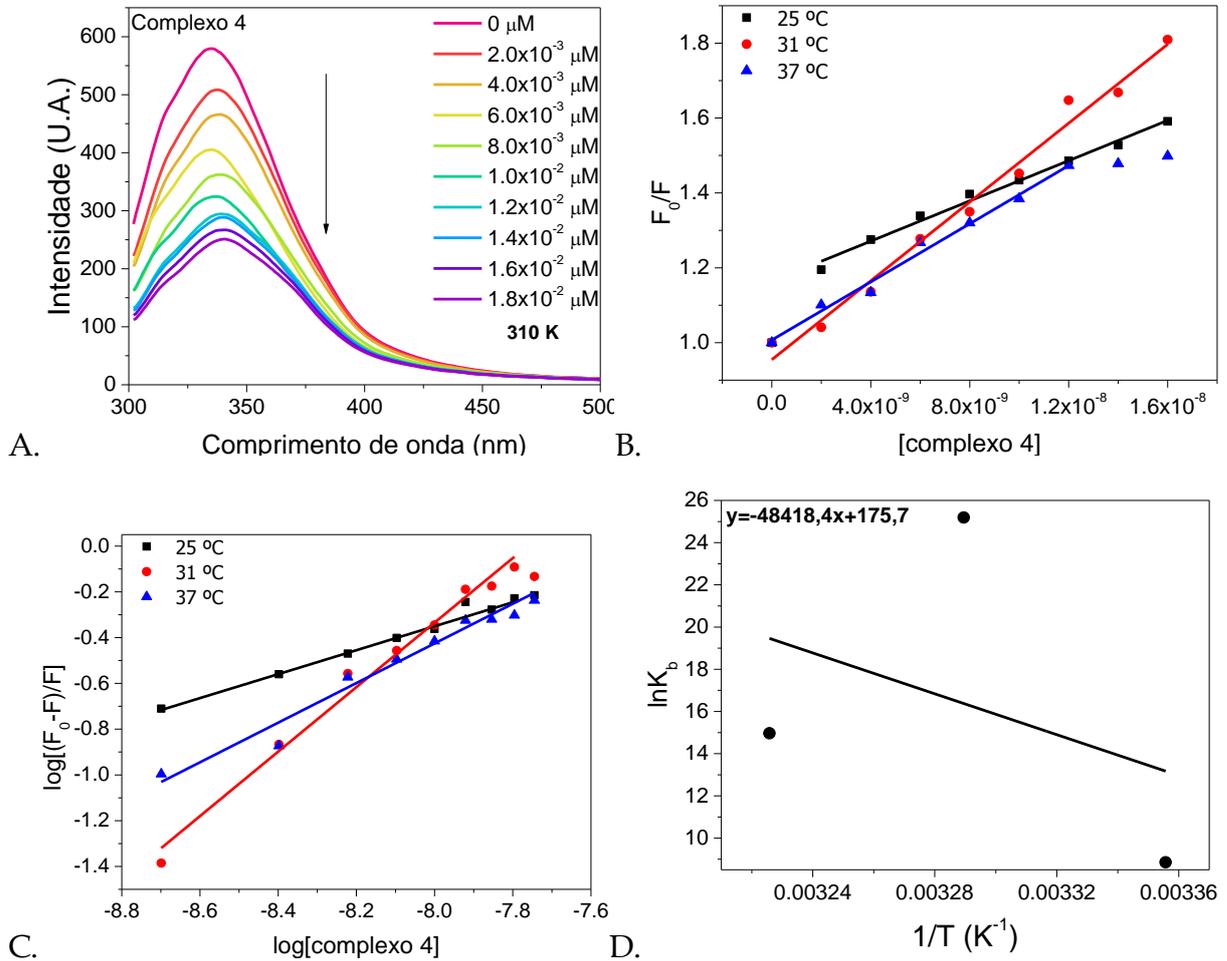
Fonte: Autora

Figura 110. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o **complexo 3**, acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação



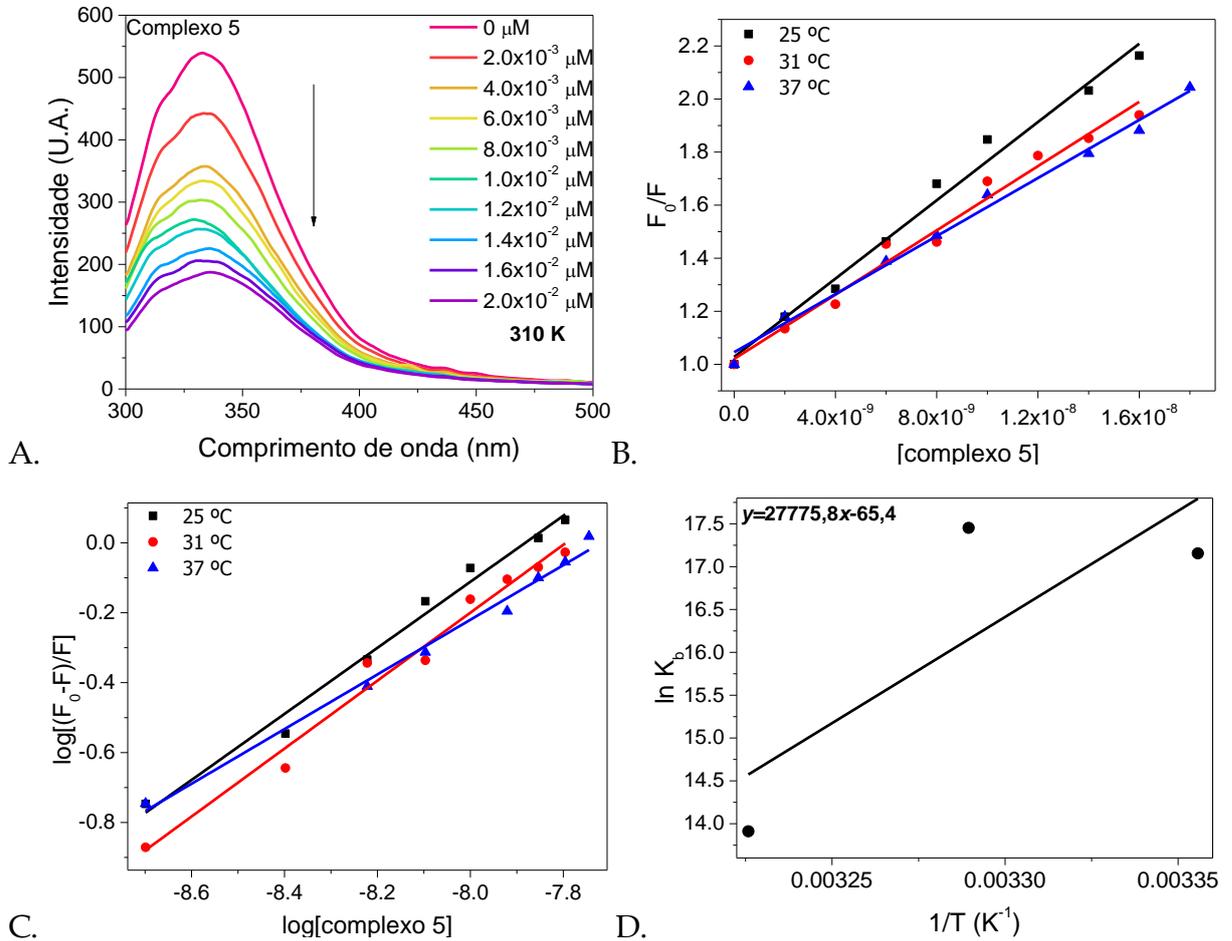
Fonte: Autora

Figura 111. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o **complexo 4**, acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação



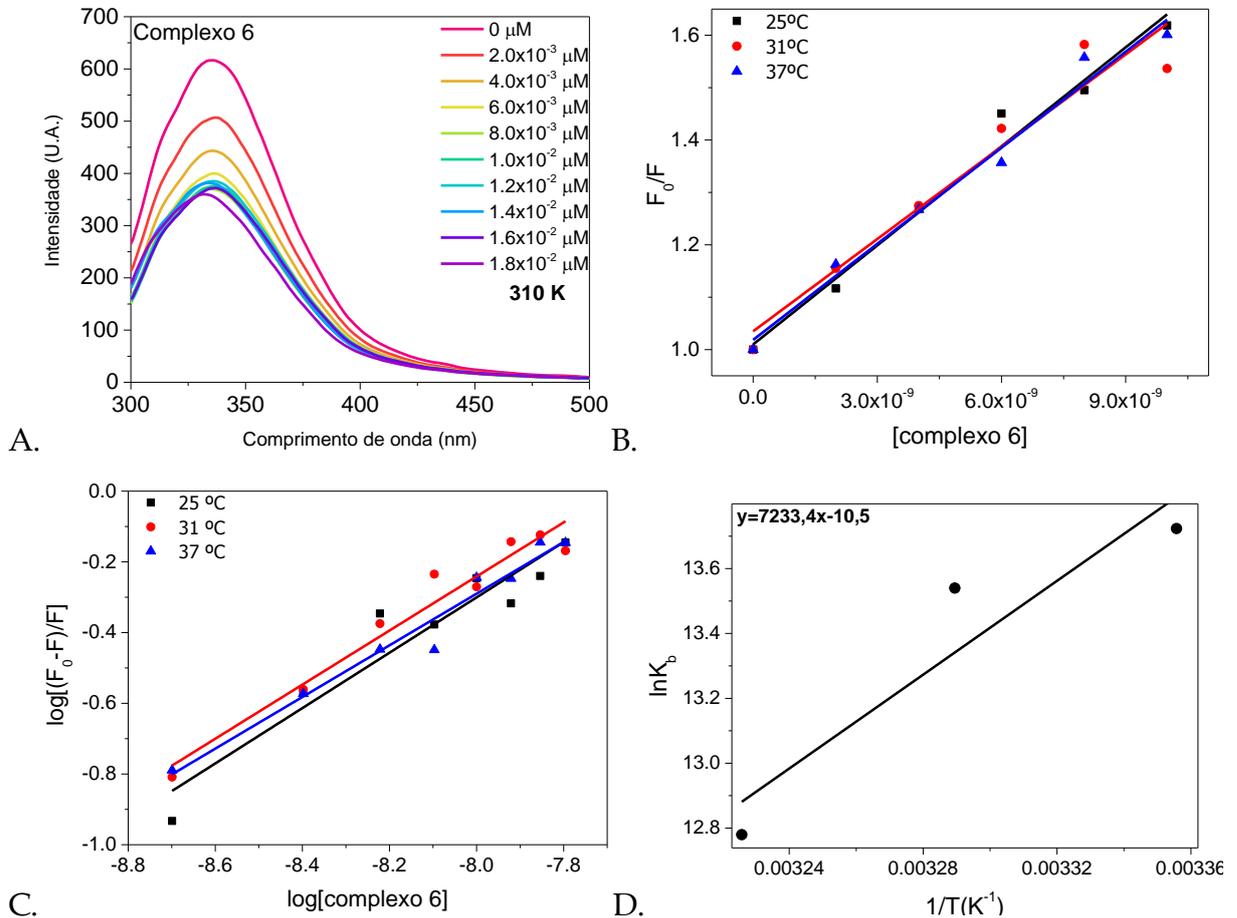
Fonte: Autora

Figura 112. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o **complexo 5**, acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação



Fonte: Autora

Figura 113. A-D. A. Titulação espectrofotométrica da albumina com o **complexo 6**, acompanhada por espectros de fluorescência. B e C. Gráficos do modelo de Stern-Volmer para determinação das constantes de supressão de fluorescência (K_{SV}) e de afinidade (K_b). D. Gráfico de van't Hoff para determinação das constantes termodinâmicas da interação



Fonte: Autora

Tabela 21. Valores das constantes obtidos pelas equações de Stern-Volmer e van't Hoff para a interação dos complexos 1-6 com HSA

Constantes	Complexo 1 Quinazolina			Complexo 2 5-nitroisoquinolina		
	298 K	304 K	310 K	298 K	304 K	310 K
T						
K_{SV} ($10^7 M^{-1}$)	7,70	3,71	3,99	2,89	1,95	1,79
k_s ($10^{15} M^{-1} s^{-1}$)	7,70	3,71	3,99	2,89	1,95	1,79
K_b ($10^5 M^{-1}$)	1,05	3,16	0,42	2,12	0,18	16,7
n	0,64	0,72	0,63	0,72	0,60	0,86
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-28,64	-32,00	-27,50	-31,32	-24,77	-36,93
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-57,33			+129,14	
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-91,95			+525,45	
Constantes	Complexo 3 5-bromoisoquinolina			Complexo 4 Isoquinolina		
	298 K	304 K	310 K	298 K	304 K	310 K
T						
K_{SV} ($10^7 M^{-1}$)	3,69	3,46	3,67	2,68	5,26	3,88
k_s ($10^{15} M^{-1} s^{-1}$)	3,69	3,46	3,67	2,68	5,26	3,88
K_b ($10^5 M^{-1}$)	216	75,5	33,9	0,07	8,7x10⁵	31,7
n	1,09	0,91	0,86	0,53	1,34	0,83
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-41,85	-40,03	-38,76	-21,93	-63,67	-38,58
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-118,6			+402,6	
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-257,7			+1460,8	
Constantes	Complexo 5 5-aminoisoquinolina			Complexo 6 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina		
	298 K	304 K	310 K	298 K	304 K	310 K
T						
K_{SV} ($10^7 M^{-1}$)	7,37	6,06	5,47	6,03	5,87	6,11
K_b ($10^5 M^{-1}$)	282	380	11,0	9,12	7,59	3,55
k_s ($10^{15} M^{-1} s^{-1}$)	282	380	11,0	9,12	7,59	3,55
n	0,95	0,97	0,78	0,78	0,69	0,73
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-42,52	-44,10	-35,85	-34,0	-34,22	-32,94
ΔH (kJ mol ⁻¹)		-206,0			-60,14	
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-543,3			-86,47	

Fonte: Autora

O complexo 2 é o único que apresenta decréscimo do valor da constante de Stern-Volmer com o aumento da temperatura. Para todos os outros, não existe uma dependência linear dos valores de K_{SV} com a temperatura. Apesar disso, em todos os casos os valores de k_s (combinação de K_{SV} com τ_0) são muito maiores que k_{diff} , (valores da ordem de 10^{15} contra $2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$). Desta maneira, é possível inferir que a supressão da

fluorescência da HSA ocorre também pelo mecanismo estático (DEWEY, 1991), assim, foi possível utilizar a Equação 8 para calcular os valores das constantes de ligação para a interação.

Pela análise da tabela, é possível verificar que as constantes de Stern-Volmer são bastante pronunciadas, com valores da ordem de 10^7 para todos os complexos, indicando que os mesmos interagem fortemente com a proteína HSA, apresentando uma grande afinidade por ela. Os maiores valores, no entanto, foram observado pelos complexos 5 e 6. Em relação ao complexo 5, a alta afinidade era esperada, em razão da presença do grupo amino, que facilita diversos tipos de interação, como ligações de hidrogênio, por exemplo. Para o complexo 6, a saturação do segundo anel parece favorecer a interação – possivelmente pela perda da planaridade de uma parte do ligante.

Em relação às constantes de ligação, K_b , de um modo geral, pode-se afirmar que todos os complexos possuem constantes de, no mínimo, 10^4 , o que indica que interagem consideravelmente com a HSA, corroborando o que foi observado para as constantes de Stern-Volmer.

Observou-se o maior valor de K_b para o complexo 4, cujo ligante é isoquinolina, em 30°C . Esta interação é fortemente justificada pelo fato de que este é o ligante mais hidrofóbico e planar, o que favorece a interação com a proteína, embora para este complexo não tenham sido observados os maiores valores de K_{sv} . O fato de a interação ser pronunciadamente maior em 30°C , cuja constante foi da ordem de 10^{10} , demonstra ser esta a temperatura ótima na qual a interação entre o complexo e a proteína é máxima, possivelmente devido à conformação da proteína nesta temperatura.

Excetuando-se a constante observada para o complexo 4, em 30°C , verificou-se que os complexos 3 e 5 apresentaram os maiores valores de constantes de ligação, o que pode ser justificado pelo fato de que o bromo possui alta afinidade por enxofre e, como é amplamente conhecido pela literatura, a proteína em estudo possui diversos aminoácidos cisteína, logo, justificável a alta afinidade do complexo com ligante 5-bromoisoquinolina pela HSA (HERGUÉ et al., 2008). Por sua vez, em relação ao complexo 5, acredita-se que a alta afinidade seja devida ao grupamento amino, o qual

permite ligações de hidrogênio entre o complexo e os grupamentos polares da proteína, como já discutido quando da discussão do valores de K_{sv} .

No que se refere à termodinâmica, a interação entre moléculas pequenas e macromoléculas pode ser descrita por quatro tipos de forças: ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de van der Waals e forças hidrofóbicas (HOU et al., 2008; LIU et al., 2011).

Uma das formas de se analisar as interações predominantes entre espécies pequenas e macromoléculas é utilizar os parâmetros termodinâmicos dependentes da temperatura: a variação da entalpia (ΔH), a variação da entropia (ΔS) e a variação da energia livre (ΔG) (HU et. al., 2009; XU et. al., 2009). Em relação a esses parâmetros, a literatura recorrente descreve que valores de ΔH e $\Delta S > 0$, sugerem forças hidrofóbicas; enquanto ΔH e $\Delta S < 0$ indicam que existam forças de van der Waals e ligações de hidrogênio; e $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, predominam as forças eletrostáticas (LIU et al., 2011).

Desta forma, os resultados obtidos para os complexos foram analisados e notou-se que apenas os complexos 2 e 4 apresentam interações com caráter predominantemente hidrofóbico, caráter este totalmente condizente com a estrutura do ligante 4, cuja planaridade e hidrofobicidade são observadas. Para o complexo 2, existe o grupo substituinte $-NO_2$ nos ligantes que, segundo o indicado por cálculos teóricos (POSSATO et al., 2017, submetido) deslocam a densidade eletrônica do complexo para periferia, mostrando que isso afeta não somente as propriedades espectroscópicas mas também sua ação em meio biológico.

Para os complexos 1, 3, 5 e 6 as interações observadas são, predominantemente, interações de van der Waals e/ou ligações de hidrogênio. Esses resultados são condizentes com o esperado, principalmente para os complexos 1, 3 e 5. Isso porque o complexo 1 tem um nitrogênio não coordenado disponível para participar de ligações de hidrogênio, bem como o complexo 5 tem, na composição dos ligantes, substituintes $-NH_2$, que também têm a possibilidade deste tipo de interação. Ou, no caso do complexo 3, a presença do substituinte $-Br$ pode direcionar para a formação de dipolos. No caso do complexo 6, acredita-se que embora não haja substituição que justifique forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio, é possível verificar que a ausência da conjugação

eletrônica em um dos anéis reduz a planaridade do ligante (em relação à isoquinolina), e é possível que esse fato tenha contribuído para a diminuição da possibilidade dele interagir por forças hidrofóbicas.

3. Conclusões parciais

Primeiramente, é importantíssimo ressaltar que a hipótese proposta sobre como a coordenação aos ligantes azanaftalenos melhoraria a interação com biomoléculas foi completamente verificada.

Apesar de os complexos 1-6 não interagirem com o DNA tão fortemente quanto o *esperado*, não há como negar que os valores obtidos para as constantes de ligação são bastante interessantes. Além disso, com os resultados da interação com HSA, é possível dizer que eles têm mais afinidades por proteínas do que pelo DNA em si, o que não exclui a possibilidade do mecanismo de ação estar ligado ao DNA: existem várias proteínas que controlam os processos de replicação e reparo do DNA, além daquelas responsáveis pelo transporte, proteínas de membrana entre outras classes.

Com relação à interação com biomoléculas como um todo, os estudos terão continuidade avaliando as constantes termodinâmicas por ITC (do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*), uma técnica extremamente sensível capaz de determinar o calor envolvido na interação, e, desta forma, a determinação das constantes termodinâmicas ocorre de maneira direta. Além do ITC, pretende-se analisar como os complexos são capazes de modificar as estruturas tanto do DNA quanto da albumina, e isso pode ser feito através de experimentos de dicroísmo circular.

CAPÍTULO 5

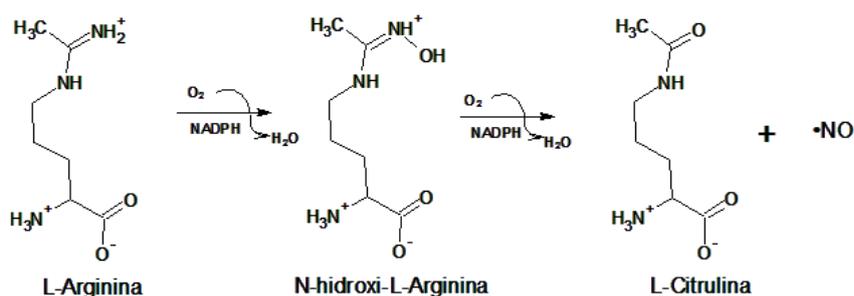
NITROSILO COMPLEXOS TRINUCLEARES DE RUTÊNIO

3. Introdução

O óxido nítrico (NO), durante muito tempo, foi relacionado à sua toxicidade como poluente ambiental e a propriedades potencialmente carcinogênicas, porém esse quadro mudou quando, na década de 80, Furchgott, Murad e Ignarro relacionaram o óxido nítrico ao Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF, da sigla em inglês para *Endothelium-Derived Relaxing Factor*) e, a partir desta descoberta, o volume de trabalhos envolvendo a pesquisa sobre o NO cresce a cada dia, revelando as propriedades benéficas desta molécula, como vasodilatação, ação antitumoral, ação antiplaquetária e neurotransmissão. Além disso, é sabido que o NO participa de processos fisiológicos, regulatórios, imunológicos e, também, de patologias (IGNARRO, 2000).

O NO é endogenamente produzido no endotélio vascular, cérebro, e sistema imunológico pela transformação de L-arginina em L-citrulina, reação mediada por NADPH e catalisada pelas NOSintetases (NOS), que apresentam diferentes isoformas baseadas na distribuição dos tecidos (IGNARRO, 2000). O Figura 114 mostra a produção do NO:

Figura 114. Esquema ilustrando como o NO é produzido endogenamente



Fonte: Adaptado de (QUEIROZ; BATISTA, 1999)

A descoberta da face benéfica do óxido nítrico trouxe também o interesse no desenvolvimento de compostos sequestradores e doadores de NO, para que patologias como choque séptico (sequestradores) e hipertensão arterial, câncer (doadores) possam ser tratadas a partir destes novos compostos. Um exemplo de composto sequestrador é

o $K[RuCl(edta)]$ (DAVIES et al., 1997), e alguns exemplos de compostos doadores são os diazenodiolatos, como o sal de Angeli ($Na_2N_2O_3$) (HRABIE; KEEFER, 2002), os S-nitrosotióis, como a S-nitrosoglutationa (SINGH et al., 1996) e complexos de metais de transição, como o nitroprussiato de ferro ($Na_2[Fe(CN)_5(NO)] \cdot 2H_2O$), que é utilizado clinicamente para o tratamento de crises hipertensivas (RONCAROLI; OLABE; VAN ELDIK, 2003).

Os nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(L)_2NO]PF_6$, nos quais L são ligantes piridínicos, compõem uma promissora classe de compostos doadores de NO, são estudados devido às suas propriedades bastante interessantes, inclusive para aplicação biológica (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CARNEIRO et al., 2014; CACITA et al., 2015).

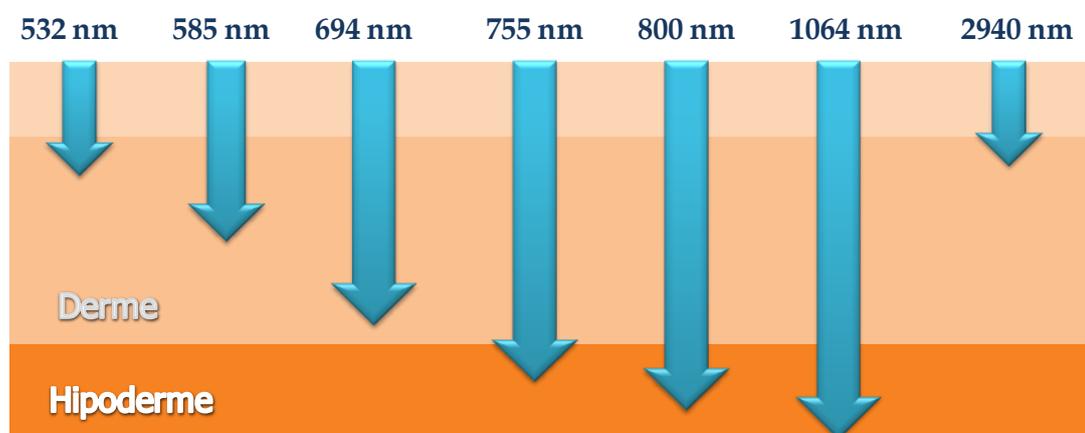
Na maioria dos nitrosilo complexos de rutênio mononucleares, é a interação da retrodoação entre o centro metálico em baixo estado de oxidação e o NO^+ que confere estabilidade termodinâmica a estes compostos no estado fundamental. Esta estabilidade é quebrada quando o óxido nítrico é reduzido quimicamente ou quando o complexo é irradiado em bandas de transferência de carga, simulando esta redução no estado excitado. Já nos compostos trinucleares, a unidade $[Ru_3O]^+$ apresenta um elétron desemparelhado e, sendo assim, não possui afinidade pelo ligante NO^+ e sim pelo NO^0 , que também tem um elétron desemparelhado. Os estudos realizados até o momento (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015) mostram que, no caso do cluster, é o emparelhamento desses elétrons que confere estabilidade termodinâmica aos compostos, e mais, este emparelhamento ocorre devido a uma grande mistura dos orbitais do óxido nítrico e da unidade $[Ru_3O]^+$.

De maneira geral, a ativação dos complexos para liberação do NO ocorre através de redução química ou eletroquímica e irradiação com luz na região do UV-visível, como já foi relatado para diversos nitrosilo complexos de rutênio (CLARKE, 2003; TFOUNI et al., 2012).

Embora seja possível afirmar que a liberação do NO por estímulo redutivo ocorra tanto nos nitrosilo complexos de rutênio mononucleares quanto nos nitrosilo complexos trinucleares, a maneira com que ela acontece percorre caminhos diferentes. Como já

relatado (TFOUNI et al., 2012), para o caso de complexos como o *trans*-[RuCl(cyclam)NO]Cl₂, por exemplo, a liberação é ativada a partir da redução NO⁺/NO⁰, e a ligação Ru^{II}–NO⁰ pode ser rompida mais facilmente, pois a afinidade do metal pelo ligante diminuiu. Para o caso dos nitrosilo complexos trinucleares, a coordenação do NO ocorre quando os três núcleos de rutênio estão no estado de oxidação +3 ([Ru^{III},Ru^{III},Ru^{III}], [Ru₃O]⁺), o que torna a coordenação do NO⁰ favorável. Sendo assim, a liberação do NO ocorre na faixa de potenciais de redução da unidade [Ru₃O]⁺ (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015), um mecanismo diferente do relatado para os primeiros, sendo que isto é de grande serventia pois, existem pelo menos três processos redox acessíveis em meio biológico, e tais propriedades eletroquímicas podem ser moduladas pela natureza do ligante periférico. Com relação à liberação do NO por estímulo luminoso, os nitrosilo complexos trinucleares são capazes de liberar o NO a partir da irradiação com luz em comprimentos de onda que compõe a janela terapêutica da Terapia Fotodinâmica (Figura 115), sendo que os maiores rendimentos para a liberação do NO ocorrem em 532 nm, existindo uma pequena liberação em 660 nm (CACITA et al., 2015). Apesar dos comprimentos de onda onde ocorre a liberação de NO da janela terapêutica, a melhor faixa ainda é 700-1100 nm, porque é quando a luz atinge as camadas mais profundas da pele (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002; CATORZE, 2009), como mostra a Figura 115.

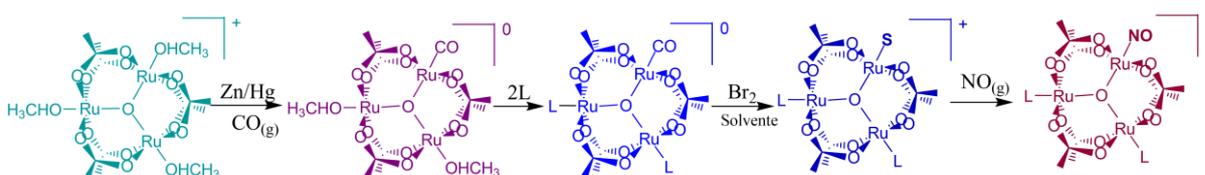
Figura 115. Esquema representando a janela terapêutica da Terapia Fotodinâmica



Fonte: (POSSATO, 2013)

Entretanto, existe um problema sintético com relação à obtenção dos complexos trinucleares com NO, pois, pelo método convencional (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015), é necessário passar por muitas etapas até chegar ao nitrosilo complexo desejado (Figura 116), fazendo uso de reagentes potencialmente tóxicos, e diminuindo o rendimento final da síntese.

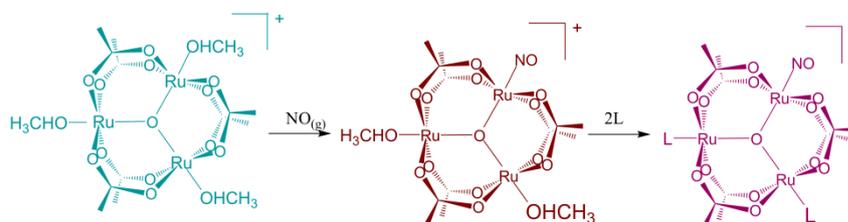
Figura 116. Esquema representando as etapas de obtenção de um nitrosilo complexo trinuclear de rutênio pelo método convencional



Fonte: Autora

O que se propõe aqui é um novo método de obtenção dos nitrosilo complexos trinucleares de rutênio que utilize menos etapas a partir da formação direta de um complexo precursor com NO, não sendo necessário a utilização do complexo carbonílico intermediário.

Figura 117. Esquema representando a obtenção de um nitrosilo complexo trinuclear de rutênio através do método proposto nesse trabalho



Fonte: Autora

4. Materiais e métodos

a) Síntese do complexo $K_3[RuCl_6]$

O complexo hexaclorrrutenato (III) de potássio foi sintetizado de acordo com o descrito na literatura (JAMES; MCMILLAN, 1975). 5,0 g ($2,0 \times 10^{-2}$ mol) de $RuCl_3 \cdot nH_2O$ foram dissolvidos em 250 mL de metanol e refluxados em atmosfera de hidrogênio durante 6 h (até que se observasse uma coloração verde intensa no meio reacional). Após a mudança de cor do meio, cessou-se o fluxo de hidrogênio, adicionou-se 4,5 g

($6,0 \times 10^{-2}$ mol) de KCl e o sistema foi mantido em refluxo durante a noite, e, deste modo, ao final da reação, obteve-se uma grande quantidade de sólido marrom escuro e apenas uma ligeira coloração esverdeada foi observada no sobrenadante. O sólido ($K_2[RuCl_5(H_2O)]$) foi filtrado a vácuo e recristalizado com ácido clorídrico concentrado, dando origem a um sólido castanho avermelhado ($K_3[RuCl_6]$). Massa obtida após a recristalização: 5,3 g (65% de rendimento).

b) *Nova síntese do "cluster mãe" - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$*

A nova rota sintética proposta para o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$ foi feita seguindo adaptações àquela proposta por Meyer e colaboradores (BAUMANN et al., 1978) e utilizada anteriormente neste projeto de doutorado.

1,0 g de $K_3[RuCl_6]$ ($2,3 \times 10^{-3}$ mol) foi dissolvido em 6 mL de água quente. Em um balão de fundo redondo, dissolveu-se 1,2 g de KCH_3COO ($1,2 \times 10^{-2}$ mol) em 15 mL de metanol e 15 mL de ácido acético glacial. Essa mistura foi aquecida até $68^\circ C$, quando a solução de $K_3[RuCl_6]$ foi adicionada ao balão. O sistema imediatamente fica vermelho, após alguns minutos passa para vinho, depois marrom, verde escuro e, finalmente, verde azulado, que é a cor do produto desejado. Após 30 minutos de aquecimento, já não se observa mudanças de cor (ou alterações espectrais). O meio reacional foi rotoevaporado a fim de retirar o excesso de ácido acético e o composto foi precipitado com éter etílico previamente tratado. Massa obtida: 1,5 g (79% de rendimento).

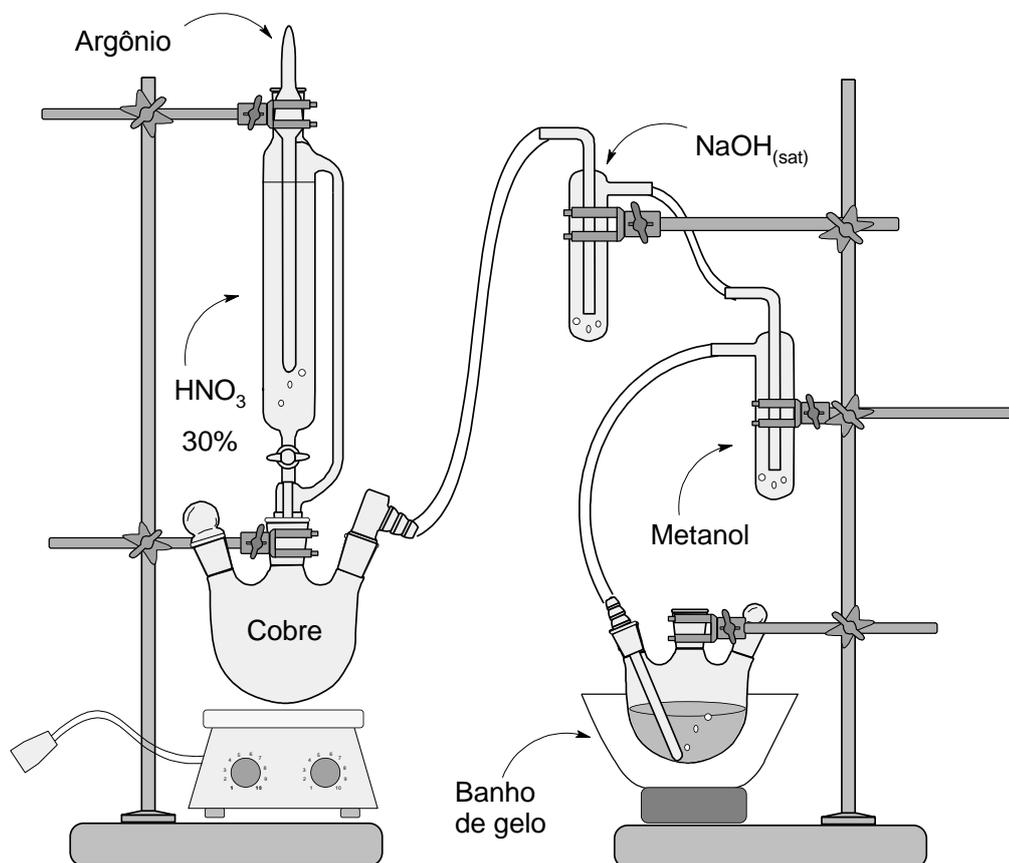
c) *Síntese do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$*

A síntese do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$ (CMNO) foi realizada através do borbulhamento de NO em uma solução do precursor $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$ (*cluster mãe*) feita em uma mistura 4:1 diclorometano:metanol.

O óxido nítrico foi gerado através da reação entre ácido nítrico 30% e cobre metálico (utilizado na forma de pastilhas), em um sistema adaptado para a geração do gás, previamente purgado com argônio, utilizando um funil de adição de 250 mL, um balão de três bocas de 500 mL, conexões de junta esmerilhada e dois frascos lavadores: o primeiro contendo uma solução saturada de hidróxido de sódio e o segundo contendo

metanol. A pressão do sistema foi mantida por um fluxo contínuo do argônio, o mesmo utilizado para purgar o sistema antes do início da produção do NO, como mostra a Figura 118:

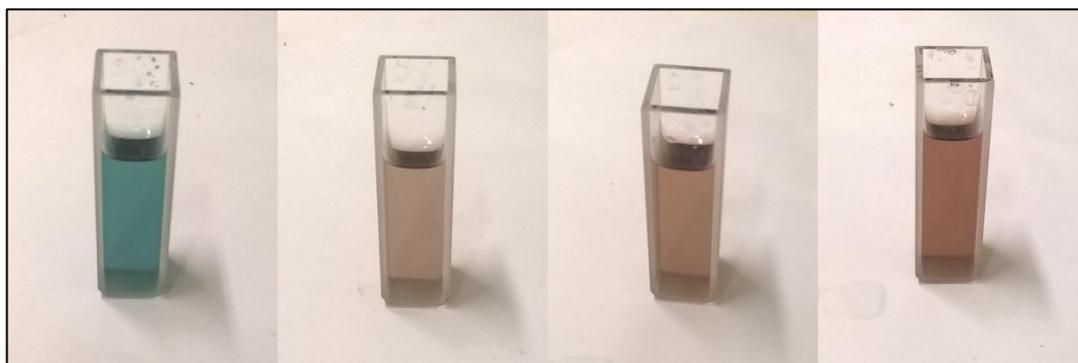
Figura 118. Esquema ilustrando o aparato utilizado para a geração do óxido nítrico



Fonte: Autora

Após gerado, o gás foi borbulhado em 20 mL da solução de cluster mãe, dissolvendo-o em 5 mL de metanol e completando o volume com diclorometano. A mistura de solventes continha 100 mg do precursor ($1,2 \times 10^{-4}$ mol). A reação foi mantida no abrigo de luz, sob agitação e em banho de gelo durante 6 h. Após este período, observa-se que ocorre a mudança de coloração do meio: de azul esverdeado para castanho avermelhado (Figura 119). Nesse ponto, já é possível adicionar o ligante desejado e continuar a reação sem que haja necessidade de isolar o precursor de NO. Considerou-se que o rendimento da síntese foi de 100%.

Figura 119. Fotografias feitas durante a reação para obtenção do CMNO, ilustrando a mudança de cor do meio



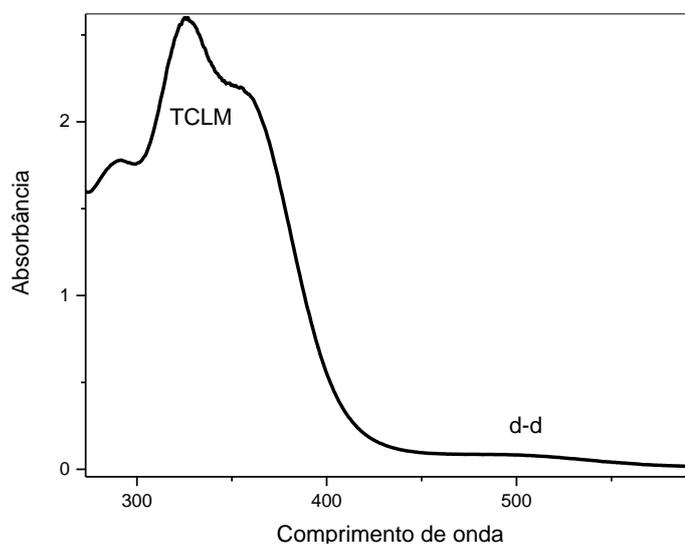
Fonte: Autora

5. Resultados e discussão

a) Síntese do complexo $K_3[RuCl_6]$

Sintetizar o complexo $K_3[RuCl_6]$ é uma maneira bastante eficiente de garantir que todo rutênio presente numa síntese seja Ru(III), uma vez que, durante o processo sintético, ocorre a redução de todas as espécies presentes (JAMES; MCMILLAN, 1975) no $RuCl_3 \cdot nH_2O$ para Ru(II), que será reoxidado para Ru(III). Assim, evita-se a presença de espécies com diferentes reatividades e propriedades catalíticas como os contaminantes comuns do reagente cloreto de rutênio (III) comercial. O íon $[RuCl_6]^{3-}$ apresenta geometria octaédrica e seu espectro de absorção apresenta uma banda devido à transição de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM), e, em concentrações muito elevadas, é possível observar a banda da transição d-d na região de 500 nm, como mostra a Figura 120:

Figura 120. Espectro de absorção do $K_3[RuCl_6]$. (a medida foi realizada em desacordo com a Lei de Lambert-Beer para ressaltar a transição d-d)



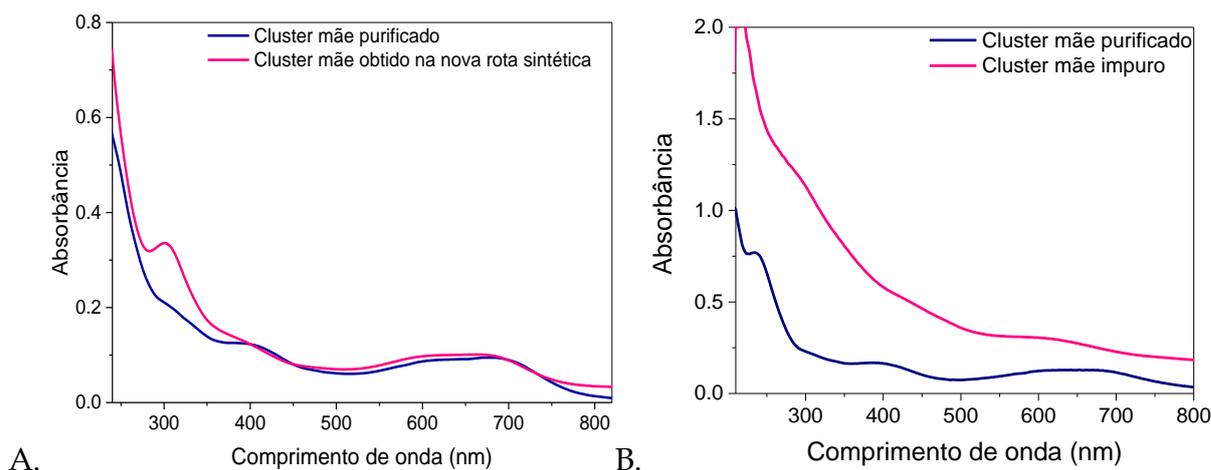
Fonte: Autora

b) Nova síntese do “cluster mãe” - $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$

A utilização de $RuCl_3 \cdot nH_2O$ na síntese do “cluster mãe” ($[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$) é feita desde antes da década de 30 (MOND, 1930), ano da primeira publicação envolvendo acetatos de rutênio, e, num primeiro momento, mudar o precursor de uma rota sintética clássica parece um despropósito, uma vez que, apesar dos baixos rendimentos, os processos sintéticos são bem sucedidos. Porém, durante o desenvolvimento da síntese direta do $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$, notou-se a necessidade de purificação do “cluster mãe” - como será discutido a seguir - e, desta forma, inserir modificações no processo sintético do precursor de maneira a não ser mais necessário purificá-lo pareceu uma alternativa razoável. Desta forma, adaptou-se a síntese do “cluster mãe”, onde a fonte de íons rutênio foi mudada para $K_3[RuCl_6]$, que, como já discutido anteriormente, apresenta vantagens como presença somente de Ru(III) e seis ligantes iguais, por exemplo. Além disso, diminuiu-se a quantidade de acetato (utilizou-se acetato de potássio somente porque esse também é o contraíon do complexo precursor). Com isso, o tempo necessário para obtenção do complexo caiu drasticamente, e, agora, é possível obter o complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$ sem a etapa de purificação prévia. A Figura 121A mostra a comparação entre os espectros de absorção

do “cluster mãe” purificado e aquele obtido no novo processo sintético e a Figura 121B mostra a diferença entre o cluster mãe purificado e aquele obtido ao final da síntese na rota clássica:

Figura 121. A. Espectros de absorção na região UV-vis do “cluster mãe” purificado e do obtido pela rota sintética nova. B. (Figura retirada do relatório 2) Espectros de absorção na região UV-vis do “cluster mãe” purificado e do impuro



Fonte: Autora

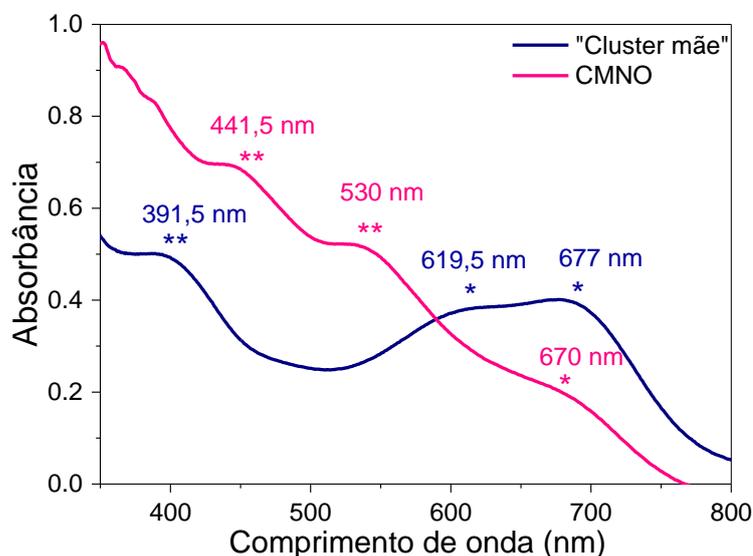
c) Síntese do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$

O complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_2(NO)](CH_3COO)$ foi sintetizado com o objetivo de ser o precursor para a síntese dos nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, uma vez que, até então, a rota sintética utilizada (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015) passava, obrigatoriamente, pela obtenção e isolamento dos complexos carbonílicos.

Foi através dessa síntese que notou-se a importância da purificação do “cluster mãe”, $[Ru_3O(CH_3COO)_6(CH_3OH)_3](CH_3COO)$, já que, sem essa etapa, não é possível obter o nitrosilo complexo. E foi por isso que a síntese do “cluster mãe” foi adaptada.

A evolução da síntese foi acompanhada por espectros de absorção na região do visível, já que a coordenação do NO, um ligante π -receptor forte, perturba os níveis de energia do complexo, alterando significativamente as transições mas, principalmente, as intracluster, que têm caráter metálico predominantemente, originadas na unidade $[Ru_3O]^+$. Além disso, ocorre um abaixamento da simetria do complexo de D_{3h} para C_{2v} , o que muda também as características dos espectros, como mostra a Figura 122:

Figura 122. Espectros de absorção do “cluster mãe” antes e depois da reação com NO. As bandas marcadas (**) foram atribuídas como transições transferência de carga e as bandas marcadas por (*), transições intracluster



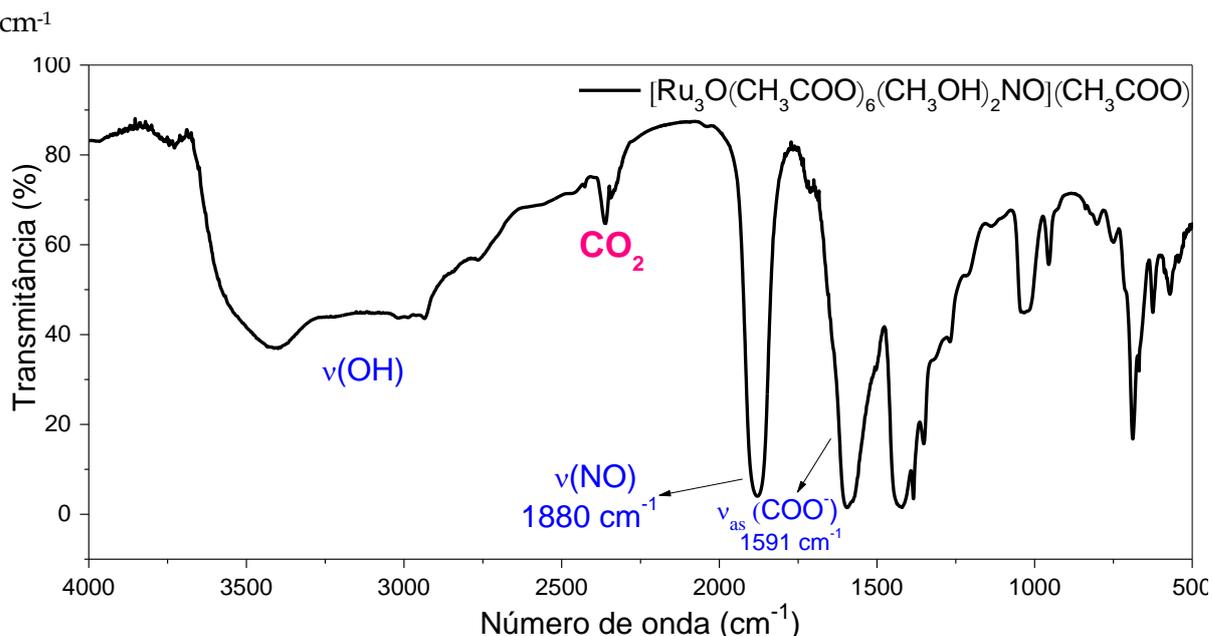
Fonte: Autora

Os espectros de absorção foram feitos de maneira qualitativa, e, desta forma, nada se pode dizer sobre a mudança de intensidade das bandas. O perfil espectral obtido para o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2(\text{NO})]^+$ está em concordância para o descrito na literatura (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015), inclusive pelo fato de não seguir a atribuição utilizada para um grande número de compostos (TOMA et al., 2001), feita com base no diagrama de orbitais moleculares desenvolvido por Meyer (BAUMANN et al., 1978). Para o caso dos nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, a mistura orbital, apresentada após a coordenação do ligante NO à unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$, é muito grande, havendo contribuições em diferente níveis energéticos, mesmo naqueles onde a característica metálica predomina, o que é corroborado por cálculos teóricos (TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015).

Para caracterização parcial do complexo, após a finalização da síntese, o solvente do meio foi retirado com o auxílio de um evaporador rotativo, mas essa secagem não foi efetiva, uma vez que seria necessário manter o composto em dessecador e pesá-lo até massa constate. Mesmo assim, utilizou-se também a espectroscopia vibracional na região do infravermelho, como uma forma de verificar a coordenação do óxido nítrico

ao complexo. O estiramento do NO coordenado tem energia característica (NAKAMOTO, 1997; TOMA; ALEXIOU; DOVIDAUSKAS, 2002b; TFOUNI et al., 2003; TOMA et al., 2005; CACITA et al., 2015) (em torno de 1900 cm^{-1}) mas depende da natureza do ligante. No caso do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2(\text{NO})](\text{CH}_3\text{COO})$, o estiramento do NO aparece em 1880 cm^{-1} , como mostra a Figura 123:

Figura 123. Espectro de infravermelho do CMNO destacando o estiramento do NO em 1880 cm^{-1}



Fonte: Autora

Embora ocorra a formação do complexo, ele não pode ser isolado e armazenado, pois 72 h após o final da síntese, já não se observa mais o perfil característico dos nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, ou seja, a ausência das bandas das transições TCCL (448 e 524 nm) intracluster (680 nm) mostra que a unidade $[\text{Ru}_3\text{O}]^+$ foi decomposta, o que dificulta seu processo de caracterização, como o cálculo dos coeficientes de absorvidade molar, a geração dos espectros de ressonância magnética nuclear e dos espectros de massa, por exemplo.

Embora seja instável, o composto $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2(\text{NO})](\text{CH}_3\text{COO})$ ainda é uma boa alternativa como precursor para a obtenção dos nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, na medida em que pode-se dar continuidade à síntese sem isolá-lo, trocando as moléculas de solvente por ligantes piridínicos, por exemplo.

6. Conclusões parciais

Segundo os dados apresentados aqui, é possível dizer que as adaptações às rotas sintéticas foram bem sucedidas.

Sobre a nova rota sintética para obtenção do $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3](\text{CH}_3\text{COO})$, é importante ressaltar que, apesar de o processo contar com a síntese do $\text{K}_3[\text{RuCl}_6]$ antes da obtenção do “cluster mãe” propriamente dito, a inserção de uma nova etapa não é prejudicial, muito pelo contrário, ela é determinante para a obtenção de um produto com o grau de pureza mais elevado, e isso impacta diretamente o sucesso das sínteses nas quais ele será utilizado como precursor.

Apesar de sua instabilidade, o complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{NO}](\text{CH}_3\text{COO})$ mostrou-se uma excelente alternativa à utilização do intermediário carbonílico, que, entre outras desvantagens apresentadas por essa rota, apresenta utilização de bromo como agente oxidante.

Considerações finais

Neste trabalho foram feitos vários estudos que envolveram a obtenção de novos compostos de rutênio e as caracterizações, além de uma série de outras características importantes acerca de atividade biológica.

Na primeira parte do trabalho, procedeu-se à síntese de compostos trinucleares de rutênio simétricos. A fórmula geral corresponde a $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]\text{PF}_6$, sendo que para $\text{L} = \mathbf{(1)}$ temos a quinazolina (qui). Os demais complexos correspondem a $\mathbf{(2)}$ 5-nitroisoquinolina (5-nitro), $\mathbf{(3)}$ 5-bromoisoquinolina (5-briq), $\mathbf{(4)}$ isoquinolina (iq), $\mathbf{(5)}$ 5-aminoisoquinolina (5-amiq), e $\mathbf{(6)}$ 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (thiq). As rotas sintéticas utilizadas seguidas de procedimentos de purificação foram efetivas e apresentaram produtos com grau de pureza que permitiu as avaliações necessárias para as análises biológicas.

Todos os complexos foram submetidos à caracterizações por diferentes metodologias: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho, Espectroscopia de Absorção na região do UV-visível, Voltametria Cíclica e Espectroeletrólise. Os resultados relacionados à interpretação das estruturas obtidas por essas técnicas mostraram que os complexos obtidos a partir das sínteses realizadas foram estruturalmente caracterizados de acordo com as perspectivas iniciais. Isso demonstrou que todo o procedimento de síntese, purificação e determinação estrutural está de acordo com os objetivos específicos inicialmente propostos em relação a esses tópicos.

No que concerne ao estudo da correlação das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas com a natureza do ligante periférico, encontramos que todas as técnicas utilizadas comprovaram a dependência das propriedades espectroscópicas em termos da basicidade dos ligantes. Esse tipo de análise é capaz de oferecer informação sobre a densidade eletrônica em um complexo metálico, podendo ser classificados em predominantemente π -receptores (ácidos) e predominantemente σ -doadores (básicos). A influência do pK_a dos ligantes nas propriedades espectroscópicas e eletroquímicas é importante para aferir os procedimentos de π -recepção e σ -doação. Dessa maneira, a técnica utilizada para o cálculo dos valores relacionados aos ligantes azanaftalenos foi

eficiente dadas as restrições de solubilidade. Considerando que o pK_a da isoquinolina é 5,17, pode-se dizer que ele é um ligante σ -doador (mais básico), enquanto que considera-se quinazolina, 5-nitroisoquinolina e 5-bromoisoquinolina como sendo os ligantes com característica mais π -receptora (mais ácidos), ao passo que isoquinolina, 5-aminoisoquinolina e 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina têm características mais σ -doadoras. Além disso, os ligantes azanaftalenos foram capazes de estender o sistema π do complexo, o que resultou em uma majoração do acoplamento eletrônico. Dessa forma, estado de oxidação da unidade $[Ru_3O]^n$ foi capaz de causar uma perturbação adicional nos orbitais dos ligantes.

Por meio da difração de raios-X para o complexo 1, os resultados mostraram que os três ligantes quinazolina apresentam um nível de coplanaridade bastante elevado com a unidade $[Ru_3O]^+$. Isso provavelmente ocorreu devido aos efeitos eletrônicos provenientes da deslocalização da densidade eletrônica do complexo para a periferia, através do sistema π formado pelos ligantes. Esta informação foi confirmada por todas as correlações feitas entre as propriedades dos ligantes livres (pK_a) e os dados espectroscópicos dos complexos.

Os dados obtidos por 1H -RMN mostraram que os ligantes que possuem substituintes retiradores de elétrons foram capazes de estender o sistema π deslocalizado, atenuar a anisotropia paramagnética, e fornecer valores de $\Delta\delta$ maiores. Além disso, a dependência dos deslocamentos químicos com o pK_a dos ligantes livres mostrou que deslocalização através do sistema π influenciou a densidade eletrônica na periferia dos complexos. A σ -doação causada pelos ligantes mais básicos - σ -doadores-foi praticamente responsável pela densidade eletrônica da unidade $[Ru_3O]^+$. Todos os dados obtidos pelas outras técnicas espectroscópicas e de voltametria cíclica são consistentes.

De uma maneira simplificada, ainda que tenha havido um aumento da densidade eletrônica do centro metálico por conta da σ -doação, há a deslocalização de uma parte em direção à periferia dos complexos através do sistema π estendido. Foi possível corroborar esse fenômeno por meio dos dados obtidos pelos experimentos de espectroeletrólise. No caso do complexo 5, mesmo apresentando um ligante mais básico, não houve impedimento para que as transições internas do ligante fossem

perturbadas pela variação da densidade eletrônica do núcleo. O fato de as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ mudarem com o a redução $[\text{Ru}_3\text{O}]^+ / [\text{Ru}_3\text{O}]^0$ ainda não havia sido descrito para os complexos trinucleares de rutênio simétricos.

A obtenção de monocristais apropriados para difração de raios-X tornou possível a utilização dessa técnica na caracterização estrutural de pelo menos um complexo da série, tornando-o representante dos outros complexos, visto que todos os outros dados da caracterização são autoconsistentes na série. Além da difração de raios-X, utilizou-se análise elementar e espectrometria de massas. As duas últimas convergiram para o mesmo ponto já dito anteriormente: a obtenção e purificação dos complexos 1-6 foi bem sucedida e o alto grau de pureza dos complexos permitiu que eles pudessem continuar nos testes biológicos.

Para avaliar a atividade biológica da nova classe de complexos estudada, foram feitos experimentos em relação à atividade anticâncer e tripanocida. No primeiro caso, estudou-se o comportamento frente à linhagem B16F10 (melanoma murino). No segundo, a ação em relação ao parasita *Trypanosoma cruzi* nas formas tripomastigota e amastigota e à fase aguda da Doença de Chagas foi estudada *in vivo*.

Em relação à atividade anticâncer, foi observado que os complexos 4 e 5 têm o melhor desempenho contra a linhagem de melanoma murino. É comum o bom desempenho frente às linhagens de câncer estar relacionado à interação com DNA. Para os complexos apresentados aqui, existe a interação, principalmente o complexo 4, mas a afinidade que ambos apresentam por albumina deve ser mencionada como o principal fator para a sua elevada ação. Isso não quer dizer que eles não estejam atuando indiretamente em processos relacionados ao DNA. É possível que os complexos liguem-se a proteínas essenciais para o reparo e replicação do material genético, e, impedindo esses processos, causam a morte celular. Vale lembrar que pelo menos o complexo 4 é específico para células cancerígenas, não apresentando citotoxicidade em linhagens saudáveis.

A atividade antiparasitária também foi comprovada através dos estudos de toxicidade contra as linhagens tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*, presentes, respectivamente nas fases aguda e crônica da Doença de Chagas. Alguns azanaftalenos,

como o quinino e a cloroquina, apresentam atividade antiparasitária por si só. Mas, indubitavelmente, a complexação dos ligantes apresentados aqui ao centro metálico magnifica sua ação frente ao parasita responsável por esta moléstia. O composto que apresentou a melhor atividade foi o complexo 6. Muito mais ativo que o medicamento de referência, ele foi selecionado para continuar nos testes in vivo contra a fase aguda da Doença de Chagas, e, apesar de não diminuir substancialmente a quantidade de parasitas no sangue das cobaias, e ele foi capaz de limpar a infecção no tecido cardíaco, comparativamente de uma maneira mais eficiente que o próprio benzonidazol.

Mesmo havendo estudos que exploram a atividade antiparasitária de medicamentos anticâncer, este trabalho mostrou que esse comportamento não é uma constante. O complexo 6, por exemplo, não apresentou grande desempenho em relação à aniquilação das células de B16F10, apesar de ter tido uma atividade tripanocida mais pronunciada. Esse comportamento diferenciado indica que pode haver complexos com alta afinidade pelo alvo, podendo ser específicos para cada tipo de ação.

O comportamento em relação à possível interação entre os complexos e biomoléculas foi analisado utilizando como alvo o DNA presente em esperma de peixe e Albumina de Soro Humano. No que diz respeito à albumina, mostrou-se que a interação com proteínas pode ser mais efetiva do que a encontrada para o DNA. Contudo, esse resultado não é excludente, o que pode indicar que pode haver mecanismo de ação em relação ao DNA, uma vez que várias proteínas são responsáveis não só por outros processos biológicos.

Podemos dizer, portanto, que em relação à atividade biológica os resultados mostraram que há uma promissora possibilidade de utilização dos complexos trinucleares de rutênio com ligantes azanaftalenos como metalofármacos. A melhora da atividade observada para os ligantes azanaftalenos foi verificada e houve maior performance em relação aos ligantes livres e complexos simétricos análogos.

Os estudos aqui realizados demonstraram que há argumentos que podem justificar a continuidade dessa investigação.

Para o estudo de um novo precursor para a síntese de nitrosilo complexos trinucleares de rutênio, optou-se por estudar uma rota sintética mais simples e

potencialmente menos perigosa. Através da investigação da nova rota sintética, percebeu-se a necessidade da purificação do complexo precursor $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{CH}_3\text{OH})_3](\text{CH}_3\text{COO})$, uma vez que utilizá-lo impuro torna impossível a obtenção do $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{NO}](\text{CH}_3\text{COO})$. Alternativamente à purificação, encontrou-se um meio de isolar o complexo precursor diretamente do processo sintético. Adaptações foram feitas à rota original, sendo que a principal foi a troca de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ por $\text{K}_3[\text{RuCl}_6]$, resultando em um processo sintético mais rápido e eficiente. O novo precursor de nitrosilo complexos trinucleares de rutênio foi obtido de maneira bem sucedida em ambos os casos.

Referências Bibliográficas

ABE, M.; MASUDA, T.; KONDO, T.; UOSAKI, K.; SASAKI, Y. 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, 7 jan. 2005.

ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P. J.; D’ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 144, jan. 2011.

ALEXIOU, A. D. P. **Síntese, caracterização e reatividade de clusters trigonais de acetato de rutênio**. 1993. Universidade de São Paulo, 1993.

ALEXIOU, A. D. P.; TOMA, H. E. NMR Spectroscopic Correlations for a Series of Triangular μ -Oxoruthenium Acetate Clusters containing Substituted Pyridine Ligands. **Journal of Chemical Research (S)**, n. 9, p. 338–339, 1997.

AMERICAN CANCER SOCIETY. The History of Cancer. **ACS-American Cancer Society**, p. 1–16, 2014.

ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. [s.l.] Butterworth-Heinemann, 2009.

BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma--an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 109–18, abr. 2012.

BALL, D. W. **Físico-química**. [s.l.] Cengage Learning Editores, 2004.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. [s.l.] Wiley, 2000. v. 6

BAUMANN, J. A.; SALMON, D. J.; WILSON, S. T.; MEYER, T. J. Anisotropic mixed-valence systems. Dimers of the delocalized clusters $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_6(\text{L})_3]^{n+}$. **Inorganic Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2472–2479, set. 1979.

BAUMANN, J. A.; SALMON, D. J.; WILSON, S. T.; MEYER, T. J.; HATFIELD, W. E. 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.

BENESI, H. A.; HILDEBRAND, J. H. a Spectrophotometric Investigation of the

Interaction of Iodine With Aromatic Hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 8, p. 2703–2707, 1949.

BENÍTEZ, J.; GUGGERI, L.; TOMAZ, I.; ARRAMBIDE, G.; NAVARRO, M.; COSTA PESSOA, J.; GARAT, B.; GAMBINO, D. Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 609–616, 2009a.

BENÍTEZ, J.; GUGGERI, L.; TOMAZ, I.; PESSOA, J. C.; MORENO, V.; LORENZO, J.; AVILÉS, F. X.; GARAT, B.; GAMBINO, D. 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, 2009b.

BERTINI, I.; LUCHINAT, C. Chapter 2 The hyperfine shift. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 150, n. 0, p. 29–75, 1996.

BERTINI, I.; PARIGI, G. Hyperfine Shifts. In: ROBERTS, G. C. K. (Ed.). **Encyclopedia of Biophysics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1030–1031.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–7, nov. 1996.

Buffer Reference Center | Sigma-Aldrich. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

BYLER, K. G.; BRITO-ARIAS, M.; MARQUEZ-NAVARRO, A.; NOGUEDA-TORRES, B.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; MARTÍNEZ-MAYORGA, K. Identification of benzoylisoquinolines as potential anti-Chagas agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2587–94, 15 abr. 2012.

CACITA, N.; NIKOLAOU, S. Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching. **Journal of Luminescence**, v. 169, p. 115–120, jan. 2016.

CACITA, N.; POSSATO, B.; DA SILVA, C. F. N. C. F. N.; PAULO, M.; FORMIGA, A. L. B. A. L. B.; BENDHACK, L. M. L. M.; NIKOLAOU, S. 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, abr. 2015.

CARNEIRO, Z. A.; BIAZZOTTO, J. C.; ALEXIOU, A. D. P.; NIKOLAOU, S. Nitric oxide photorelease from a trinuclear ruthenium nitrosyl complex and its in vitro cytotoxicity against melanoma cells. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 134, p. 36–8, maio 2014.

CARVER, A. Quinine therapy and hydrotherapy in the treatment of malaria. **The Lancet**, v. 190, n. 4912, p. 623–624, out. 1917.

CATORZE, M. G. Laser: fundamentos e indicações em dermatologia. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 37, n. 1, p. 5–27, 2009.

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

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 209–233, jan. 2003.

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

COTTON, F. a.; NORMAN, J. G.; SPENCER, a.; WILKINSON, G. Oxotriruthenium cluster complexes. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, n. 16, p. 967, 1971.

COURA, J. R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 389–390, jul. 2013.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_supp, p. S6–S7, 24 jun. 2010.

CUNHA, C. J. **Correlações espectroscópicas e eletroquímicas em clusters trigonais de rutênio com ligantes n-heterocíclicos**. 1989. Universidade de São Paulo, 1989.

DAVIES, N. a.; WILSON, M. T.; SLADE, E.; FRICKER, S. P.; MURRER, B. a.; POWELL, N. a.; HENDERSON, G. R. Kinetics of nitric oxide scavenging by ruthenium(III) polyaminocarboxylates: novel therapeutic agents for septic shock. **Chemical Communications**, n. 1, p. 47–48, 1997.

Deoxyribonucleic acid from fish sperm | Sigma-Aldrich. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/74782?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 5 mar. 2017.

DEWEY, T. G. **Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy.** New York: Plenum Press, 1991.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M.; ARAKI, K.; ALEXIOU, A. D. P.; FORMIGA, L. B.; TOMA, H. E.; NIKOLAOU, S. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry of Polymetallic Complexes: Intrinsic Ligand (L) Affinities with Direct Access to Steric Effects. **Organometallics**, v. 25, n. L, p. 3245–3250, 2006.

ESHKOURFU, R.; ČOBELJIĆ, B.; VUJČIĆ, M.; TUREL, I.; PEVEC, A.; SEPČIĆ, K.; ZEC, M.; RADULOVIĆ, S.; SRDIĆ-RADIĆ, T.; MITIĆ, D.; ANDJELKOVIĆ, K.; SLADIĆ, D. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt(III) complex with the condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 9, p. 1196–1203, 2011.

FANALI, G.; DI MASI, A.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 3, p. 209–290, jun. 2012.

FARRELL, N. P.; WILLIAMSON, J.; MCLAREN, D. J. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. **Biochemical pharmacology**, v. 33, n. 7, p. 961–71, 1984.

FIGGITT, D.; DENNY, W.; CHAVALITSHEWINKOON, P.; WILAIRAT, P.; RALPH, R. In vitro study of anticancer acridines as potential antitrypanosomal and antimalarial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1644–1647, 1992.

FOLEY, M. Quinoline antimalarials mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 1, p. 55–87, jul. 1998.

GAO, E.; WU, Q.; WANG, C.-S.; ZHU, M.; WANG, L.; LIU, H.; HUANG, Y.; SUN, Y.-G. Synthesis, interaction with double-helical DNA and biological activity of new Pt(II) and Pd(II) complexes with phenylglycine. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 3425–3437, 2009.

GOBLE, F. C. Chemotherapeutic activity of certain 8-aminoquinolines, particularly pentaquine, in experimental Chagas' disease. **The Journal of Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 375–378, 1 ago. 1949.

GOELTZ, J. C.; BENSON, E. E.; KUBIAK, C. P. Electronic structural effects in self-exchange reactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 45, p. 14729–34, 18 nov. 2010.

GOELTZ, J. C.; HANSON, C. J.; KUBIAK, C. P. Rates of electron self-exchange reactions between oxo-centered ruthenium clusters are determined by orbital overlap. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 4763–4767, 2009.

GORINSTEIN, S.; GOSHEV, I.; MONCHEVA, S.; ZEMSER, M.; WEISZ, M.; CASPI, a; LIBMAN, I.; LERNER, H. T.; TRAKHTENBERG, S.; MARTÍN-BELLOSO, O. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. **Journal of protein chemistry**, v. 19, n. 8, p. 637–42, nov. 2000.

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. 602–10, 20 jul. 2015.

HANSCH, C.; 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, 1 mar. 1991.

HENDERSON, J.; KUBIAK, C. P. Photoinduced mixed valency in zinc porphyrin dimer of triruthenium cluster dyads. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 11298–11306, 2014.

HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. **Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds: tools - techniques - tips**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005.

HERGUÉ, N.; LERICHE, P.; BLANCHARD, P.; ALLAIN, M.; GALLEGO-PLANAS, N.; FRÈRE, P.; RONCALI, J. Evidence for the contribution of sulfur-bromine

intramolecular interactions to the self-rigidification of thiophene-based π -conjugated systems. **New Journal of Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 932, 2008.

HOU, H.-N.; QI, Z.-D.; YANG, Y.-W. O.; LIAO, F.-L.; ZHANG, Y.; LIU, Y. Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, p. 134–139, 2008.

HRABIE, J. a; KEEFER, L. K. Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate (“nitrosohydroxylamine”) functional group and its oxygen-substituted derivatives. **Chemical reviews**, v. 102, n. 4, p. 1135–1154, abr. 2002.

HU, Y.-J.; LIU, Y.; WANG, J.-B.; XIAO, X.-H.; QU, S.-S. Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 915–919, 2004.

HU, Y.; XU, S.; ZHU, X.; GONG, A. 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. 526–31, out. 2009.

ICSEL, C.; YILMAZ, V. T. DNA Binding and Cleavage Studies of Two Palladium(II) Saccharinate Complexes with Terpyridine. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 4, p. 165–172, 2013.

IGNARRO, L. **Nitric oxide: biology and pathology**. [s.l.] Academic Press, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

JAMES, B. R.; MCMILLAN, R. S. A convenient synthesis of potassium hexachlororuthenate(III), and potassium tetrachloromono(bipyridine)ruthenate(III) and the analogous mono(phenanthroline) complex. **Inorganic and Nuclear Chemistry Letters**, v. 11, n. 12, p. 837–839, 1975.

JIANG, C. Q.; GAO, M. X.; HE, J. X. Study of the interaction between terazosin and serum albumin: synchronous fluorescence determination of terazosin. **Analitica Chimica Acta**, v. 452, p. 185–189, 2002.

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.

KAHN, O. Competing spin interactions and degenerate frustration for discrete molecular species. **Chemical Physics Letters**, v. 265, n. 1–2, p. 109–114, 1997.

KOSHIYAMA, T.; SHIRAI, M.; HIKAGE, T.; TABE, H.; TANAKA, K.; KITAGAWA, S.; UENO, T. 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.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. [s.l.: s.n.]

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. [s.l.] Macmillan Higher Education, 2008.

LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics**, v. 1, n. 6, p. 458–470, 2009.

LIU, R.; YU, X.; GAO, W.; JI, D.; YANG, F.; LI, X.; CHEN, J.; TAO, H.; HUANG, H.; YI, P. 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. 1535–9, maio 2011.

LIU, Y.; YU, Q.; WANG, C.; SUN, D.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; LIU, J. Ruthenium (II) complexes binding to human serum albumin and inducing apoptosis of tumor cells. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 24, p. 104–109, out. 2012.

MARTIN, F. S. A basic trinuclear ruthenium acetate. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 2682, 1952.

MAURICE, R. E.; CAMILLO, A. G. Fluorescence quenching studies with proteins. **Analytical biochemistry**1, v. 114, p. 199–212, 1981.

MAZURYK, O.; KURPIEWSKA, K.; LEWIŃSKI, K.; STOCHEL, G.; BRINDELL, M. Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complexes NAMI-A and its reduced form. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 116, p. 11–8, nov. 2012.

MIN, J.; MENG-XIA, X.; DONG, Z.; YUAN, L.; XIAO-YU, L.; XING, C. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 692, n. 1–3, p. 71–80, abr. 2004.

MOND, A. W. The acetates of ruthenium. **Journal of the Chemical Society**, n. 0, p. 1247-1249, 1930.

MOREIRA, E. Z.; DE 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. **Polyhedron**, v. 27, n. 12, p. 2721-2729, ago. 2008.

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B. De; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. de. Investigation of the Fluorescence Quenching of Bovine and Human Serum Albumin By Ruthenium Complex. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2014.

MOREIRA, M. B.; SILVA, C. F. N.; PESCI, R.; DEFLON, V.; NIKOLAOU, S. Revisiting oxo-centered carbonyl-triruthenium clusters: investigating CO photorelease and some spectroscopic and electrochemical correlations. **Dalton Trans.**, v. 17, p. 3342-3350, 2016.

MOSMANN, T. 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.

MSHANA, R. N.; TADESSE, G.; ABATE, G.; MIÖRNER, H. 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. 1214-9, maio 1998.

NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry**. [s.l.] Wiley, 1997.

NAVARRO, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 11-12, p. 1619-1626, 2009.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23-24, p. 1070-1078, 2010.

NIKOLAOU, S. **Desenvolvimento de estruturas polinucleares baseadas em clusters trinucleares e complexos poliimínicos de rutênio: unidades de montagem em química supramolecular**. 2002. Universidade de São Paulo, 2002.

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. **Transition Metal Chemistry**, v. 33, n. 8, p. 1059–1065, 30 set. 2008.

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, B. K. 4-Aminoquinolines – Past, present, and future; A chemical perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 29–58, jan. 1998.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–21, 7 jan. 2002.

OLIVEIRA, A. F. de; GRAGNANI, A.; OLIVEIRA FILHO, R. S.; SANTOS, I. D. de A. O.; FRANÇA, S. G. de; ENOKIHARA, M. M. S. e S.; FERREIRA, L. M. Modelo experimental de cultura primária de melanoma metastático por punção aspirativa de agulha fina. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 5, p. 390–393, out. 2005.

OTERO, L.; AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; MAYA, J. D.; MORELLO, A.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H. Nitrofurylsemicarbazone rhenium and ruthenium complexes as anti-trypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1231–1239, 2006.

OTERO, L.; SMIRCICH, P.; VIEITES, M.; CIGANDA, M.; SEVERINO, P. C.; TERENCEZI, H.; CERECETTO, H.; GAMBINO, D.; GARAT, B. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium(II) nitrofurylsemicarbazone complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 74–79, 2007.

PAGES, B. J.; SAKOFF, J.; GILBERT, J.; RODGER, A.; CHMEL, N. P.; JONES, N. C.; KELLY, S. M.; ANG, D. L.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Multifaceted Studies of the DNA Interactions and In Vitro Cytotoxicity of Anticancer Polyaromatic Platinum(II) Complexes. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 26, p. 8943–8954, 2016.

PAN, X.; LIU, R.; QIN, P.; WANG, L.; ZHAO, X. Spectroscopic Studies on the Interaction of Acid Yellow With Bovine Serum Albumin. **Journal of Luminescence**, v.

130, n. 4, p. 611–617, abr. 2010.

PAVIA, D. L. **Introduction to spectroscopy**. [s.l.] Cengage Learning, 2009.

PAVLISHCHUK, V. V.; GAVRILENKO, K. S.; KOLOTILOV, S. V. Spin Frustration and Competing Magnetic Exchange Interactions in Polynuclear Complexes of 3d Metals. **Theoretical and Experimental Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 21–27, 2002.

PEREIRA, A. V.; GARABELI, A. A.; SCHUNEMANN, G. D.; BORCK, P. C. Determinação da constante de dissociação (K_a) do captopril e da nimesulida - Experimentos de química analítica para o curso de farmácia. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1656–1660, 2011.

PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198–1211, 2009.

POSSATO, B. **Algumas considerações sobre a síntese de complexos de rutênio com ligantes tetraazamacrocíclicos insaturados. precursores para a formação de novos nitrosilo complexos para aplicações fotoquímicas**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.

POSSATO, B.; DEFLON, V. M.; NAAL, Z.; NIKOLAOU, S. What else is there to know about symmetrical trinuclear ruthenium complexes? Some spectroscopic and electrochemical correlations. **Inorganic Chemistry**, Submitted, 2017.

POUCHERT, C. **Aldrich library of ^{13}C and ^1H ft-nmr spectra**. [s.l.] Wiley, 1993.

POWELL, G.; RICHENS, D. T.; BINO, A. The nature of μ_3 -oxohexakis(μ -acetato)triaquatriruthenium cationic complexes isolated from aqueous perchloric acid. Crystal and molecular structure of $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{O}_3\text{CCH}_3)_6(\text{OH}_2)_3](\text{ClO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. **Inorganica Chimica Acta**, v. 232, n. 1, p. 167–170, 1995.

PRAVIN, N.; UTTHRA, P. P.; KUMARAVEL, G.; RAMAN, N. Effective DNA binding and cleaving tendencies of malonic acid coupled transition metal complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1123, p. 162–170, 2016.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584–590, jul. 1999.

RAY, A.; SETH, B. K.; PAL, U.; BASU, S. Nickel(II)-Schiff base complex recognizing domain II of bovine and human serum albumin: spectroscopic and docking studies.

Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, v. 92, p. 164–74, jun. 2012.

ROBIN, M. B.; DAY, P. Mixed Valence Chemistry-A Survey and Classification. **Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry**, v. 10, p. 247–422, 1968.

RONCAROLI, F.; OLABE, J. a; VAN ELDIK, R. Kinetics and mechanism of the interaction of nitric oxide with pentacyanoferrate(II). Formation and dissociation of $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$. **Inorganic chemistry**, v. 42, n. 13, p. 4179–89, 30 jun. 2003.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, maio 1981. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>>. Acesso em: 13 mar. 2013.

SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. a.; SILVA, M. C.; SANTOS, M.; SILVA, G. K.; MILANEZI, C.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3207, 2014.

SHELDRIK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, v. 64, n. 1, p. 112–122, jan. 2008.

SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 112–121, 2007.

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; PEREIRA, J. C. M.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4414–4421, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005.

SINGH, K.; SRIVASTAVA, P.; PATRA, A. K. Binding interactions with biological targets and DNA photocleavage activity of Pr(III) and Nd(III) complexes of dipyridoquinoxaline. **Inorganica Chimica Acta**, v. 451, p. 73–81, 2016.

SINGH, R. J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 31, p.

18596–18603, 2 ago. 1996.

SIRAJUDDIN, M.; ALLI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, n. January 2017, p. 1–19, 2013.

Sistemas Frustrados: Líquidos e Gelos de Spin. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/grupotcfmc/home/linhas-de-pesquisa/sistemas-frustrados-liquidos-e-gelos-de-spin>>. Acesso em: 8 mar. 2017.

SPENCER, A.; WILKINSON, G. μ -Oxo-triruthenium carboxylate complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 0, n. 14, p. 1570–1577, 1972

STEPHENSON, T. A.; WILKINSON, G. New ruthenium carboxylate complexes. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2285–2291, out. 1966.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **J Cancer Sci Ther.**, v. 1, n. 2, p. 1–4, 2010.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein engineering**, v. 12, n. 6, p. 439–46, jun. 1999.

TABASSUM, S.; AL-ASBAHY, W. M.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HSA): spectroscopic and molecular docking investigations. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 114, p. 132–9, set. 2012.

TANIMOTO, M. K.; DIAS, K.; DOVIDAUSKAS, S.; NIKOLAOU, S. 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.

TAUCHMAN, J.; PAUL, L. E. H.; FURRER, J.; THERRIEN, B.; SÜSS-FINK, G. 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.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1–2, p. 57–69, jan. 2003.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D. R.; TAVARES, A.; GOMES, A. J.; FIGUEIREDO, L. E.; FRANCO, D. W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 26, n. 1, p. 38–53, 1 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178685>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

TOMA, H. E.; ALEXIOU, A. D. P.; DOVIDAUSKAS, S. Extended electronic interactions in a triangular μ -oxotriruthenium acetate cluster containing nitric oxide. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 11, p. 3010–3017, nov. 2002a.

TOMA, H. E.; ALEXIOU, A. D. P.; FORMIGA, A. L. B.; NAKAMURA, M.; DOVIDAUSKAS, S.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M. 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, 15 jun. 2005.

TOMA, H. E.; ALEXIOU, A. D. P.; NIKOLAOU, S.; DOVIDAUSKAS, S. ^{13}C NMR spectra of triangular μ -oxoruthenium acetate clusters revisited: HETCOR study of two pyridine and 4,4'-bipyridine derivative. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 322–324, 1999.

TOMA, H. E.; ARAKI, K.; ALEXIOU, A. D. P.; NIKOLAOU, S.; DOVIDAUSKAS, S. Monomeric and extended oxo-centered triruthenium clusters. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 219–221, n. 0, p. 187–234, out. 2001.

TOMA, H. E.; CUNHA, C. J.; CIPRIANO, C. Redox potentials of trinuclear μ -oxo ruthenium acetate clusters with N-heterocyclic ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 154, p. 63–66, 1988.

TOMA, S. H.; NIKOLAOU, S.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; TOMA, H. E. Synthesis, spectroscopy, tandem mass spectrometry, and electrochemistry of the linearly bridged μ -{trans-1,4-bis[2-(4-pyridyl)ethenyl]-benzene}- $\{\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{py})_2\}_2$ cluster. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 8, p. 2253–2260, jun. 2004.

TOMA, S. H.; SANTOS, J. J.; NIKOLAOU, S.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Direct assembly of a metallodendrimer encompassing seven triruthenium clusters units. **Inorganica Chimica Acta**, v. 390, p. 148–153, 2012.

URQUIOLA, C.; VIEITES, M.; AGUIRRE, G.; MARÍN, A.; SOLANO, B.;

ARRAMBIDE, G.; NOBLÍA, P.; LAVAGGI, M. L.; TORRE, M. H.; GONZÁLEZ, M.; MONGE, A.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H. Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N1,N4-dioxide derivatives by complexation with vanadium. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 5503–5509, 2006.

WANG, K.; GAO, E. Recent Advances in Multinuclear Complexes as Potential Anticancer and DNA Binding Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 147–169, 2014.

WARE, W. R. Oxygen quenching of fluorescence in solution, an experimental study of the diffusion process. **Journal of Physical Chemistry**, v. 66, p. 455–458, 1962.

WILLIAMSON, J.; SCOTT-FINNIGAN, T. Trypanocidal Activity of Antitumor Antibiotics and Other Metabolic Inhibitors Trypanocidal Activity of Antitumor Antibiotics and Other Metabolic Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 13, n. 5, p. 735–744, 1978.

WOOD, A. W.; WISLOCKI, P. G.; CHANG, R. L.; LEVIN, W.; LU, A. Y. H.; YAGI, H.; HERNANDEZ, O.; JERINA, D. M.; CONNEY, A. H. Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene benzo-ring epoxides. **Cancer Research**, v. 36, n. September, p. 3358–3366, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

XIE, M.-X.; LONG, M.; LIU, Y.; QIN, C.; WANG, Y.-D. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1760, n. 8, p. 1184–91, ago. 2006.

XU, H.; LIU, Q.; ZUO, Y.; BI, Y.; GAO, S. Spectroscopic Studies on the Interaction of Vitamin C with Bovine Serum Albumin. **Journal of Solution Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 15–25, nov. 2009.

ZANELLO, P. **Inorganic electrochemistry: theory, practice and applications**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2003.

ZHILYAEV, A. N.; FOMINA, T. A.; KATSER, S. B.; BARANOVSKII, I. B. Synthesis, Structure, and Properties of ruthenium(III) Trinuclear Carboxylate Complexes. **Russian Journal of Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 856–859, 1994.

ZIELI, W.; KUDELKO, A. Acid-base interactions in some isoquinoline and quinazoline amino derivatives. **Arkivoc**, v. 2005, n. v, p. 66–82, 2005.

ANEXO I

1. DRX

Tabela 22. Comprimentos de ligação obtidos para o complexo 1

Ligação	Comprimento da ligação (Å)
C(1)-O(2)	1.240(7)
C(1)-O(1)	1.255(7)
C(1)-C(2)	1.498(10)
C(2)-H(2A)	0.9600
C(2)-H(2B)	0.9600
C(2)-H(2C)	0.9600
C(3)-O(4)	1.251(7)
C(3)-O(3)	1.253(7)
C(3)-C(4)	1.464(9)
C(4)-H(4A)	0.9600
C(4)-H(4B)	0.9600
C(4)-H(4C)	0.9600
C(5)-O(5)	1.256(7)
C(5)-O(6)	1.263(7)
C(5)-C(6)	1.498(10)
C(6)-H(6A)	0.9600
C(6)-H(6B)	0.9600
C(6)-H(6C)	0.9600
C(7)-O(7)	1.231(7)
C(7)-O(8)	1.267(7)
C(7)-C(8)	1.497(9)
C(8)-H(8A)	0.9600
C(8)-H(8B)	0.9600
C(8)-H(8C)	0.9600
C(9)-O(10)	1.249(7)
C(9)-O(9)	1.257(7)
C(9)-C(10)	1.490(9)
C(10)-H(10A)	0.9600
C(10)-H(10B)	0.9600
C(10)-H(10C)	0.9600
C(11)-N(11)	1.327(7)
C(11)-C(12)	1.409(8)
C(11)-H(11)	0.9300
C(11A)-O(12)	1.247(7)
C(11A)-O(11)	1.259(7)
C(11A)-C(12A)	1.498(9)
C(12)-C(17)	1.405(9)
C(12)-C(13)	1.417(9)
C(12A)-H(12A)	0.9600
C(12A)-H(12B)	0.9600
C(12A)-H(12C)	0.9600
C(13)-C(14)	1.374(10)
C(13)-H(13)	0.9300
C(14)-C(15)	1.418(12)
C(14)-H(14)	0.9300

C(15)-C(16)	1.336(11)
C(15)-H(15)	0.9300
C(16)-C(17)	1.406(9)
C(16)-H(16)	0.9300
C(17)-N(12)	1.373(9)
C(18)-N(12)	1.298(7)
C(18)-N(11)	1.376(8)
C(18)-H(18)	0.9300
C(21)-N(21)	1.333(8)
C(21)-C(22)	1.427(8)
C(22)-C(27)	1.387(10)
C(22)-C(23)	1.433(9)
C(23)-C(24)	1.314(11)
C(23)-H(23)	0.9300
C(24)-C(25)	1.428(14)
C(24)-H(24)	0.9300
C(25)-C(26)	1.350(13)
C(25)-H(25)	0.9300
C(26)-C(27)	1.435(9)
C(26)-H(26)	0.9300
C(27)-N(22)	1.353(9)
C(28)-N(22)	1.293(8)
C(28)-N(21)	1.354(8)
C(28)-H(28)	0.9300
C(31)-N(31)	1.305(7)
C(31)-C(32)	1.401(8)
C(31)-H(31)	0.9300
C(32)-C(37)	1.403(8)
C(32)-C(33)	1.414(8)
C(33)-C(34)	1.368(9)
C(33)-H(33)	0.9300
C(34)-C(35)	1.385(10)
C(34)-H(34)	0.9300
C(35)-C(36)	1.367(10)
C(35)-H(35)	0.9300
C(36)-C(37)	1.408(8)
C(36)-H(36)	0.9300
C(37)-N(32)	1.372(8)
C(38)-N(32)	1.287(8)
C(38)-N(31)	1.357(8)
C(38)-H(38)	0.9300
N(11)-Ru(1)	2.112(5)
N(21)-Ru(2)	2.109(4)
N(31)-Ru(3)	2.106(5)
O(1)-Ru(1)	2.034(5)
O(2)-Ru(3)	2.043(4)
O(3)-Ru(1)	2.031(4)
O(4)-Ru(3)	2.045(4)
O(5)-Ru(3)	2.039(4)
O(6)-Ru(2)	2.032(4)
O(7)-Ru(3)	2.033(4)
O(8)-Ru(2)	2.024(4)

O(9)-Ru(2)	2.029(4)
O(10)-Ru(1)	2.015(4)
O(11)-Ru(2)	2.020(4)
O(12)-Ru(1)	2.046(5)
O(13)-Ru(3)	1.912(3)
O(13)-Ru(1)	1.923(3)
O(13)-Ru(2)	1.941(3)
F(1)-P(1)	1.511(8)
F(2)-P(1)	1.539(8)
F(3)-P(1)	1.530(8)
F(4)-P(1)	1.585(9)
F(5)-P(1)	1.550(10)
F(6)-P(1)	1.458(9)
C(1S)-Cl(2S)	1.652(13)
C(1S)-Cl(1S)	1.722(12)
C(1S)-H(1S1)	0.9700
C(1S)-H(1S2)	0.9700
Cl(3S)-C(2SB)	1.84(2)
Cl(3S)-C(2SA)	1.91(2)
Cl(4A)-C(2SA)	1.79(2)
C(2SA)-H(2S1)	0.9700
C(2SA)-H(2S2)	0.9700
Cl(4B)-C(2SB)	1.87(2)
C(2SB)-H(2S3)	0.9700
C(2SB)-H(2S4)	0.9700

Tabela 23. Ângulos de ligação obtidos para o complexo 1

Ligação	Ângulo de ligação	Ligação	Ângulo de ligação
O(2)-C(1)-O(1)	127.4(6)	C(35)-C(36)-C(37)	119.4(6)
O(2)-C(1)-C(2)	116.2(6)	C(35)-C(36)-H(36)	120.3
O(1)-C(1)-C(2)	116.4(6)	C(37)-C(36)-H(36)	120.3
C(1)-C(2)-H(2A)	109.5	N(32)-C(37)-C(32)	120.7(5)
C(1)-C(2)-H(2B)	109.5	N(32)-C(37)-C(36)	120.0(6)
H(2A)-C(2)-H(2B)	109.5	C(32)-C(37)-C(36)	119.3(5)
C(1)-C(2)-H(2C)	109.5	N(32)-C(38)-N(31)	128.5(6)
H(2A)-C(2)-H(2C)	109.5	N(32)-C(38)-H(38)	115.7
H(2B)-C(2)-H(2C)	109.5	N(31)-C(38)-H(38)	115.7
O(4)-C(3)-O(3)	126.4(5)	C(11)-N(11)-C(18)	117.5(5)
O(4)-C(3)-C(4)	117.2(6)	C(11)-N(11)-Ru(1)	121.4(4)
O(3)-C(3)-C(4)	116.4(6)	C(18)-N(11)-Ru(1)	121.1(4)
C(3)-C(4)-H(4A)	109.5	C(18)-N(12)-C(17)	117.3(5)
C(3)-C(4)-H(4B)	109.5	C(21)-N(21)-C(28)	118.2(5)
H(4A)-C(4)-H(4B)	109.5	C(21)-N(21)-Ru(2)	119.3(4)
C(3)-C(4)-H(4C)	109.5	C(28)-N(21)-Ru(2)	122.4(4)
H(4A)-C(4)-H(4C)	109.5	C(28)-N(22)-C(27)	117.5(6)
H(4B)-C(4)-H(4C)	109.5	C(31)-N(31)-C(38)	115.8(5)
O(5)-C(5)-O(6)	125.8(6)	C(31)-N(31)-Ru(3)	124.2(4)
O(5)-C(5)-C(6)	116.0(6)	C(38)-N(31)-Ru(3)	120.0(4)
O(6)-C(5)-C(6)	118.1(6)	C(38)-N(32)-C(37)	115.8(5)
C(5)-C(6)-H(6A)	109.5	C(1)-O(1)-Ru(1)	130.9(4)
C(5)-C(6)-H(6B)	109.5	C(1)-O(2)-Ru(3)	131.9(4)

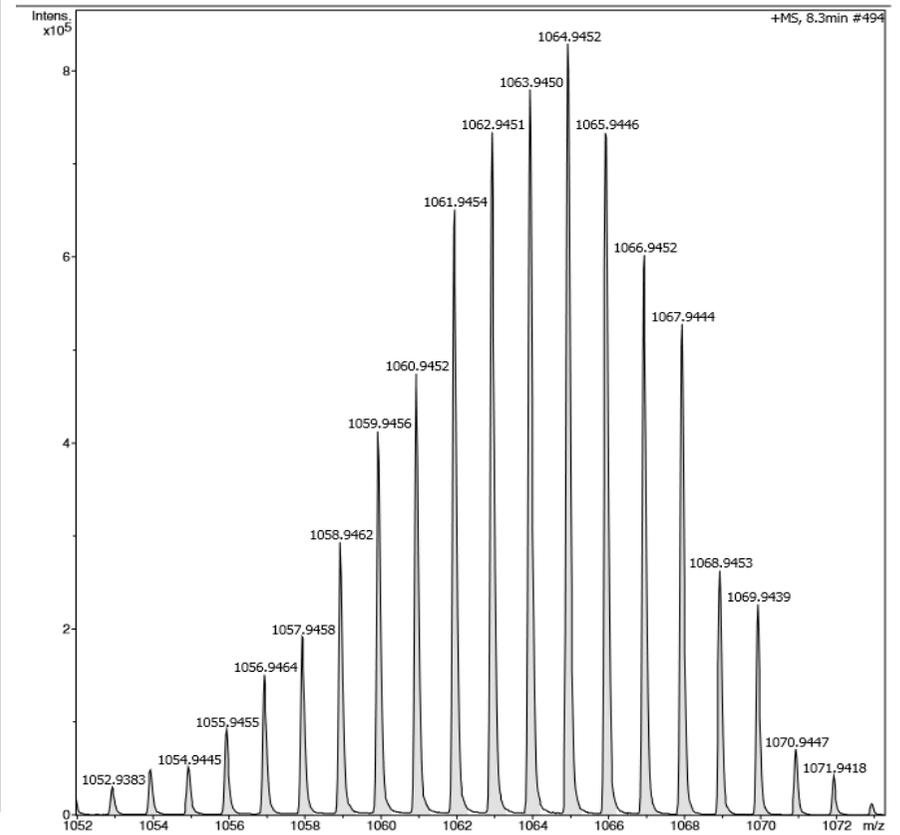
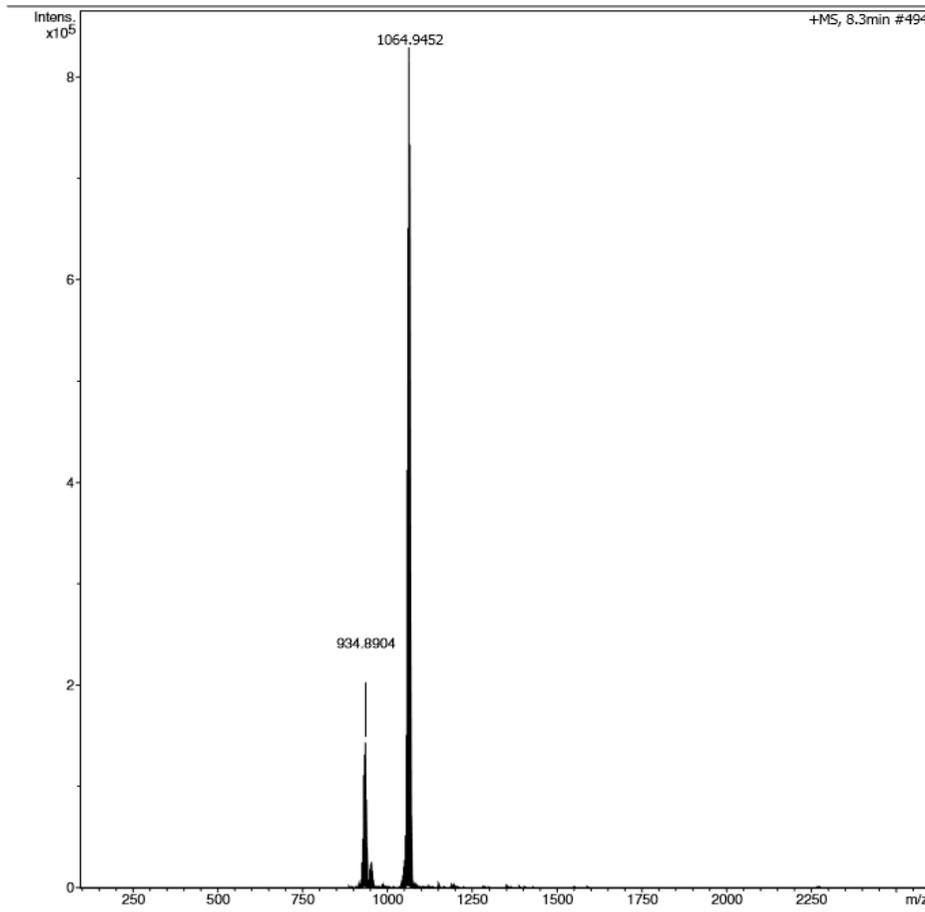
H(6A)-C(6)-H(6B)	109.5	C(3)-O(3)-Ru(1)	133.4(4)
C(5)-C(6)-H(6C)	109.5	C(3)-O(4)-Ru(3)	130.8(4)
H(6A)-C(6)-H(6C)	109.5	C(5)-O(5)-Ru(3)	133.7(4)
H(6B)-C(6)-H(6C)	109.5	C(5)-O(6)-Ru(2)	130.9(4)
O(7)-C(7)-O(8)	126.2(6)	C(7)-O(7)-Ru(3)	132.5(4)
O(7)-C(7)-C(8)	118.2(5)	C(7)-O(8)-Ru(2)	132.5(4)
O(8)-C(7)-C(8)	115.6(6)	C(9)-O(9)-Ru(2)	133.3(4)
C(7)-C(8)-H(8A)	109.5	C(9)-O(10)-Ru(1)	133.5(4)
C(7)-C(8)-H(8B)	109.5	C(11A)-O(11)-Ru(2)	131.5(4)
H(8A)-C(8)-H(8B)	109.5	C(11A)-O(12)-Ru(1)	131.4(4)
C(7)-C(8)-H(8C)	109.5	Ru(3)-O(13)-Ru(1)	120.23(17)
H(8A)-C(8)-H(8C)	109.5	Ru(3)-O(13)-Ru(2)	119.95(17)
H(8B)-C(8)-H(8C)	109.5	Ru(1)-O(13)-Ru(2)	119.82(18)
O(10)-C(9)-O(9)	125.2(5)	F(6)-P(1)-F(1)	92.7(8)
O(10)-C(9)-C(10)	117.0(5)	F(6)-P(1)-F(3)	89.6(7)
O(9)-C(9)-C(10)	117.7(5)	F(1)-P(1)-F(3)	91.9(6)
C(9)-C(10)-H(10A)	109.5	F(6)-P(1)-F(2)	92.6(7)
C(9)-C(10)-H(10B)	109.5	F(1)-P(1)-F(2)	174.1(7)
H(10A)-C(10)-H(10B)	109.5	F(3)-P(1)-F(2)	90.9(5)
C(9)-C(10)-H(10C)	109.5	F(6)-P(1)-F(5)	175.4(7)
H(10A)-C(10)-H(10C)	109.5	F(1)-P(1)-F(5)	89.6(7)
H(10B)-C(10)-H(10C)	109.5	F(3)-P(1)-F(5)	94.4(6)
N(11)-C(11)-C(12)	121.1(5)	F(2)-P(1)-F(5)	85.0(6)
N(11)-C(11)-H(11)	119.5	F(6)-P(1)-F(4)	90.5(6)
C(12)-C(11)-H(11)	119.5	F(1)-P(1)-F(4)	90.4(6)
O(12)-C(11A)-O(11)	127.7(6)	F(3)-P(1)-F(4)	177.7(5)
O(12)-C(11A)-C(12A)	117.3(6)	F(2)-P(1)-F(4)	86.8(5)
O(11)-C(11A)-C(12A)	115.0(6)	F(5)-P(1)-F(4)	85.5(6)
C(17)-C(12)-C(11)	117.2(6)	O(13)-Ru(1)-O(10)	96.41(15)
C(17)-C(12)-C(13)	120.6(6)	O(13)-Ru(1)-O(3)	95.72(16)
C(11)-C(12)-C(13)	122.2(6)	O(10)-Ru(1)-O(3)	167.88(16)
C(11A)-C(12A)-H(12A)	109.5	O(13)-Ru(1)-O(1)	94.00(17)
C(11A)-C(12A)-H(12B)	109.5	O(10)-Ru(1)-O(1)	87.4(2)
H(12A)-C(12A)-H(12B)	109.5	O(3)-Ru(1)-O(1)	91.6(2)
C(11A)-C(12A)-H(12C)	109.5	O(13)-Ru(1)-O(12)	92.86(16)
H(12A)-C(12A)-H(12C)	109.5	O(10)-Ru(1)-O(12)	92.8(2)
H(12B)-C(12A)-H(12C)	109.5	O(3)-Ru(1)-O(12)	86.71(19)
C(14)-C(13)-C(12)	118.5(7)	O(1)-Ru(1)-O(12)	173.06(18)
C(14)-C(13)-H(13)	120.7	O(13)-Ru(1)-N(11)	178.22(19)
C(12)-C(13)-H(13)	120.7	O(10)-Ru(1)-N(11)	82.24(17)
C(13)-C(14)-C(15)	119.8(7)	O(3)-Ru(1)-N(11)	85.63(17)
C(13)-C(14)-H(14)	120.1	O(1)-Ru(1)-N(11)	84.79(19)
C(15)-C(14)-H(14)	120.1	O(12)-Ru(1)-N(11)	88.37(18)
C(16)-C(15)-C(14)	122.1(6)	O(13)-Ru(2)-O(11)	92.65(16)
C(16)-C(15)-H(15)	119.0	O(13)-Ru(2)-O(8)	96.37(15)
C(14)-C(15)-H(15)	119.0	O(11)-Ru(2)-O(8)	86.44(19)
C(15)-C(16)-C(17)	119.8(7)	O(13)-Ru(2)-O(9)	96.33(16)
C(15)-C(16)-H(16)	120.1	O(11)-Ru(2)-O(9)	92.9(2)
C(17)-C(16)-H(16)	120.1	O(8)-Ru(2)-O(9)	167.29(16)
N(12)-C(17)-C(12)	120.9(5)	O(13)-Ru(2)-O(6)	93.76(16)
N(12)-C(17)-C(16)	119.9(6)	O(11)-Ru(2)-O(6)	173.55(17)
C(12)-C(17)-C(16)	119.3(6)	O(8)-Ru(2)-O(6)	92.1(2)

N(12)-C(18)-N(11)	126.0(6)	O(9)-Ru(2)-O(6)	87.2(2)
N(12)-C(18)-H(18)	117.0	O(13)-Ru(2)-N(21)	178.37(18)
N(11)-C(18)-H(18)	117.0	O(11)-Ru(2)-N(21)	85.87(18)
N(21)-C(21)-C(22)	119.5(6)	O(8)-Ru(2)-N(21)	84.22(17)
C(27)-C(22)-C(21)	117.1(6)	O(9)-Ru(2)-N(21)	83.07(17)
C(27)-C(22)-C(23)	120.7(6)	O(6)-Ru(2)-N(21)	87.74(18)
C(21)-C(22)-C(23)	122.1(6)	O(13)-Ru(3)-O(7)	95.52(16)
C(24)-C(23)-C(22)	120.4(8)	O(13)-Ru(3)-O(5)	92.87(16)
C(24)-C(23)-H(23)	119.8	O(7)-Ru(3)-O(5)	93.7(2)
C(22)-C(23)-H(23)	119.8	O(13)-Ru(3)-O(2)	95.12(16)
C(23)-C(24)-C(25)	119.6(8)	O(7)-Ru(3)-O(2)	169.36(16)
C(23)-C(24)-H(24)	120.2	O(5)-Ru(3)-O(2)	86.2(2)
C(25)-C(24)-H(24)	120.2	O(13)-Ru(3)-O(4)	95.27(16)
C(26)-C(25)-C(24)	122.0(7)	O(7)-Ru(3)-O(4)	87.4(2)
C(26)-C(25)-H(25)	119.0	O(5)-Ru(3)-O(4)	171.64(17)
C(24)-C(25)-H(25)	119.0	O(2)-Ru(3)-O(4)	91.2(2)
C(25)-C(26)-C(27)	119.1(8)	O(13)-Ru(3)-N(31)	177.85(19)
C(25)-C(26)-H(26)	120.4	O(7)-Ru(3)-N(31)	82.33(18)
C(27)-C(26)-H(26)	120.4	O(5)-Ru(3)-N(31)	87.37(18)
N(22)-C(27)-C(22)	121.5(6)	O(2)-Ru(3)-N(31)	87.03(17)
N(22)-C(27)-C(26)	120.4(7)	O(4)-Ru(3)-N(31)	84.57(18)
C(22)-C(27)-C(26)	118.1(7)	Cl(2S)-C(1S)-Cl(1S)	115.8(7)
N(22)-C(28)-N(21)	126.1(6)	Cl(2S)-C(1S)-H(1S1)	108.3
N(22)-C(28)-H(28)	117.0	Cl(1S)-C(1S)-H(1S1)	108.3
N(21)-C(28)-H(28)	117.0	Cl(2S)-C(1S)-H(1S2)	108.3
N(31)-C(31)-C(32)	122.6(5)	Cl(1S)-C(1S)-H(1S2)	108.3
N(31)-C(31)-H(31)	118.7	H(1S1)-C(1S)-H(1S2)	107.4
C(32)-C(31)-H(31)	118.7	C(2SB)-Cl(3S)-C(2SA)	47.5(15)
C(31)-C(32)-C(37)	116.6(5)	Cl(4A)-C(2SA)-Cl(3S)	99.8(18)
C(31)-C(32)-C(33)	123.5(5)	Cl(4A)-C(2SA)-H(2S1)	111.8
C(37)-C(32)-C(33)	119.9(5)	Cl(3S)-C(2SA)-H(2S1)	111.8
C(34)-C(33)-C(32)	119.2(6)	Cl(4A)-C(2SA)-H(2S2)	111.8
C(34)-C(33)-H(33)	120.4	Cl(3S)-C(2SA)-H(2S2)	111.8
C(32)-C(33)-H(33)	120.4	H(2S1)-C(2SA)-H(2S2)	109.5
C(33)-C(34)-C(35)	120.6(6)	Cl(3S)-C(2SB)-Cl(4B)	104.4(19)
C(33)-C(34)-H(34)	119.7	Cl(3S)-C(2SB)-H(2S3)	110.9
C(35)-C(34)-H(34)	119.7	Cl(4B)-C(2SB)-H(2S3)	110.9
C(36)-C(35)-C(34)	121.5(6)	Cl(3S)-C(2SB)-H(2S4)	110.9
C(36)-C(35)-H(35)	119.2	Cl(4B)-C(2SB)-H(2S4)	110.9
C(34)-C(35)-H(35)	119.2	H(2S3)-C(2SB)-H(2S4)	108.9

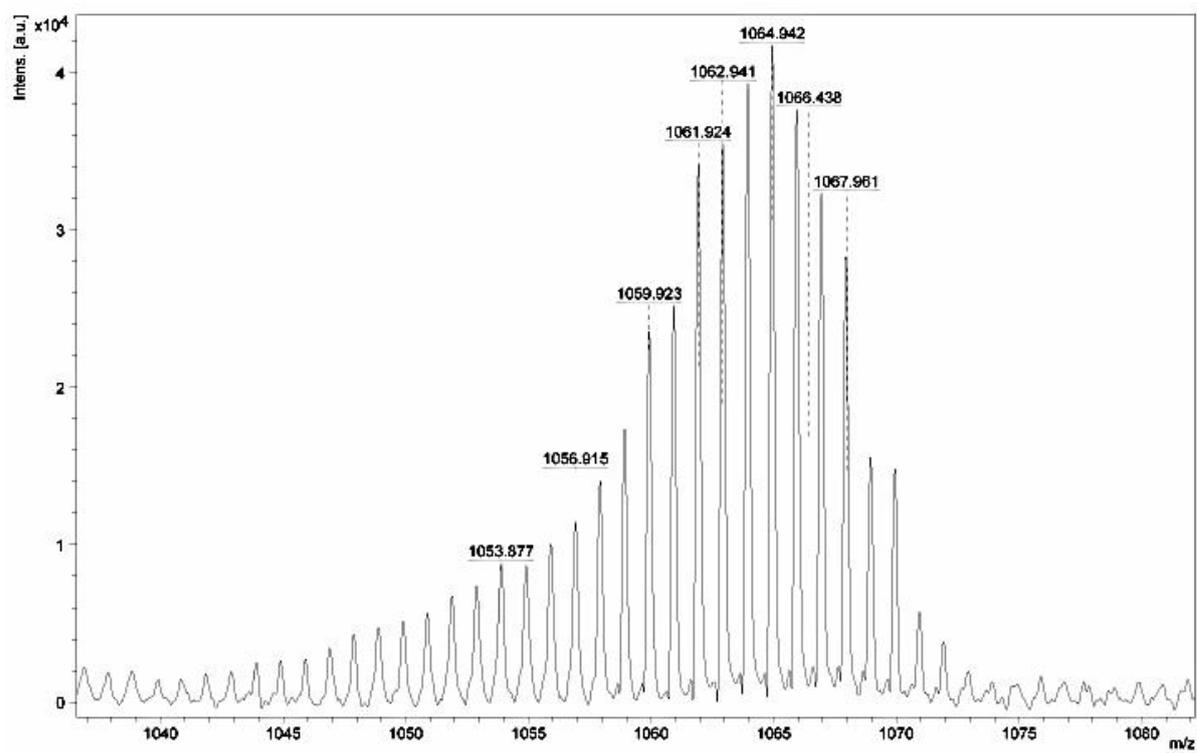
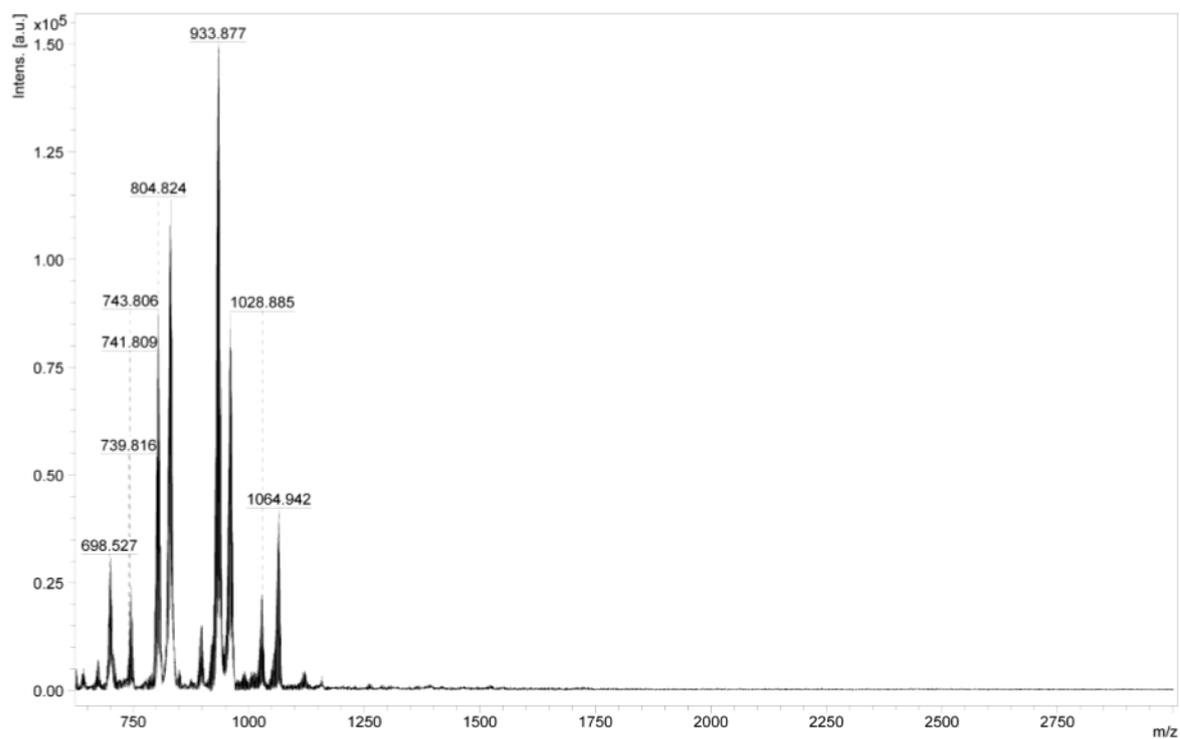
2. Espectrometria de massas

Complexo 1 - Quinazolina

ESI

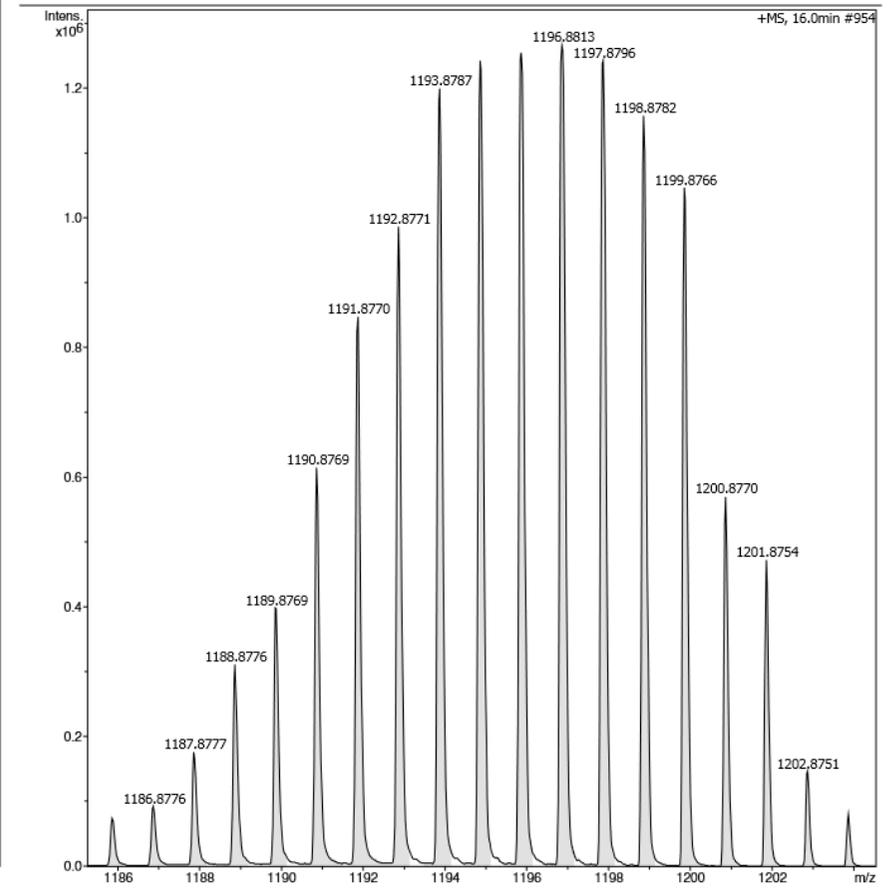
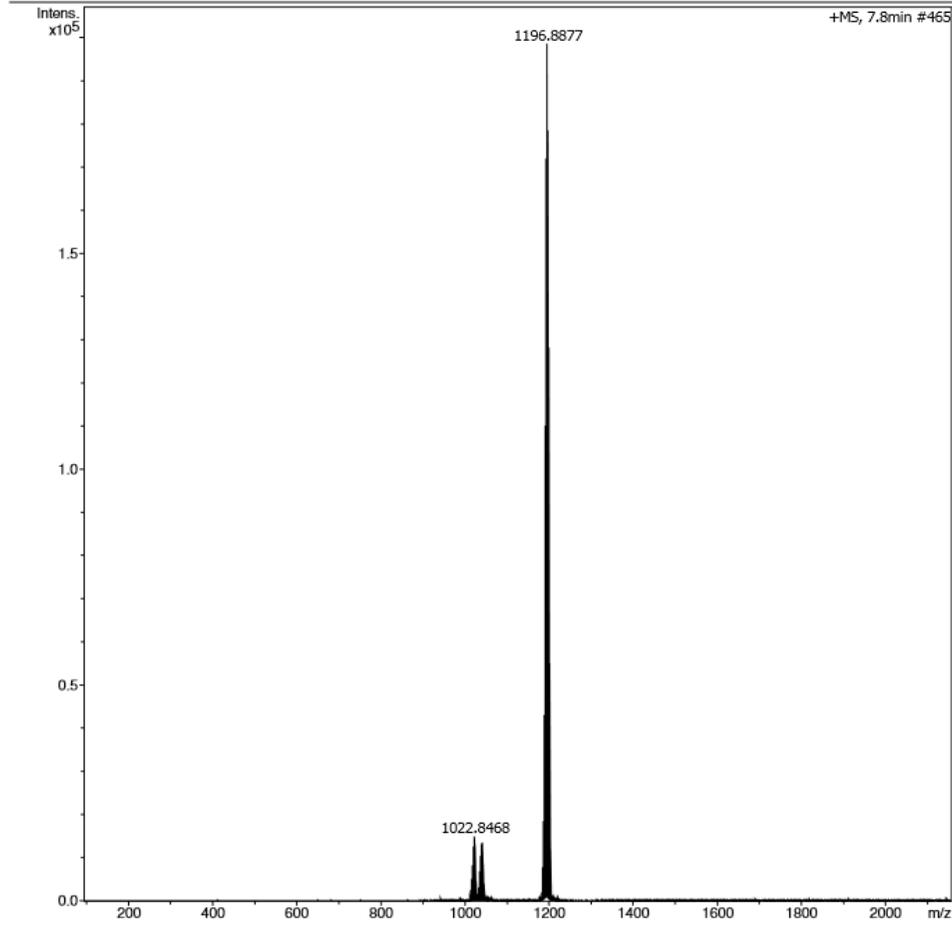


MALDI

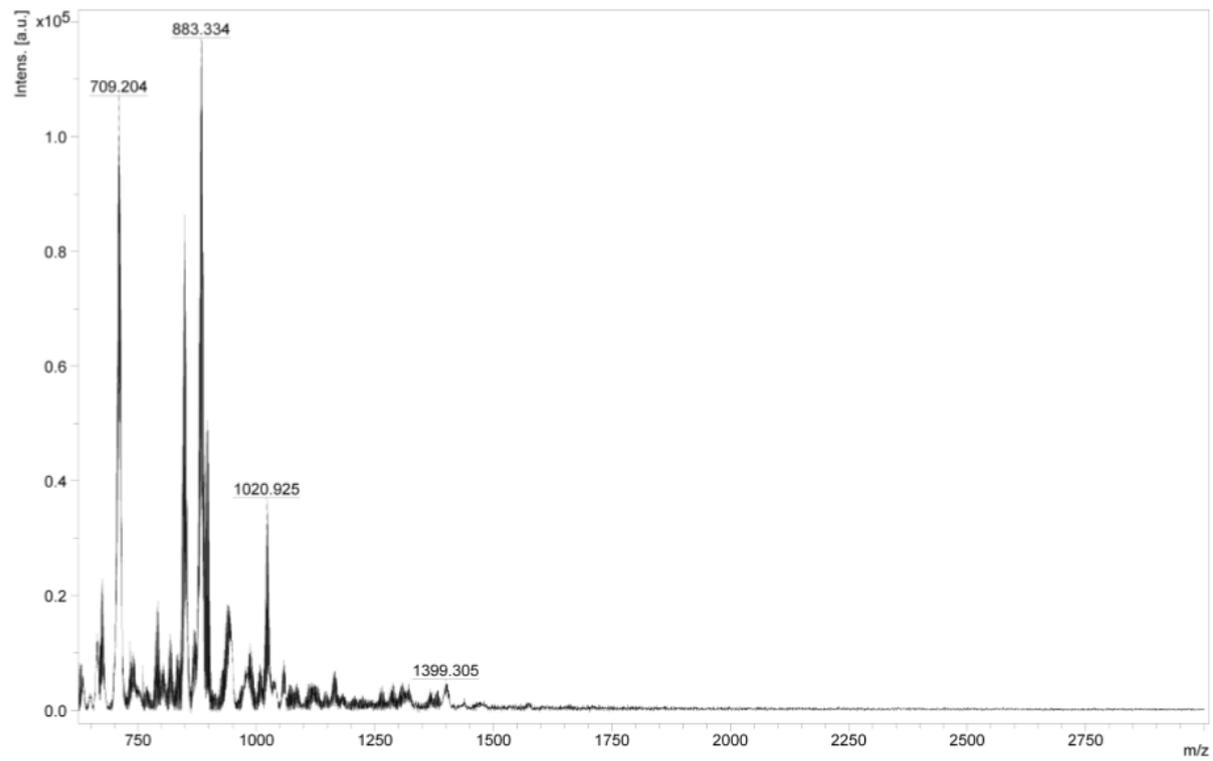


Complexo 2 - 5-nitroisoquinolina

ESI

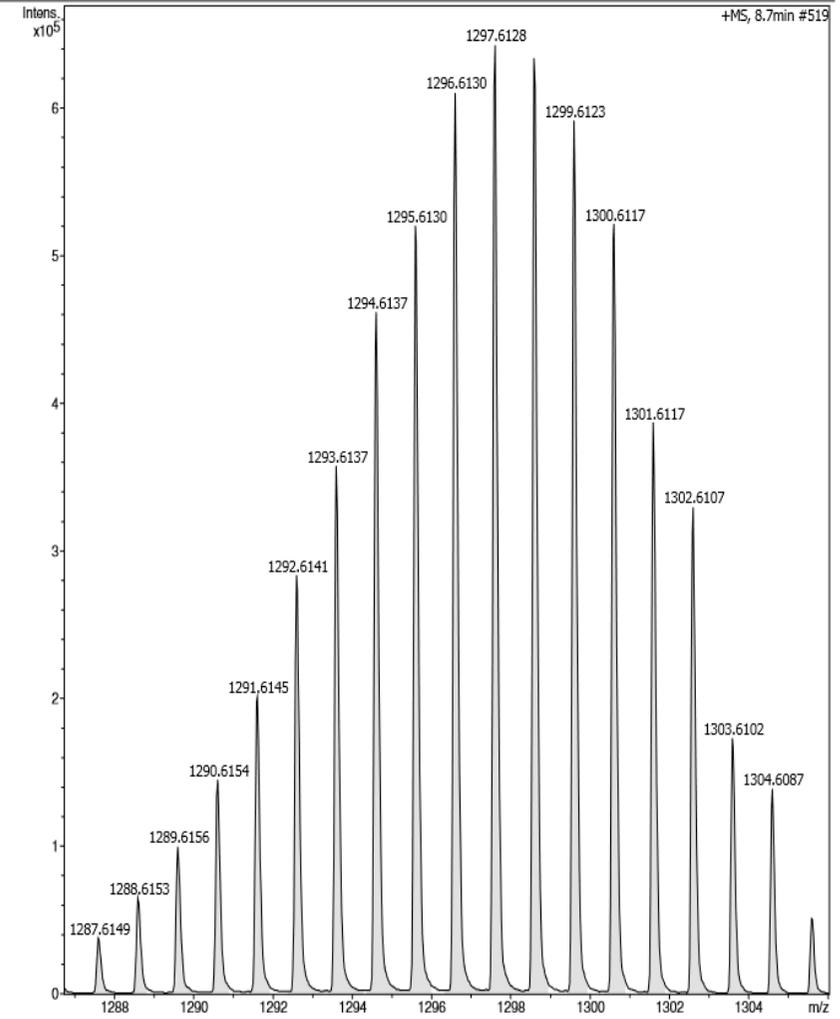
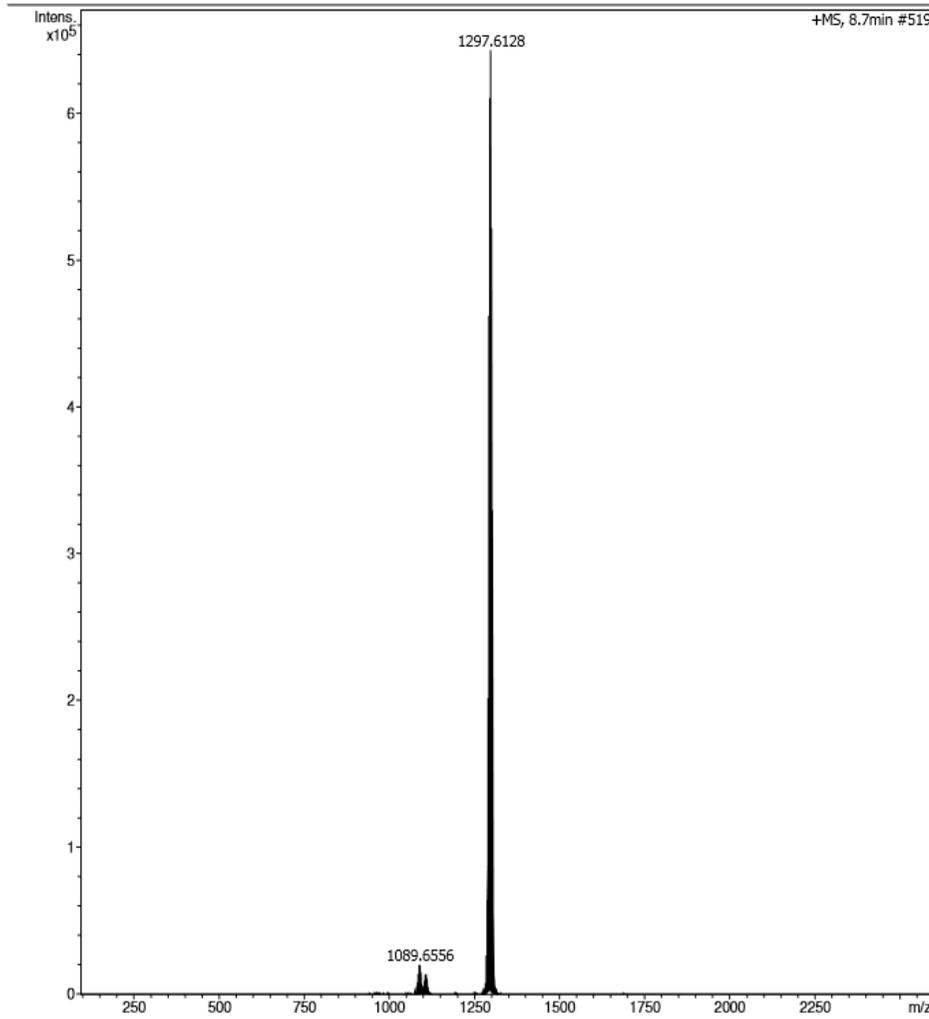


MALDI

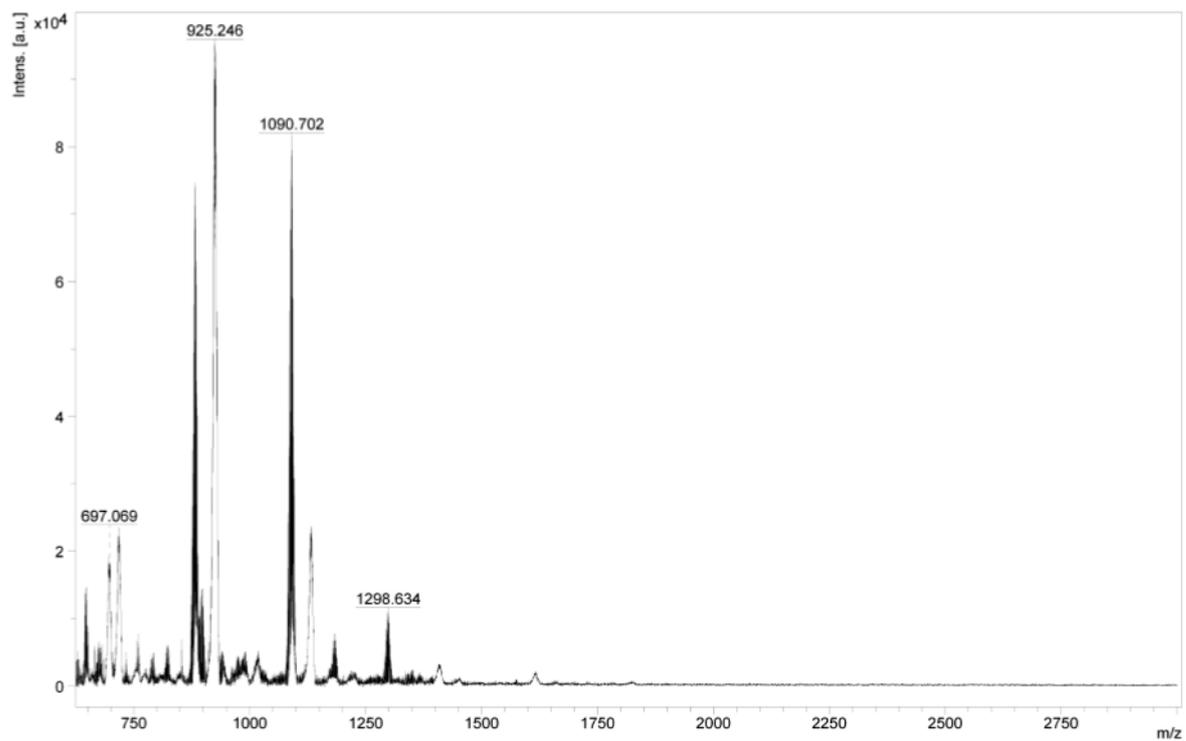


Complexo 3 - 5-bromoisoquinolina

ESI

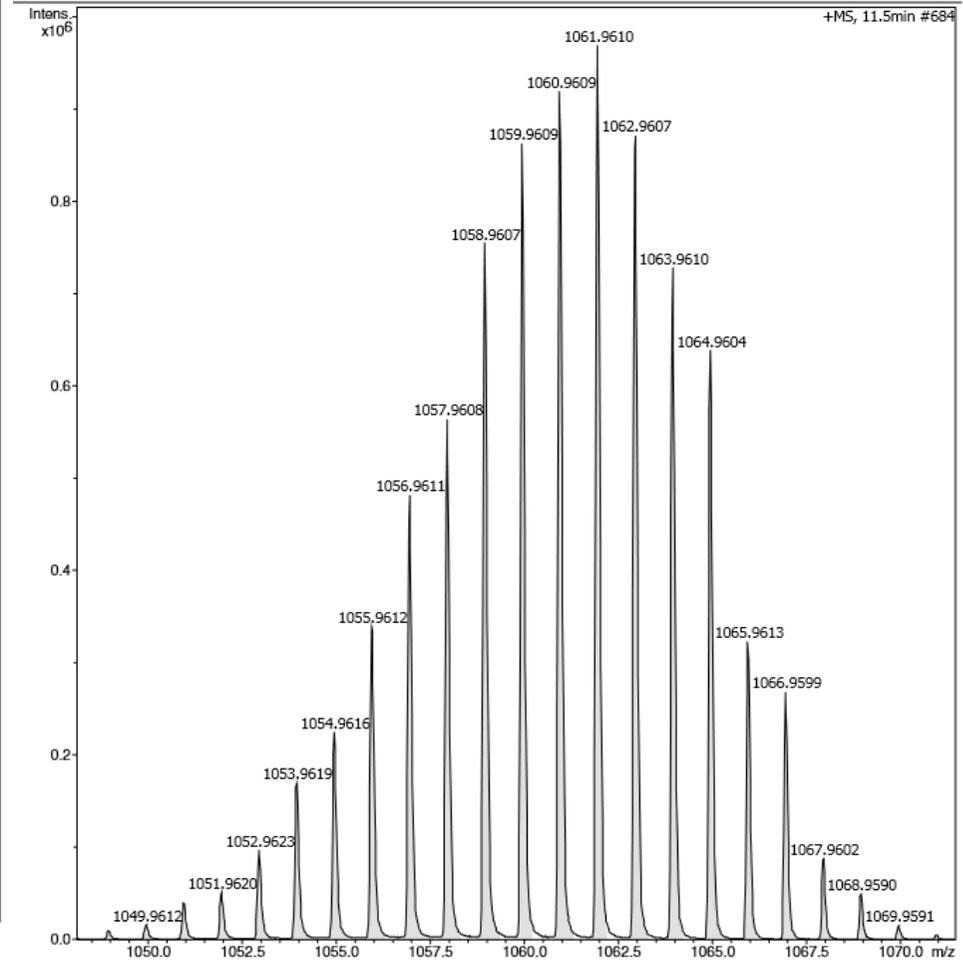
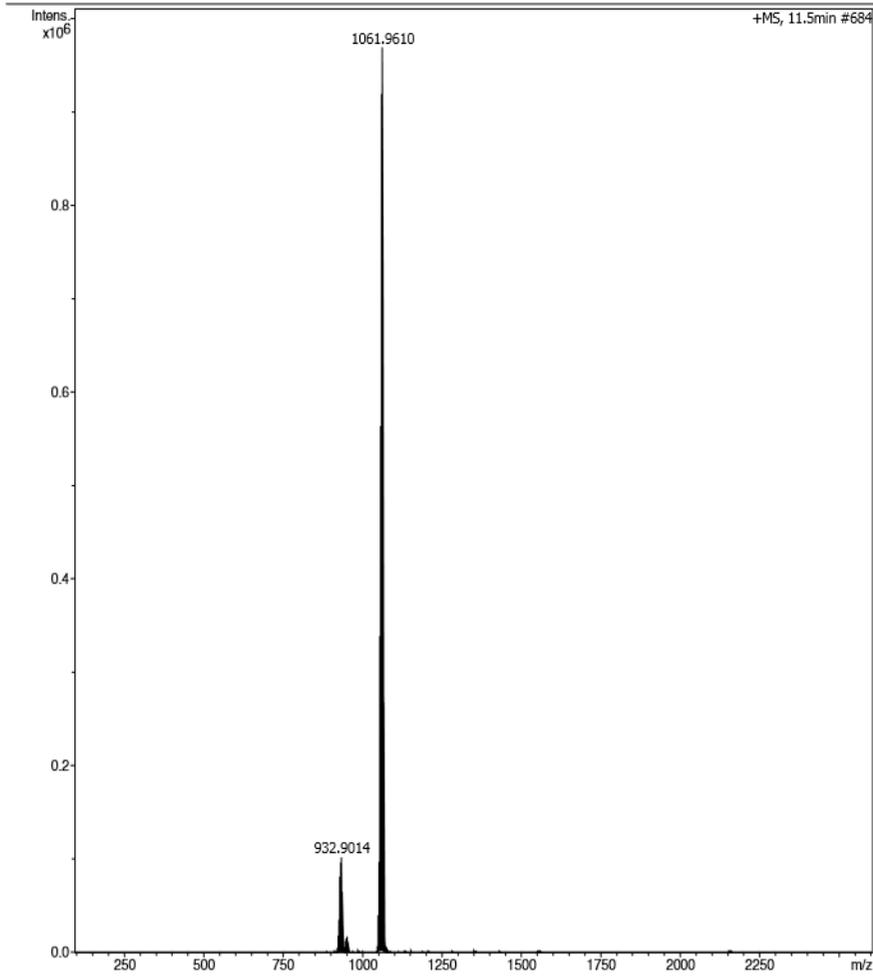


MALDI

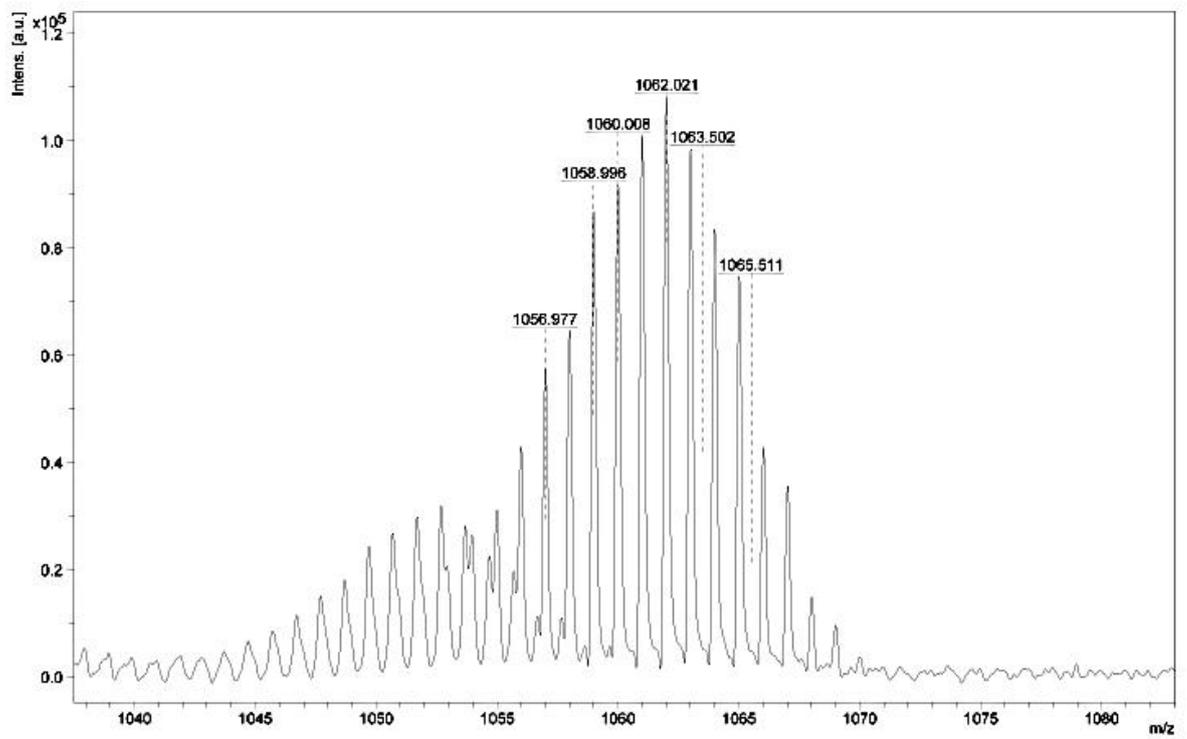


Complexo 4 - Isoquinolina

ESI

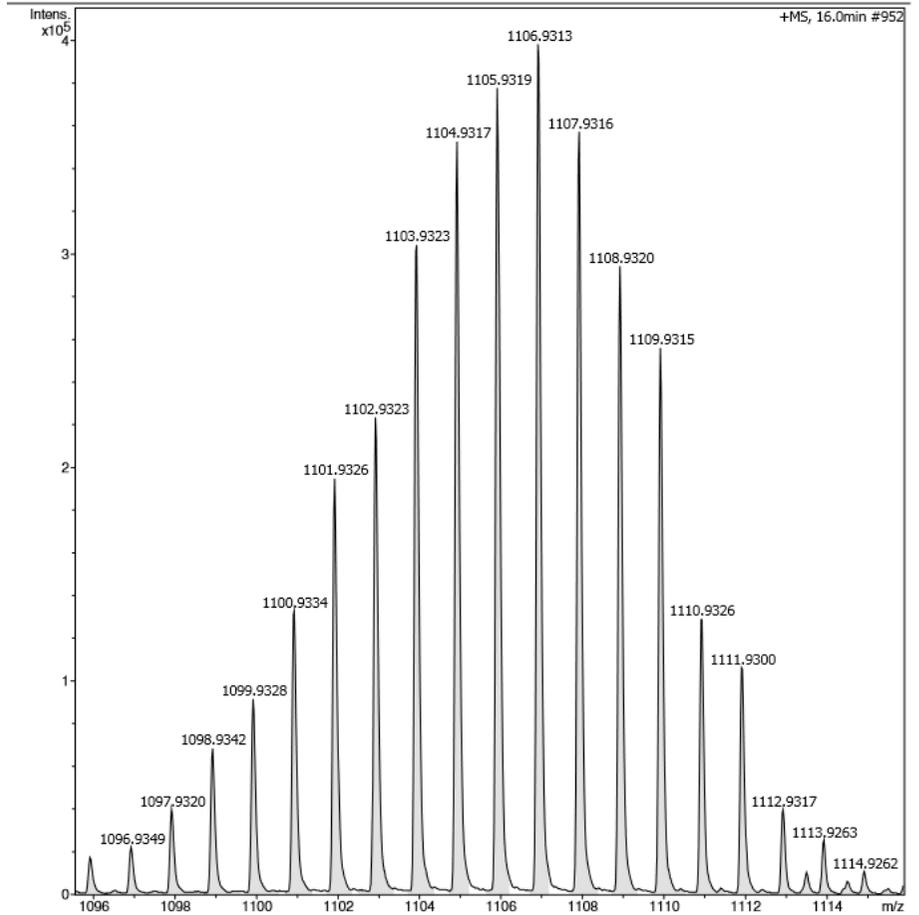
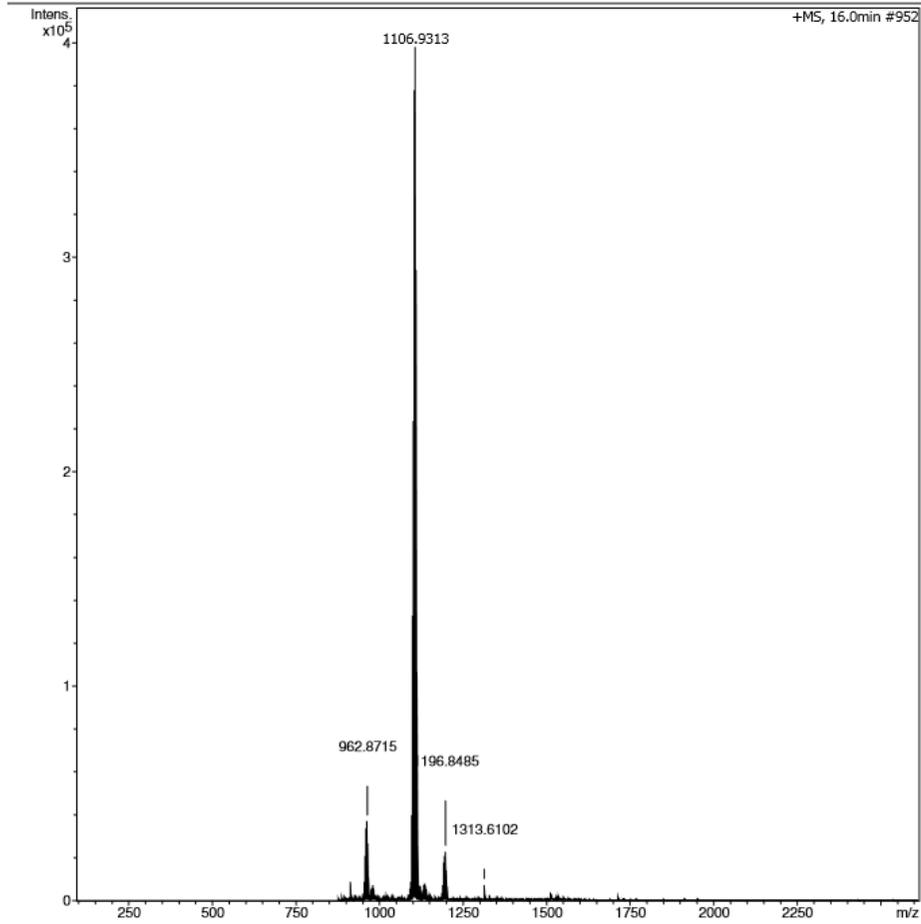


MALDI

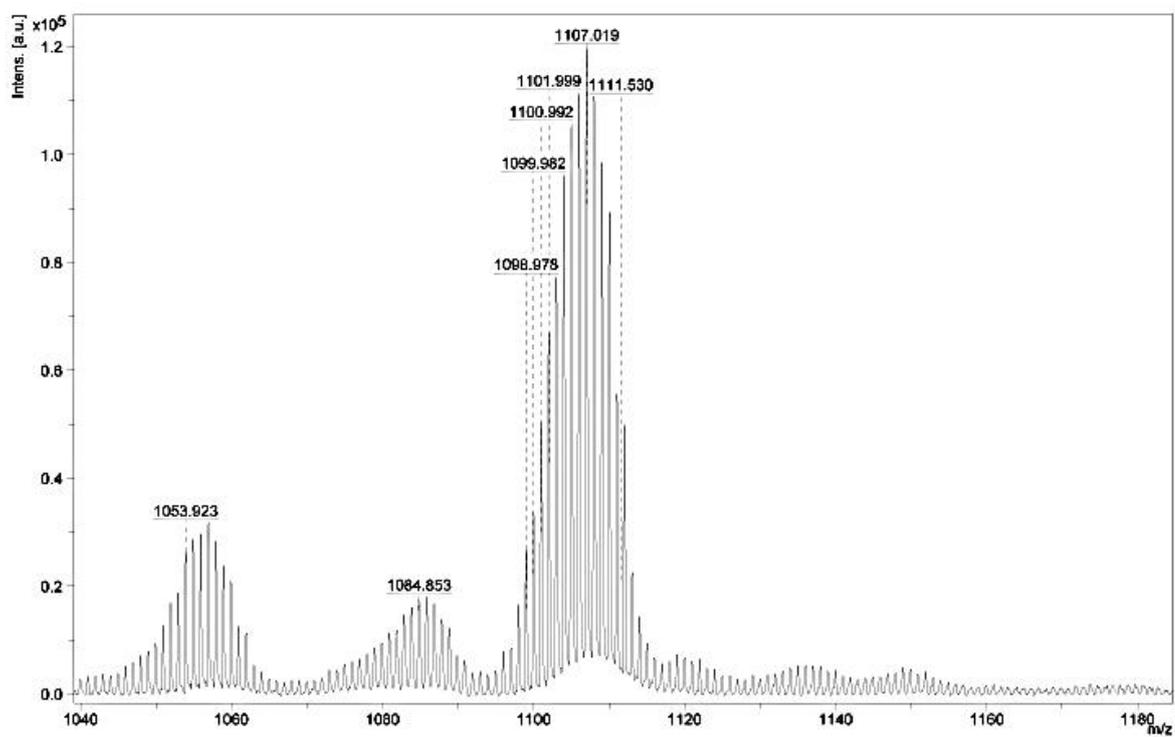
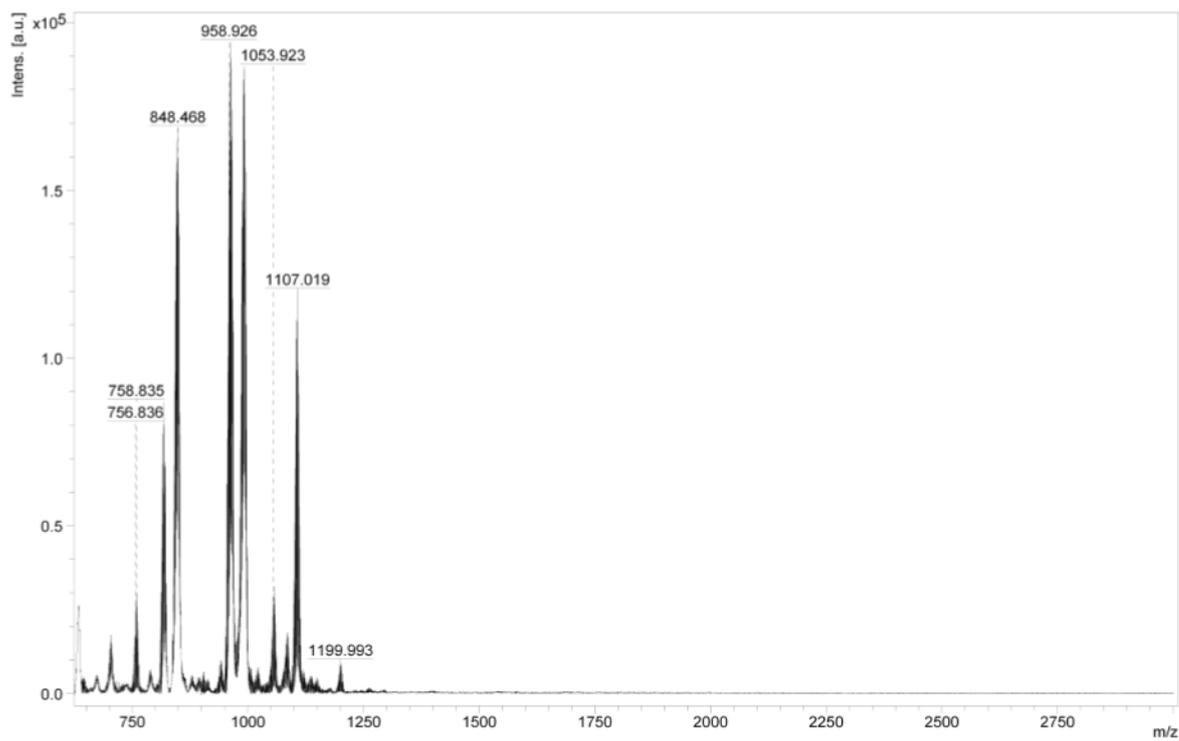


Complexo 5 - 5-aminoisoquinolina

ESI

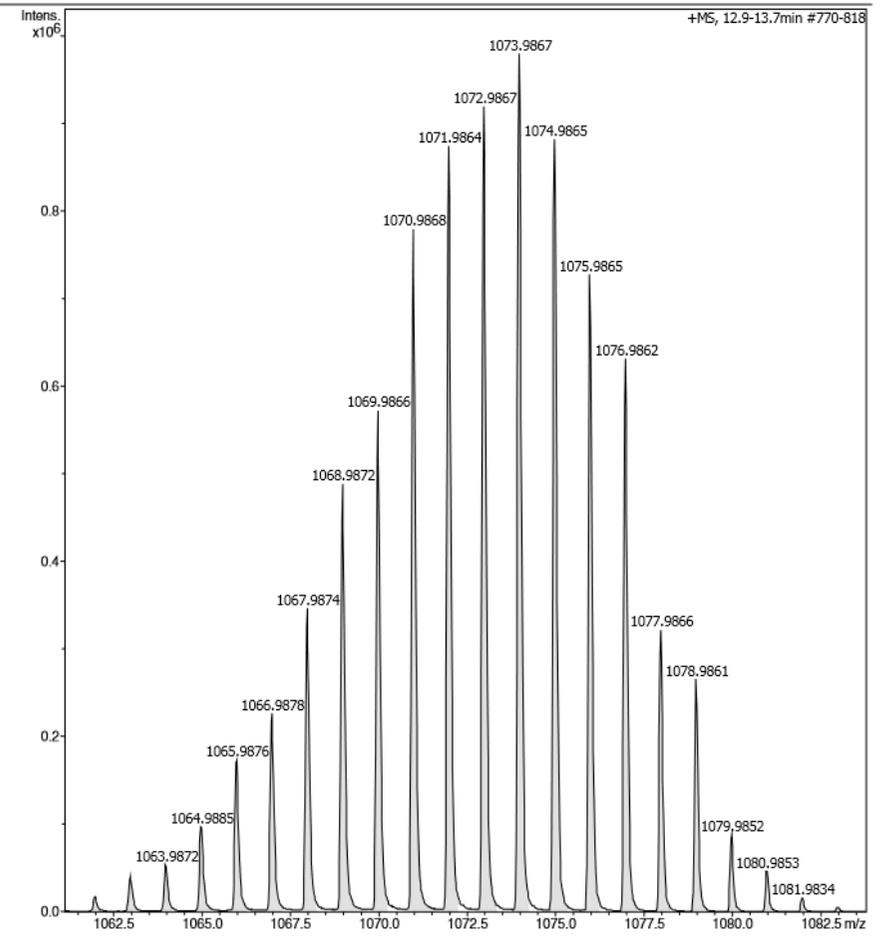
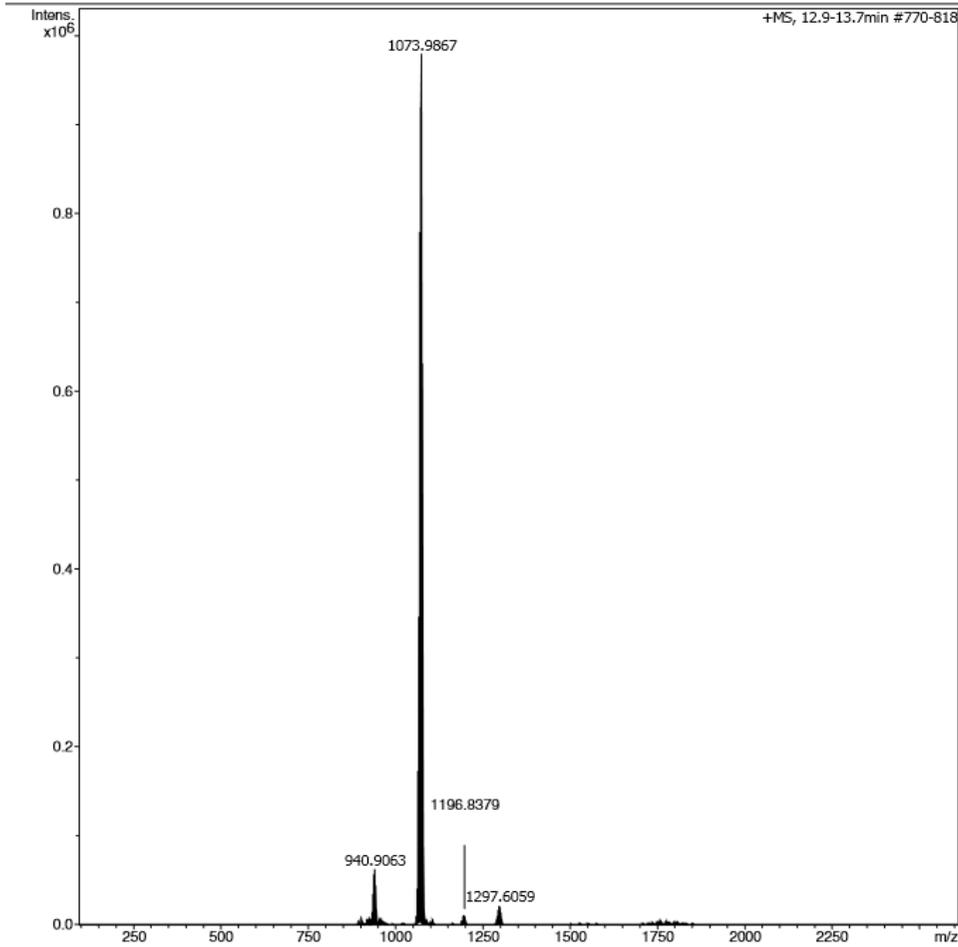


MALDI

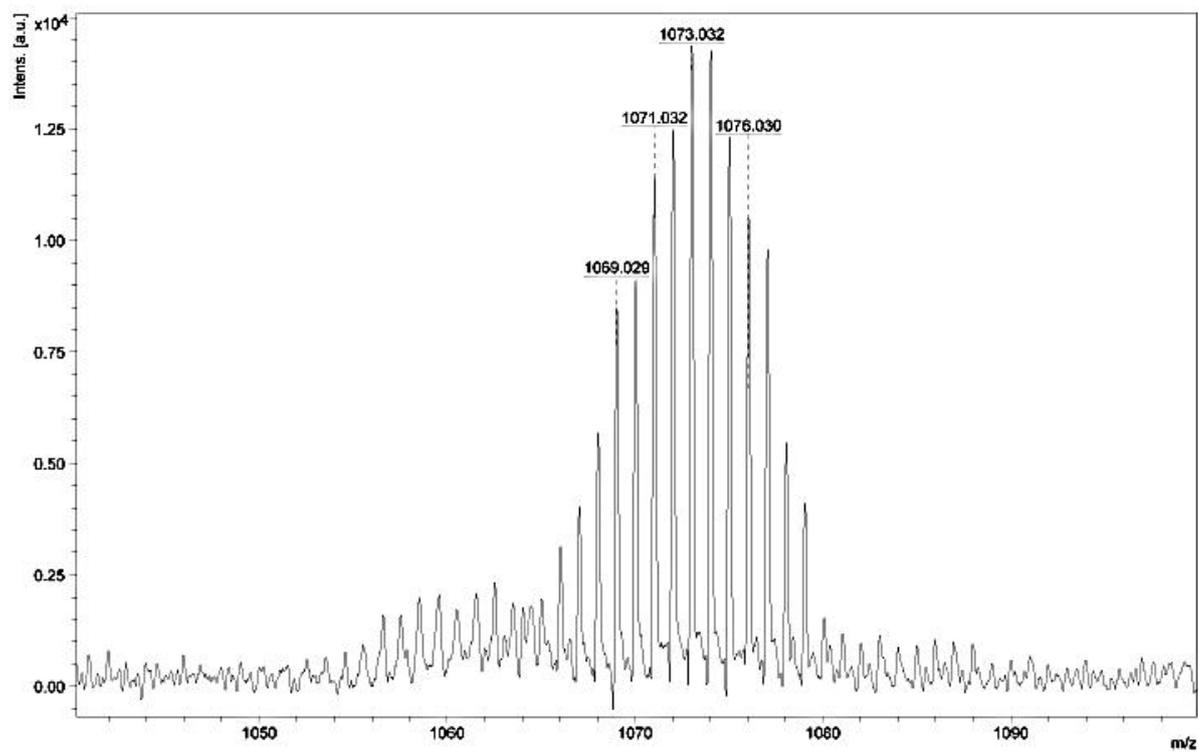
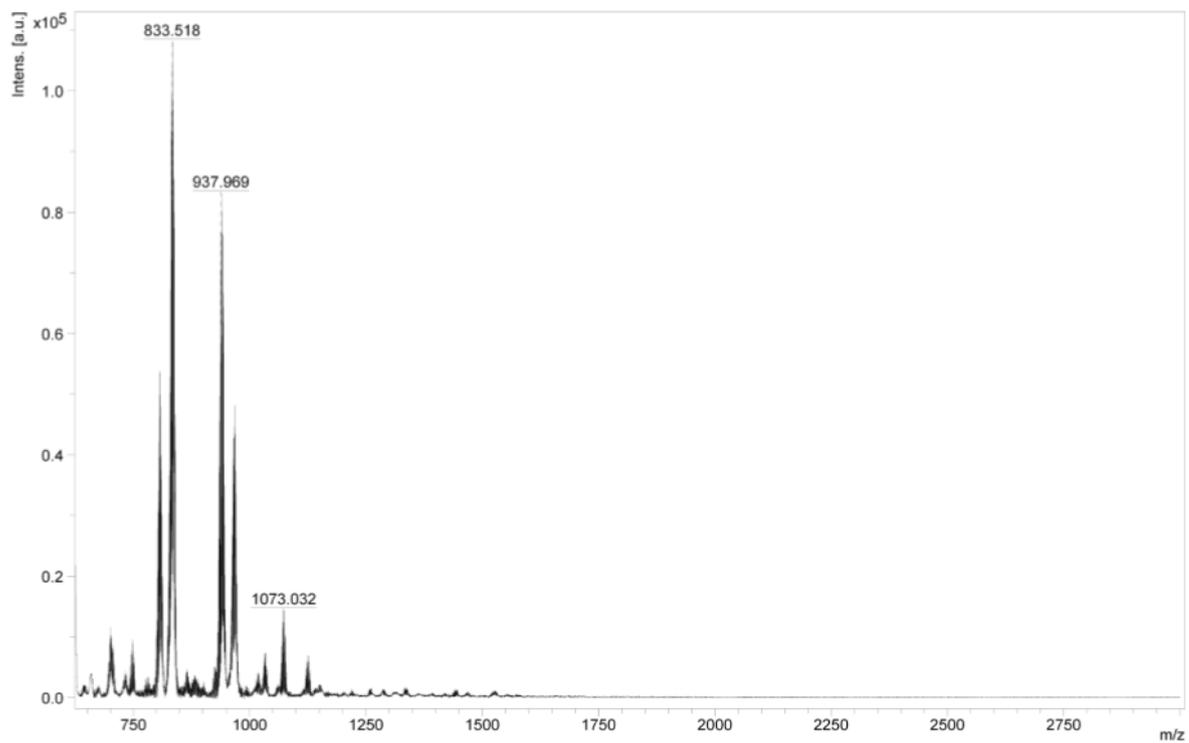


Complexo 6 - 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina

ESI

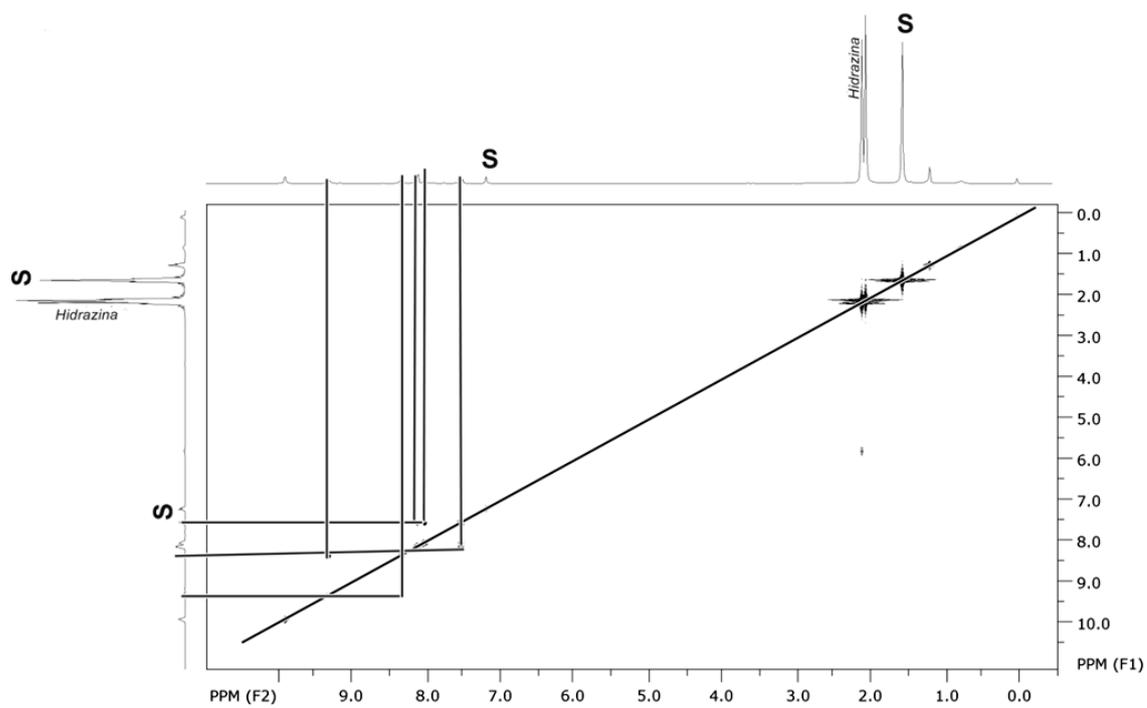


MALDI



3. Ressonância Magnética Nuclear

Figura 124. Espectro COSY para o complexo 3 na forma reduzida

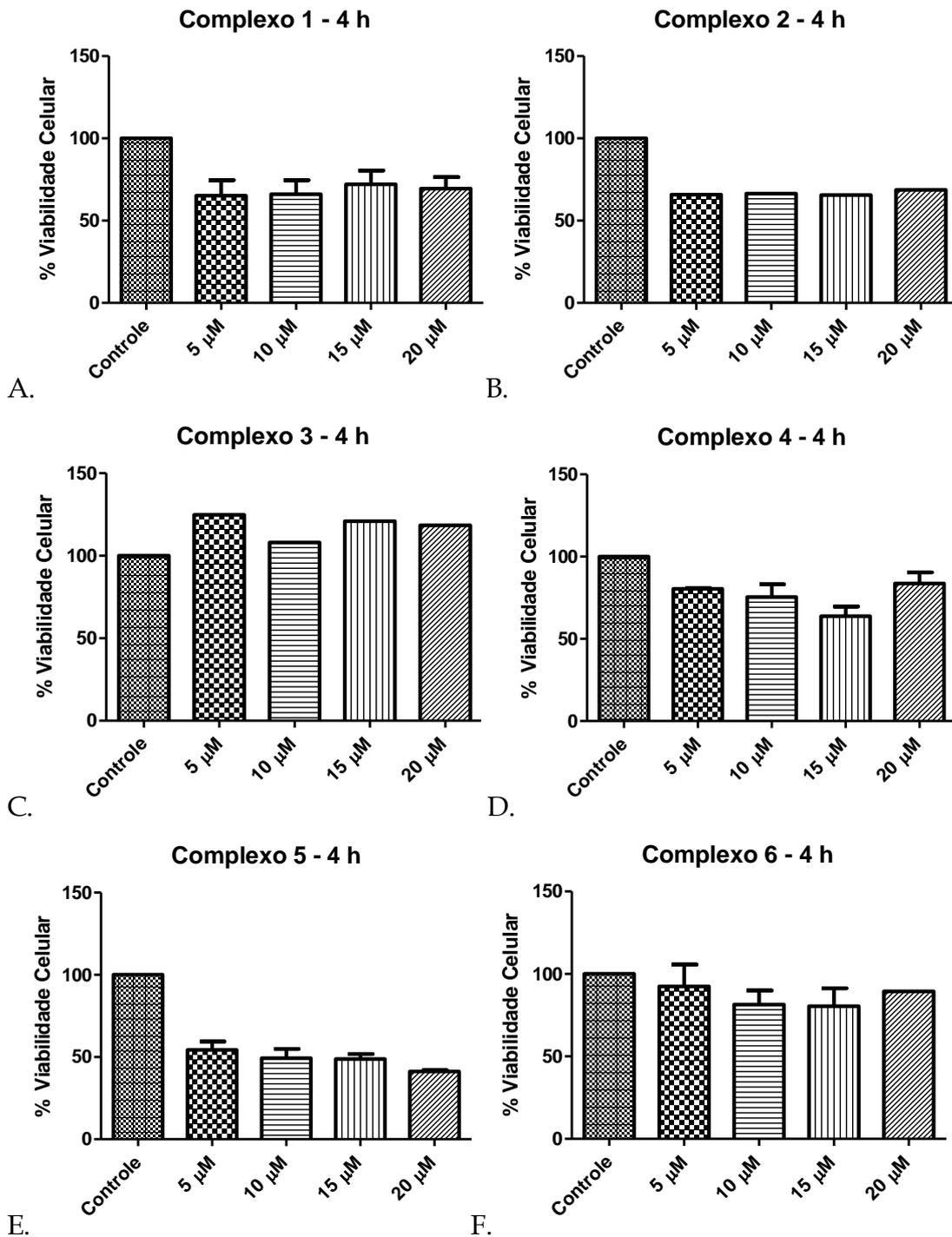


Fonte: Autora

ANEXO II

1. Atividade anticâncer

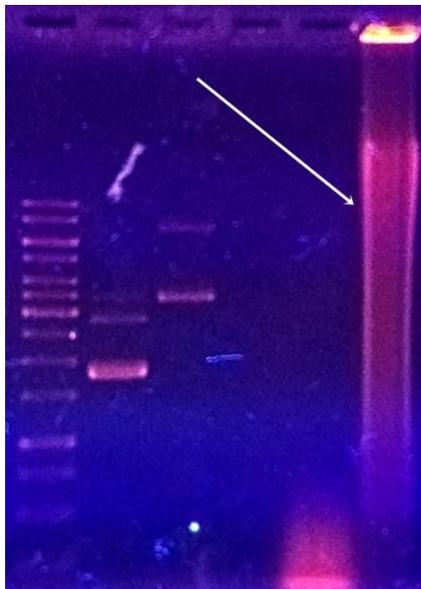
Figura 125. Atividade anticâncer contra linhagem B16F10 para os complexos 1-6 obtida na incubação por 4 h



Fonte: Autora

ANEXO III

Figura 126. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. A banda marcada refere-se ao *ct*-DNA degradado após armazenamento feito posterior à utilização



Fonte: Autora

2. DNA - Modelo de Benesi-Hildebrand

Figura 127. Titulações espectrofotométricas do complexo 1 com *fs*-DNA em 25 e 30 °C

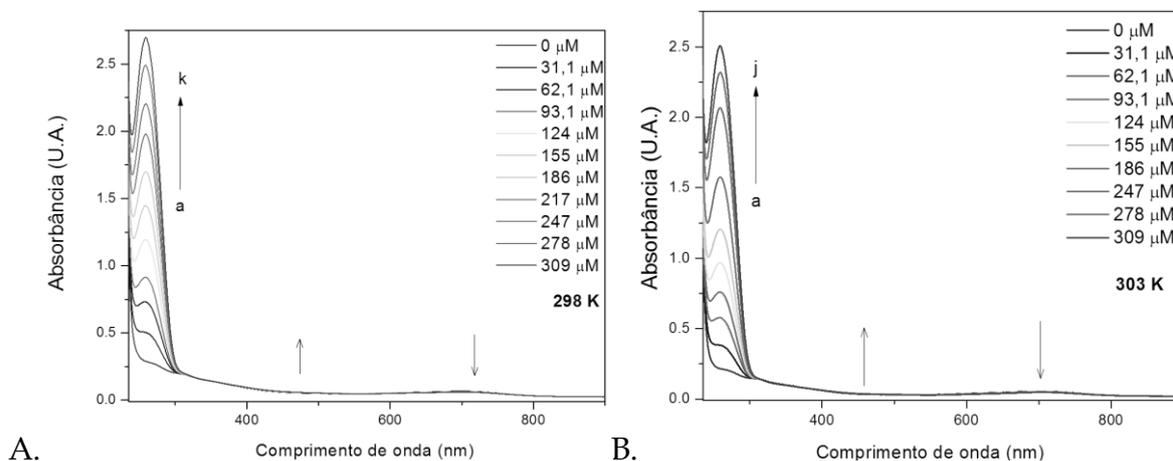


Figura 128. Titulações espectrofotométricas do complexo 2 com *fs*-DNA em 25 e 30 °C

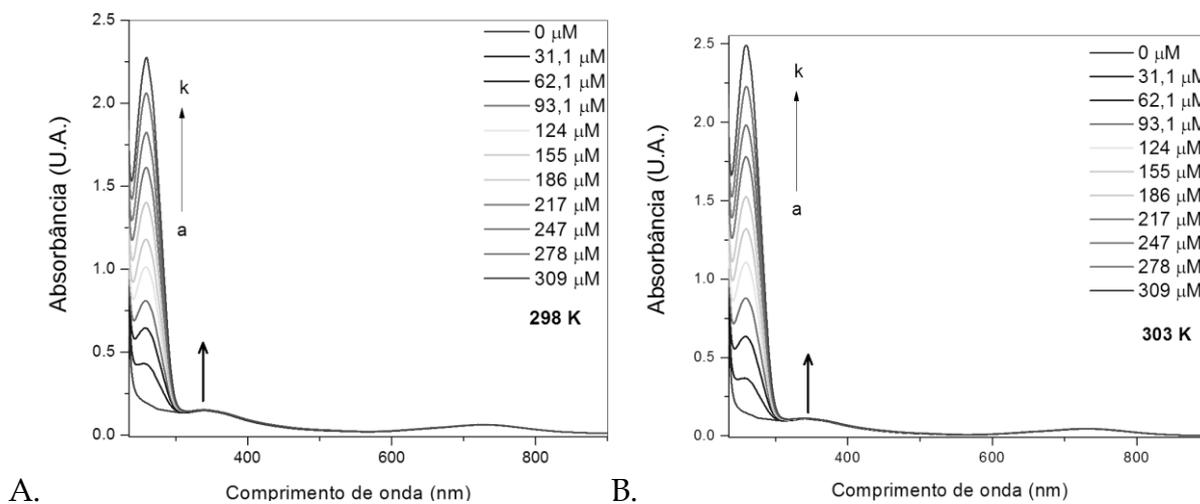


Figura 129. Titulações espectrofotométricas do complexo 3 com *fs*-DNA em 25 e 30 °C

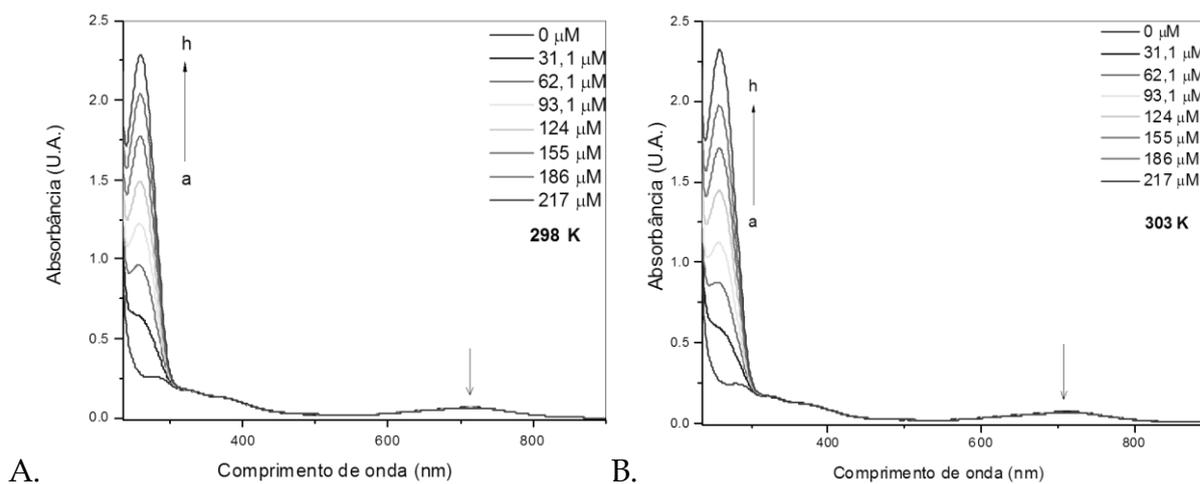


Figura 130. Titulações espectrofotométricas do complexo 4 com *fs*-DNA em 25 e 30 °C

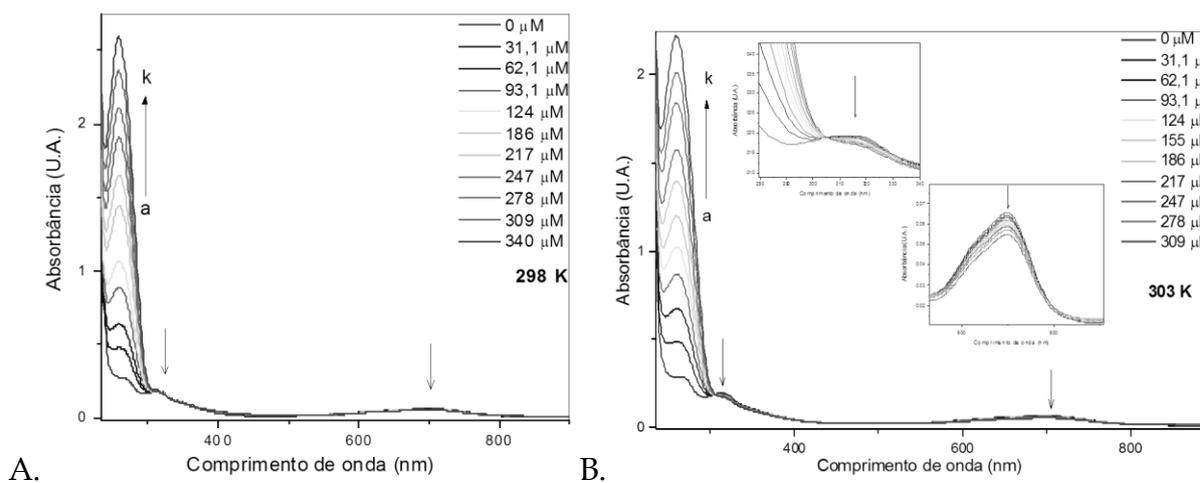


Figura 131. Títulações espectrofotométricas do complexo 5 com *fs*-DNA em 25 e 30 °C

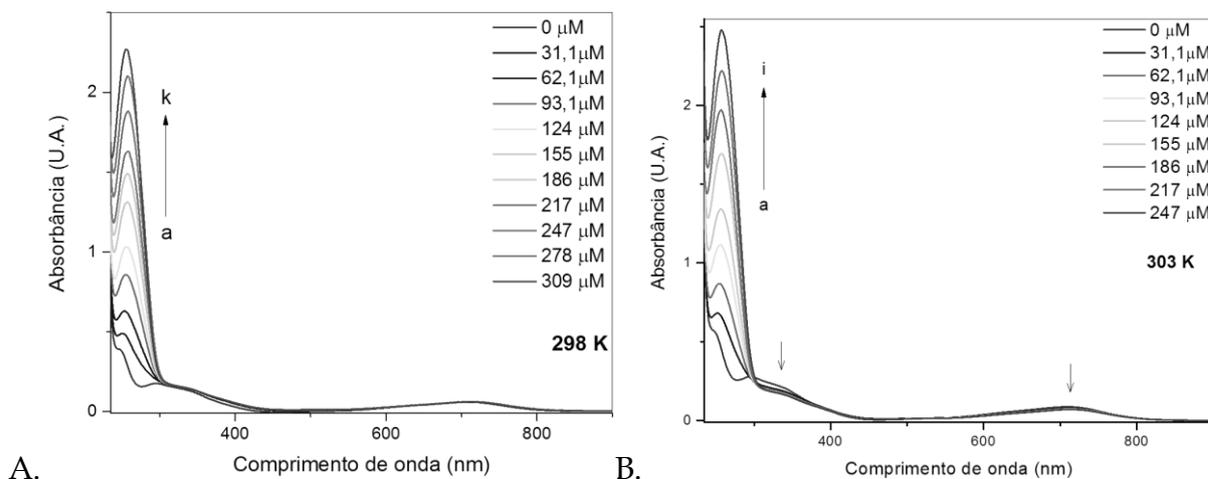


Figura 132. Títulações espectrofotométricas do complexo 6 com *fs*-DNA em 25 e 30 °C

