

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Novos Complexos de Ru(II) e Mg(II) com flavonóides:
atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação**

Regina Maria Mendes Oliveira*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientadora: Prof^a Dra. Rose Maria Carlos

* bolsista Capes

**São Carlos - SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48nc

Oliveira, Regina Maria Mendes.

Novos complexos de Ru(II) e Mg(II) com flavonóides :
atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação /
Regina Maria Mendes Oliveira. -- São Carlos : UFSCar,
2012.

160 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2012.

1. Química inorgânica. 2. Flavonóides. 3. Inibição
enzimática. 4. Inseticidas. 5. Antioxidantes. 6. Propriedades
ópticas. I. Título.

CDD: 546 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

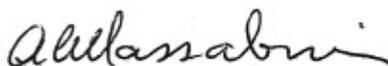
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata Regina Maria Mendes Oliveira, realizada em 09 de novembro de 2012:



Prof. Dra. Rose Maria Carlos



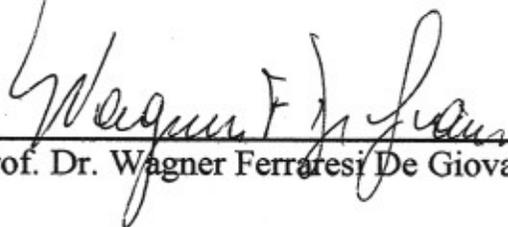
Prof. Dr. Edward Ralph Dockal



Prof. Dr. Antonio Carlos Massabni



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. Wagner Ferraresi De Giovanni

**Aos meus familiares e amigos,
pela oportunidade e apoio
nas horas mais difíceis;
A Deus, por tudo...**

Com amor

Dedico

*"Ando devagar, porque já tive pressa
e levo hoje esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
ou nada sei..."*

*É preciso o amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir,
é preciso a chuva para florir.
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha, e ir tocando em frente...
Um dia a gente chora, no outro vai embora,*

Cada um de nós compõe a sua história, e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz e ser feliz..."

Almir Sater e Renato Teixeira



AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho ou que torceram por mim.

*À profa. **Dra. Rose Maria Carlos**, pela orientação, confiança e formação profissional.*

*Aos professores: **Dr. João B. Fernandes** (DQ/UFSCar), **Dra. Maria Fátima das Graças F. da Silva** (DQ/UFSCar) e **Dr. Odair C. Bueno** (CEIS/UNESP-Rio Claro), pela parceria.*

*Aos professores do DQ/UFSCar prof. **Dr. Antonio A. Mozeto**, **Dr. Edenir R. Pereira Filho** e **Dr. Moacir R. Forim** pela oportunidade de utilização dos equipamentos: bioanalisador Microtox, Absorção Atômica e ESI-MS, respectivamente. Também um agradecimento especial à profa. **Dra. Ivani A. Carlos** pela receptividade sempre agradável ao nos atender e ajudar nas discussões científicas.*

*Ao prof. **Dr. Amando Ito** (FFCLRP/USP) pelas medidas de tempo de vida de luminescência.*

*Ao prof. **Dr. Mauricio S. Baptista** (IQUSP) pelas medidas de microscopia confocal.*

*À profa. **Dra. Juliana Daniel** (UTFPR) pela ajuda na interpretação dos espectros de RMN.*

Ao Departamento de Química da UFSCar pelo apoio institucional.

*Aos técnicos do Departamento de Química da UFSCar, especialmente **Dorai Zandonai**, **Luciana Vizotto** e **Ademir Sertori** pelo apoio constante.*

*Às secretárias da Pós-Graduação **Ariane**, **Cristina** e **Luciana** pela atenção em nos atender.*

*Aos meus ex-orientadores prof. **Dr. Cícero Wellington B. Bezerra** (UFMA) e prof. **Dr. Mário S. Schultz** (NUPEM/UFRJ) e à minha ex. profa. **Dra. Gilza Prazeres** (UFMA), que sempre torcem por mim.*

*Aos professores do DQ/UFSCar que com certeza contribuíram muito para a minha formação, especialmente aos professores: **Dr. Orlando Fatibello Filho**, **Dr. Alzir A. Batista** e **Dr. Edward R. Dockal**, pelo aprendizado adquirido em suas Disciplinas ministradas.*

*À todos os colegas do laboratório LAFIB (**Carolina Cardoso**, **Caio**, **Débora**, **Edjane Rocha**, **Fábia Monique**, **Guilherme Chinini**, **Inara de Aguiar**, **Márcia Lima**, **Mariana Camilo**, **Miriam Numajiri**, **Paulo Maia**, **Rafael Marchi**, **Willian Ferreira**, **Van** - ei gente, está na ordem*

alfabética ok, sem ciúmes rsrs). Grata pela parceria e pelas conversas descontraídas. Sentirei saudades...

Aos colegas do laboratório PN, especialmente **André Sarria** e **Liliane**.

Aos amigos que tive o prazer de conhecê-los em São Carlos: **Zé, Ricardo, Luis, Laécio, Içamira, Walter, Wlisses, Marcela, Epáphras, Paulo, Poliana, Izaque**, e todos os demais, que me foram companhia, ombro amigo e conselheiro... obrigada!

À **Marcio Almeida**, pelo companheirismo, dedicação e carinho. À **dona Rosinha** pelo carinho e amizade.

À minha família pelo apoio sempre! À minha mãe, **Maria de Jesus** e meu pai **Pedro**. Desculpem a ausência... quero garantir o conforto de vocês e meu também. Aos meus avós, **Maria da Graça** e **Manoel Alexandre**, pela oportunidade que me deram de estudar, pelos valiosos ensinamentos, mesmo sem nunca terem freqüentado uma escola... ah, e pelas orações de todas as noites antes de dormir (a sua é forte vó, meu anjo...). Como sinto falta de vocês... Agradeço o amor e carinho de meus irmãos **Márcio, Virgínia, Leide, Rone, M. Roberto, Lu** e **Ernando**. A todos os meus tios e tias, primos e primas, sobrinhos e sobrinhas, afilhados, cunhados e cunhadas, **OBRIGADA** por toda a torcida!!! Também um agradecimento super especial às minhas tias **Alice** e **Maria da Cruz**. Minha imensa gratidão sempre, por tudo tudo...

Ao **POVOADO MANOEL JOÃO** (não tão moderno, mais muito humano: fica no interior de Arari, cidade do interior do Maranhão). Agradecer ao POVOADO é agradecer a minha própria família (abraço a TODOS!!!). Meninas do time **Manoel João Esporte Clube** valeu a torcida... ah, me aguardem (rsrs).

Aos meus amigos de Arari: **Cici, Marquinhos, Dona Dija, Seu Manoel, Vana**, obrigada pelo carinho.

À **CAPEs** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudo concedida.

Aos avaliadores desta Tese, **Dr. Antônio Carlos Massabni** (UNESP) e **Dr. Wagner Ferraresi De Giovanni** (FFCLRP-USP) por seus valiosos argumentos e os professores **Dr. Edward R. Dockal**, e **Dr. João B. Fernandes** por mais essa estimável contribuição.

E, para finalizar, agradeço a **Deus** por **TUDO, TUDO, TUDO** que me concedeu e, por todos os momentos que passei de bom e de "não tão bom", durante todo esse período!

FOI UMA SATISFAÇÃO!!!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ax.	Posição axial
cis	Referente ao isômero de posição cis de um composto
CH ₃ CN	Acetonitrila
CHN	carbono, hidrogênio, nitrogênio (análise elemental)
DMF	Dimetilformamida
DFT	Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, <i>Density Functional Theory</i>)
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECh(A.s.r)	Enzima acetilcolinesterase da formiga <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
ECh(E.e)	Enzima acetilcolinesterase do peixe elétrico <i>Electrophorus electricus</i>
EC ₂₀	Concentração ou dose efetiva que causa efeito em 20% das funções vitais ou funcionais dos organismos teste
EC ₅₀	Concentração ou dose efetiva que causa efeito em 50% das funções vitais ou funcionais dos organismos teste
EM	Espectrometria de massas
ESI	Electrospray
eq.	Posição equatorial
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FA	Fase aquosa
FO	Fase orgânica
hesp	Hesperidina
hespt	Hesperetina
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração do composto requerida para inibição de 50% no crescimento celular em relação ao controle
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado

	indutivamente
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LLCT	Transferência de Carga do Ligante para o Ligante (do inglês, <i>Ligand to Ligand Charge Transfer</i>)
LMCT	Transferência de Carga do Ligante para o Metal (do inglês, <i>Ligand to Metal Charge Transfer</i>)
Log <i>P</i>	Coefficiente de partição
m	Multiplete
Mg(II)	Magnésio com estado de oxidação II
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MLCT	Transferência de Carga do Metal para o Ligante (do inglês, <i>Metal to Ligand Charge Transfer</i>)
μM	Micromolar
nm	Nanômetro
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
Md	Sobrevivência mediana das operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
mmol	1×10^{-3} mol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
[M]	Íon molecular (MS)
ngina	Naringina
ngnina	Naringenina
p	Página
phen	1,10'-fenantrolina
PM	Peso molecular
PTBA	Perclorato de tetrabutílamônio
ppm	Partes por milhão

redox	referente aos potenciais de redução e oxidação de um composto
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
r.p.m.	Rotações por minuto
Ru(II)	Rutênio com estado de oxidação II
s	Singleto
(s)	Composto no estado sólido
SBF	Soro bovino fetal
sl	Singleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central
(sol.)	Composto em solução
S ₅₀	Sobrevivência mediana de 50% de um determinado organismo
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V ₀	Velocidade inicial
V _{máx}	Velocidade máxima
vs.	Versus (ou em função de)
δ	Deslocamento químico nos espectros de RMN
ε	Coeficiente de extinção molar ou absortividade molar
λ	Comprimento de onda
λ _{máx}	Comprimento de onda máximo
τ _{em}	Tempo de vida de emissão

LISTA DE FIGURAS

	p
Figura 1: Formigas cortadeiras.....	3
Figura 2: Representação das estruturas dos flavonóides hesperidina, hesperetina, naringina e naringnina.....	10
Figura 3: Fórmulas estruturais de pesticidas inorgânicos Ferbam, Ziram e Mancozeb.....	13
Figura 4: Ilustração do sistema nervoso dos insetos.....	16
Figura 5: Esquema para a preparação dos complexos 1-9	22
Figura 6: Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten.....	36
Figura 7: Representação da cinética enzimática de acordo com a equação 8 através do gráfico de Lineweaver-Burk ou de duplos inversos.....	37
Figura 8: Representação da curva cinética de Absorbância (em 412 nm) vs. Tempo (s) para o acompanhamento reacional da formação do íon TNB.....	38
Figura 9: Espectros de massas (ESI = 70 eV) dos complexos (a) 1 , (b) 2 , (c) 3 e (d) 4 em metanol.....	47
Figura 10: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante hesperidina (a), do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] (b) e do complexo 1 (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.....	49
Figura 11: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante hesperitina (a), do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] (b) e do complexo 2 (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.....	51
Figura 12: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante naringina (a), do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] (b) e	

	do complexo 3 (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.....	52
Figura 13:	Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante naringenina (a), do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] (b) e do complexo 4 (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.....	53
Figura 14:	Espectros eletrônicos na região UV-Vis do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] e dos complexos 1-4 em DMF, à 25 ± 0,1 °C	55
Figura 15:	(a) Absorbância vs. comprimento de onda para o complexo 1 em diferentes concentrações em DMF; (b) Representação gráfica da Lei de Beer, para o complexo 1 em DMF, em λ _{máx} = 470 nm e caminho óptico de 1 cm.....	56
Figura 16:	Voltamogramas cíclicos dos complexos 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e do precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] (e) em DMF (0,1 mol L ⁻¹ de PTBA), ν = 100 mV s ⁻¹ , à 25 ± 0,1 °C.....	57
Figura 17:	(a) Voltamogramas cíclico do complexo 1 (1 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em DMF (0,1 mol L ⁻¹ TBAPF ₆), ν(1-5) = 20, 40, 60, 80 e 100 mV s ⁻¹ , respectivamente; (b) Corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, à 25 ± 0,1 °C.....	58
Figura 18:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 1 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	60
Figura 19:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 2 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	64
Figura 20:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 3 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	66
Figura 21:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 4 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	68
Figura 22:	Estruturas sugeridas para os complexos 1-4	70
Figura 23:	Espectro vibracional na região do infravermelho dos ligantes hesp (a) e phen (b) livres e do complexo 5 (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.....	74
Figura 24:	(A) Espectro vibracional na região de 2000-300 cm ⁻¹ para o complexo 6 ; (B) na região de 4000-2000 para a hesperetina livre (a) e o complexo 6 (b), em pastilha de Csl na proporção	

	1:100.....	77
Figura 25:	Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo 7 em pastilha de Csl na proporção 1:100.....	78
Figura 26:	(A) Espectro vibracional na região de 2000-300 cm ⁻¹ para o complexo 8 ; (B) na região de 4000-2000 para a naringenina livre (a) e o complexo 8 (b), em pastilha de Csl na proporção 1:100.....	79
Figura 27:	(A) Espectro vibracional na região de 2000-300 cm ⁻¹ para o complexo 9 ; (B) na região de 4000-2000 para a hesperidina livre (a) e o complexo 9 (b), em pastilha de Csl na proporção 1:100.....	80
Figura 28:	Estrutura geral da subclasse flavanona e a divisão das I e II relatadas nos espectros de absorção.....	82
Figura 29:	Espectros eletrônicos na região UV-Vis dos compostos: (A) 1,10'-fenantrolina (a), hesperidina (b) e complexo 5 (c); (B) naringina (a) e complexo 7 (b); (C) hesperidina (a) e complexo 9 (b), em DMF, à 25 ± 0,1 °C.....	83
Figura 30:	Espectros eletrônicos na região UV-Vis dos compostos: (A) hesperetina (a) e complexo 6 (b); (B) naringenina (a) e complexo 8 (b), em DMF à 25 ± 0,1 °C.....	85
Figura 31:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 5 em CD ₃ OD à 25 °C.....	88
Figura 32:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 6 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	90
Figura 33:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 7 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	91
Figura 34:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 8 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	91
Figura 35:	Espectro de RMN ¹ H do complexo 9 em DMSO- <i>d</i> ₆ à 25 °C.....	92
Figura 36:	Geometria otimizada por cálculos computacionais para o complexo 5 , a estrutura mais estável, observada por diferentes ângulos.....	95

Figura 37:	Estruturas sugeridas para os complexos 5-9	97
Figura 38:	Espectros de emissão e excitação do complexo 5 (2×10^{-5} M) obtidos em metanol, à 25 °C.....	98
Figura 39:	Espectros de emissão e excitação do complexo 5 (20 μ M) nos solventes: DMSO (a), DMF (b), 1-octanol (c), CH ₃ CN (d), ciclohexano (e) e H ₂ O (f) à 25 °C.....	100
Figura 40:	Espectros de emissão do complexo 5 em DMSO/H ₂ O nas proporções 100/0, 95/5, 90/10 and 85/15 à 25 °C.....	101
Figure 41:	(a) Espectros de emissão do complexo 5 em diferentes pH's com $\lambda_{ex} = 360$ nm. As curvas 1–8 são correspondentes aos pH's 5,0, 6,0, 7,4, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0, respectivamente, à 25 °C. (b) Gráfico de intensidade de emissão vs. pH para o complexo 5 em solução tampão.....	102
Figure 42:	(a) Espectros de emissão da hesperidina livre em diferentes pH's com $\lambda_{ex} = 360$ nm. As curvas 1–6 são correspondentes aos pH's 5,0, 6,0, 7,4, 8,0, 9,0 e 10,0, respectivamente, à 25 °C.....	102
Figura 43:	Voltamogramas cíclicos do complexo 5 em água, com 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e $\nu = 100$ mV s ⁻¹ , à 25 \pm 0,1 °C. As setas verticais indicam o prosseguimento da intensidade de corrente com os ciclos de varredura. A seta horizontal indica o sentido da varredura.....	104
Figura 44:	Voltamogramas cíclicos do complexo 5 em tampão fosfato (0,065 mM) em pH 7,8 (a) e 10 (b), com 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e $\nu = 100$ mV s ⁻¹ , à 25 \pm 0,1 °C. As setas verticais indicam o prosseguimento da intensidade de corrente com os ciclos de varredura. A seta horizontal indica o sentido da varredura.....	105
Figura 45:	Voltamograma cíclico dos flavonóides livres hesperidina (a),	

	hesperetina (b), naringina (c) e naringenina (d) em tampão fosfato (0,065 mM, pH 7,8), com 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e $v = 100$ mV s ⁻¹ , à 25 ± 0,1 °C.....	107
Figura 46:	Voltamogramas cíclicos dos complexos 6 (a), 7 (b) e 8 (c) em tampão fosfato (0,065 mM, pH 7,8 e do complexo 9 (d) em água, com 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e $v = 100$ mV s ⁻¹ , à 25 ± 0,1 °C....	108
Figura 47:	Espectros eletrônicos no UV-Vis do complexo 1 (a) e do complexo 5 (b) em solução aquosa depois de cada período de exposição à luz do dia, por 30 dias.....	110
Figura 48:	Espectros eletrônicos no UV-Vis do complexo 1 em solução tampão na faixa de pH 3,09 - 9,11, mantidas no escuro e registadas após 30 dias.....	111
Figura 49:	(a) Espectros de absorção eletrônica do complexo 5 em diferentes pH's (3 a 12) à 25 °C; (b) Gráfico de absorbância (em 360 nm) vs. pH.....	112
Figura 50:	Espectros de absorção eletrônica da hesperidina livre em diferentes pH's (5 a 12) à 25 °C; (b) Gráfico de absorbância (em 360 nm) vs. pH.....	113
Figura 51:	Espectros eletrônicos na região UV-Vis e curva cinética de Absorbância (em 412 nm) vs. Tempo (min) para o acompanhamento reacional da formação do íon TNB, no sistema controle (a) e na presença do complexo 1 (b). O perfil cinético de ambos é apresentado em (c). Condições: [enzima] = 0,025 U mL ⁻¹ ; [S] = 0,100 mM; [complexo 1] = 100 µM, à 25 °C	121
Figura 52:	Gráfico de barras representativo para a atividade enzimática no sistema controle, e na presença dos compostos: ligantes livres fenantrolina, hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina, do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] e dos complexos 1 e 5-9 , todos em concentração de 100 µM.	

	Condições: [enzima] = 0,025 U mL ⁻¹ ; [S] = 0,100 mM, à 25 °C..	122
Figura 53:	Gráficos de Lineweaver-Burke de 1/V ₀ vs. a recíproca da concentração do substrato acetilcolina, para diferentes concentrações do complexo 1 : (a) 0,0; (b) 50,0 e (c) 100,0 µM..	123
Figura 54:	Gráficos de 1/V ₀ vs. concentração do complexo 1 em diferentes concentrações do substrato acetilcolina: (a) 50, (b) 100, (c) 200 e (d) 300 µM.....	124
Figura 55:	Gráfico da porcentagem da atividade da enzima ECh(E.e.) vs. concentração do complexo 1 . O valor de IC ₅₀ foi determinado pela leitura da concentração que conduz a inibição em 50% da atividade da enzima (linha pontilhada).....	125
Figura 56:	Atividade das enzimas colinesterases do extrato de formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no sistema controle e na presença dos complexos 5-9	126
Figura 57:	Gráficos de porcentagem de inibição da bioluminescência da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> vs. a concentração do complexo 1 (a) e do complexo 5 (b), ambos com o padrão ZnSO ₄	128
Figura 58:	Ensaio MTT para estimar a citotoxicidade dos complexos 1 (a), 5 (b) e 7 (c) em células HeLa.....	130
Figura 59:	Imagens confocal de células HeLa incubadas com o complexo 5 (5 µM) à 37 °C por 30 min.....	133
Figura 60:	Imagens confocal de células HeLa incubadas com o complexo 7 (5 µM) à 37 °C por 30 min.....	133
Figura 61:	Efeito da hesperidina (a) e do complexo 5 em pH 7,8 (b) na inibição de O ₂ ^{•-} . Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão (n = 2).....	135
Figura 62:	Efeito da naringina (a) e do complexo 7 em pH 7,8 (b) na inibição de O ₂ ^{•-} . Os valores foram apresentados como média ±	

desvio padrão (n = 2).....	135
Figura 63: Gráfico de log da concentração do composto teste (μM) vs. a porcentagem de inibição de $\text{O}_2^{\bullet-}$, onde a concentração correspondente à inibição de 50% equivale ao valor de IC_{50}	136
Figura 64: Gráfico de log da concentração do composto teste (μM) vs. a porcentagem de inibição de $\text{O}_2^{\bullet-}$, onde a concentração correspondente à inibição de 50% equivale ao valor de IC_{50}	136

LISTA DE TABELAS

	p
Tabela 1: Principais espécies do gênero <i>Atta</i> e os locais de ocorrência no Brasil.....	4
Tabela 2: Dados percentuais para os teores de C, N e H, experimentais e teóricos, para os complexos 1-4	48
Tabela 3: Freqüências vibracionais e atribuições sugeridas para as principais bandas para os ligantes hesperidina e fenantrolina livres e seu respectivo complexo 5	50
Tabela 4: Freqüências vibracionais e atribuições sugeridas para as principais bandas para os ligantes livres hesperetina, naringina e naringenina e seus respectivos complexos 6-8 . As atribuições foram de acordo com a literatura.....	54
Tabela 5: Atribuições sugeridas para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C NMR do ligante livre hesperidina e do complexo 1 em $\text{DMSO}-d_6$	61
Tabela 6: Atribuições sugeridas para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C NMR do ligante 1,10'-fenantrolina e do complexo 1 em $\text{DMSO}-d_6$	62
Tabela 7: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H da hesperetina livre e do complexo 2 em $\text{DMSO}-d_6$	65
Tabela 8: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H da naringina livre e do complexo 3 em $\text{DMSO}-d_6$	67
Tabela 9: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H da naringenina livre e do complexo 4 em $\text{DMSO}-d_6$	69
Tabela 10: Dados percentuais para os teores de C, N e H, experimentais	

	e teóricos, para os complexos 5-9	72
Tabela 11:	Freqüências vibracionais e atribuições sugeridas para as principais bandas para os ligantes hesperidina e fenantrolina livres e seu respectivo complexo 5 . As atribuições sugeridas foram de acordo com a literatura.....	75
Tabela 12:	Freqüências vibracionais e atribuições para as principais bandas para os complexos 6-8 . As atribuições sugeridas foram de acordo com a literatura.....	81
Tabela 13:	Atribuições, λ (nm) e ϵ ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para as bandas de absorção observadas nos espectros na região UV-Vis dos ligantes fenantrolina, hesperidina e naringina livres e dos complexos 5, 7 e 9 , em DMF.....	84
Tabela 14:	Atribuições, λ (nm) e ϵ ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para as bandas de absorção observadas nos espectros na região UV-Vis dos ligantes hesperetina e naringenina livres e dos complexos 6 e 8 , em DMF.....	86
Tabela 15:	Atribuição para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H dos ligantes hesperidina e 1,10'-fenantrolina livres e do complexo 5 em CD_3OD	89
Tabela 16:	Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H dos complexos 6-9 em $\text{DMSO}-d_6$	93
Tabela 17:	Comprimentos de ligação e alguns ângulos de ligação selecionados da estrutura otimizada do complexo 5	96
Tabela 18:	Solubilidade em água e coeficiente de partição ($\text{Log } P$) dos compostos hesperidina, hesperetina, naringina, naringenina, complexo 1 , e 5-9	115
Tabela 19:	Solubilidade em solução tamponada em vários pH's para o complexo 5	116

Tabela 20:	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (S_{50}) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os compostos hesperidina, hesperitina, naringina e seus respectivos complexos 1-9 e o inseticida sulfluramida.....	117
-------------------	--	-----

LISTA DE ESQUEMAS

	p
Esquema 1: Via de síntese para obtenção do complexo 1	46
Esquema 2: Via de síntese para obtenção do complexo 5	71
Esquema 3: Reações sugeridas para os processos eletroquímicos do complexo 5	106
Esquema 4: Ilustração das reações sugeridas no Esquema 3 para os processos eletroquímicos do complexo 5 em água.....	106
Esquema 5: Modelo das reações envolvidas no método de inibição enzimática (método de Ellman) utilizado neste trabalho.....	120
Esquema 6: Ilustração do mecanismo de inibição não-competitivo.....	123

RESUMO

Novos Complexos de Ru(II) e Mg(II) com flavonóides: atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação. O uso de pesticidas na agricultura com a finalidade de aumentar e assegurar a produção de alimentos para uma população mundial crescente tem gerado preocupações quanto aos riscos para a saúde humana e ao meio ambiente. Por isso, pesquisas por novas estratégias que buscam uma alternativa mais segura são importantes. Com este objetivo, neste trabalho desenvolveu-se novos complexos de rutênio(II) e magnésio(II) contendo os ligantes fenantrolina e os flavonóides (hesperidina, hesperetina, naringina ou naringenina) coordenados ao centro metálico. Os complexos foram sintetizados e caracterizados por análise elementar de C,H,N, absorção atômica e ESI-MS(+). As estruturas foram investigadas por cálculos computacionais e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C NMR. Os complexos são estáveis no estado sólido, na maioria dos solventes orgânicos testados e em vários pH's e, são mais hidrosolúveis e liposolúveis que o flavonóides livres. Os complexos apresentaram atividade inseticida frente às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* com um modo de ação lento. A atividade da enzima AChE foi moderadamente inibida por complexos de Ru^{2+} , enquanto os complexos de Mg^{2+} foram inibidores potentes somente para a enzima colinesterase de *Atta sexdesns rubropilosa*, indicando alta seletividade para insetos. Além do mais, os compostos são essencialmente não tóxicos para a bactéria aquática *Vibrio fischeri* e para células HeLa. Os complexos de Mg^{2+} apresentaram algumas propriedades que merecem ser destacadas: (i) nos experimentos eletroquímicos em solução aquosa observou-se a formação de um mecanismo cíclico e estável envolvendo espécies neutras, iônicas e radicalares; (ii) foram melhores sequestradores do radical superóxido em comparação aos flavonóides livres; (iii) e apresentaram fluorescência azul intensa fortemente dependente do meio, podendo atuar como sistemas fluorescentes do tipo "on/off" em função do solvente e em função do pH. A fluorescência permitiu detectar por microscopia confocal a alta absorção dos complexos de magnésio nas células HeLa. No conjunto, as propriedades físico-químicas e biológicas observadas para os complexos de Ru^{2+} e Mg^{2+} abrem novas fronteiras de aplicação para estes compostos nas diversas áreas da ciência como agricultura, medicina e materiais ópticos.

ABSTRACT

New Complexes of Ru(II) and Mg(II) with flavonoids: toxic activity,

active sites and mechanisms of action. The use of pesticides in agriculture, in order to enhance and ensure food production for a growing population has led to many concerns about risks to human health and the environment. Therefore, search for new strategies which seek a safer alternative is very important. With this aim, herein we describe new ruthenium(II) and magnesium(II) complexes containing phenanthroline and flavonoids (hesperidin, hesperetin, naringin or naringenin) ligand, These complexes were synthesized and characterized by elemental analysis (C,H,N), atomic absorption and ESI-MS(+). The structures were investigated by computational calculation and ^1H , ^{13}C NMR spectroscopic techniques. The complexes are stable in solid state, in most of the organic solvents tested and at various pH values. They are more hydrosoluble and liposoluble than the free flavonoides. The insecticidal activity bioassay against the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* demonstrated that the complexes show a delayed kill action. The activity of the *Electrophorus electricus* AChE enzyme was moderately inhibited by the Ru^{2+} complexes whereas the Mg^{2+} complexes were powerfull inhibitors only against AChE of *Atta sexdens rubropilosa*, indicating their high selectivity to insects. Further, the complexes are essentially non-toxic to the aquatic bacterium *Vibrio fischeri* and to human HeLa cells. The Mg^{2+} complexes presented unique properties: (i) in the electrochemical experiments in aqueous solution was observed the formation of a cyclic mechanism stable involving neutral, ionic and radical species; (ii) are better scavenger superoxide radical than the free flavonoides; (iii) presents a strong blue fluorescence. They act as an “on/off” fluorescent switch through the changing of the medium, solvents and pH. The fluorescence observed by confocal microscopy allowed to detect the high absorption of the magnesium complexes in the HeLa cells. Overall, the physicochemical and biological properties observed for Ru^{2+} and Mg^{2+} complexes opens new frontiers of application for these compounds in various areas of science such as agriculture, medicine, and optical materials.

SUMÁRIO

	p
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISRA DE ESQUEMAS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
CAPÍTULO 1	
1 - INTRODUÇÃO.....	2
1.1 - Importância da agricultura e pecuária no Brasil.....	2
1.2 - Pragas Agro-pastorilflorestal do Brasil.....	2
1.2.1 - Formigas cortadeiras.....	3
1.2.2 - Danos e benefícios causados pelas formigas cortadeiras.....	4
1.3 - Controle de Pragas Agro-pastorilflorestal do Brasil.....	5
1.3.1 - Agrotóxicos.....	6
1.3.2 - Controle de formigas cortadeiras.....	7
1.4 - Inseticidas.....	8
1.4.1 - Reservas.....	8
1.4.2 - Inseticidas naturais.....	9
1.4.2.1 - Flavonóides.....	9
1.4.2.2 - Complexos metal-flavonóides.....	11
1.4.3 - Inseticidas sintéticos inorgânicos.....	11
1.5 - Os metais nos sistemas biológicos.....	13
1.5.1 - Química e Biologia do Rutênio.....	13
1.5.2 - Química e Biologia do Magnésio.....	14
1.6 - Modo de Ação.....	15
1.7 - Busca de novas estratégias para o controle de formigas cortadeiras.....	16
CAPÍTULO 2	
2 - OBJETIVOS.....	18

2.1 -	Objetivo geral.....	18
2.1.1 -	Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 3		
3 -	PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1 -	Reagentes.....	20
3.2 -	Preparação dos complexos.....	21
3.2.1 -	Síntese de <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] (complexo precursor).....	22
3.2.2 -	Síntese de <i>cis</i> -[Ru(hesp)(phen) ₂](PF ₆) (complexo 1).....	23
3.2.3 -	Síntese de <i>cis</i> -[Ru(hespt)(phen) ₂](PF ₆) (complexo 2).....	23
3.2.4 -	Síntese de <i>cis</i> -[Ru(ngina)(phen) ₂](PF ₆) (complexo 3).....	23
3.2.5 -	Síntese de <i>cis</i> -[Ru(ngnina)(phen) ₂](PF ₆) (complexo 4).....	24
3.2.6 -	Síntese de <i>cis</i> -[Mg(hesp) ₂ (phen)] (complexo 5).....	24
3.2.7 -	Síntese de <i>cis</i> -[Mg(hesp) ₂ (phen)] (complexo 6).....	25
3.2.8 -	Síntese de <i>cis</i> -[Mg(hesp) ₂ (phen)] (complexo 7).....	25
3.2.9 -	Síntese de <i>cis</i> -[Mg(hesp) ₂ (phen)] (complexo 8).....	25
3.2.10 -	Síntese de <i>cis</i> -[Mg(hesp) ₂ (phen)] (complexo 9).....	26
3.3 -	Equipamentos e Metodologias.....	26
3.3.1 -	Equipamentos gerais.....	26
3.3.2 -	Atmosfera inerte.....	27
3.3.3 -	Análise Elementar.....	27
3.3.4 -	Espectrometria de massas com ionização por Electrospray.....	27
3.3.5 -	Espectrometria de absorção atômica de chama.....	27
3.3.6 -	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.....	28
3.3.7 -	Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....	28
3.3.8 -	Luminescência no estado estacionário.....	28
3.3.9 -	Tempo de vida de luminescência.....	29
2.3.10 -	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	29
3.3.11 -	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	30
3.3.12 -	Cálculos computacionais.....	30
3.3.13 -	Eletroquímica.....	30

3.3.14 -	Avaliação da estabilidade	31
3.3.14.1 -	Estabilidade fotoquímica (efeito da luz).....	31
3.3.14.2 -	Estabilidade química (efeito do pH).....	32
3.3.15 -	Avaliação da Solubilidade e Lipofilicidade.....	33
3.3.15.1 -	Solubilidade.....	34
3.3.15.2 -	Determinação de log <i>P</i>	34
3.3.16 -	Atividade inseticida: ensaios <i>in vivo</i> com as formigas.....	35
3.3.16.1 -	Coleção de insetos	35
3.3.16.2 -	Bioensaios.....	35
3.3.17 -	Modo de ação: estudo de inibição da enzima acetilcolinesterase..	36
3.3.17.1 -	Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase ECh(<i>E.e.</i>).....	37
3.3.17.1.1 -	Determinação da velocidade da reação enzimática.....	38
3.3.17.1.2 -	Determinação da porcentagem de atividade da enzima.....	38
3.3.17.1.3 -	Determinação do tipo de inibição da AChE.....	39
3.3.17.1.4 -	Determinação do valor de IC ₅₀	39
3.3.17.2 -	Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase ECh(<i>A.s.r.</i>).....	39
3.3.17.2.1-	Obtenção do extrato de formigas contendo AchE.....	39
3.3.18 -	Ensaio de Ecotoxicidade (testes de toxicidade aguda).....	40
3.3.18.1 -	Bioensaios com <i>V. fischeri</i> (Sistema Microtox [®]).....	40
3.3.19 -	Ensaio de citotoxicidade em células humanas.....	41
3.3.19.1 -	Cultura das células.....	41
3.3.19.2 -	Ensaio de citotoxicidade.....	41
3.2.19.3 -	Microscopia confocal.....	42
3.2.20 -	Avaliação da atividade sequestradora de radicais superóxido.....	43

CAPÍTULO 4

4 -	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 -	Preparação e caracterização dos complexos de Ru(II) (1-4)	45
4.1.1 -	Análise Elementar e ESI/MS dos complexos 1-4	46
4.1.2 -	Espectros vibracionais no IV dos complexos 1-4	48
4.1.3 -	Espectros eletrônicos no UV-Vis dos complexos 1-4	54

4.1.4 -	Eletroquímica.....	56
4.1.5 -	Espectros de RMN dos complexos 1-4.....	58
4.1.5.1 -	RMN de ^1H e ^{13}C do complexo 1.....	59
4.1.5.2 -	RMN de ^1H dos complexos 2-4.....	63
4.2 -	Preparação e caracterização dos complexos de Mg(II) (5-9).....	71
4.2.1 -	Análise Elementar dos complexos 5-8 e absorção atômica para 5	71
4.2.2 -	Espectros vibracionais no IV dos complexos 5-9.....	72
4.2.2.1 -	Espectro no IV do complexo 5.....	73
4.2.2.2 -	Espectros no IV dos complexos 6-9.....	75
4.2.3 -	Espectros eletrônicos no UV-Vis dos complexos 5-9.....	81
4.2.4 -	Espectros de RMN de ^1H dos complexos 5-9.....	86
4.2.4.1 -	RMN de ^1H do complexo 5.....	87
4.2.4.2 -	RMN de ^1H dos complexos 6-9.....	90
4.2.5 -	Cálculos computacionais.....	94
4.2.6 -	Propriedades emissivas.....	98
4.2.6.1 -	Luminescência em diferentes solventes.....	99
4.2.6.2 -	Luminescência em diferentes valores de pH.....	101
4.2.7 -	Eletroquímica.....	103
4.3 -	Propriedades Físico-químicas.....	109
4.3.1 -	Avaliação da estabilidade química e fotoquímica.....	109
4.3.2 -	Avaliação da Solubilidade e Lipofilicidade.....	114
4.4 -	Propriedades Biológicas.....	116
4.4.1 -	Atividade inseticida: ensaios <i>in vivo</i> com as formigas cortadeiras.	116
4.4.2 -	Modo de ação: estudo de inibição da enzima acetilcolinesterase..	119
4.4.2.1 -	Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase EAC _h (E.e.).....	119
4.4.2.2 -	Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase EAC _h (A.s.r.).....	126
4.4.3 -	Avaliação da Ecotoxicidade (testes de toxicidade aguda).....	127
4.4.4 -	Ensaio de citotoxicidade com células humanas.....	129
4.5 -	Considerações Relevantes.....	131
4.5.1 -	Sondas Luminescentes.....	131
4.5.1.1 -	Microscopia confocal.....	132

4.5.2 -	Radical Superóxido.....	134
4.5.2.1 -	Investigações da atividade sequestradora de radicais $O_2^{\bullet-}$	134
CAPÍTULO 5		
5 -	CONCLUSÕES.....	139
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
	APÊNDICE A.....	157

Capítulo 1

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

A redação desta tese, em grande parte, refere-se à síntese, caracterização e ensaios toxicológicos de complexos do tipo diimina-metal(II)-flavonóide e à potencial aplicação destes no controle e/ou combate de insetos praga quando adicionados às formulações pesticidas. Neste caso, usou-se o inseto modelo *Atta sexdens rubropilosa*, uma das principais pragas da agricultura brasileira.

1.1 - Importância da agricultura e pecuária no Brasil

A agricultura é um setor da economia que influencia significativamente no desenvolvimento do Brasil. A produção de alimentos e outras matérias-primas para o setor agroindustrial contribui para a descentralização urbana, viabilizando qualidade de vida para populações que vivem no campo e em pequenas cidades. A agricultura representa 20% das exportações, 12% do PIB (Produto Interno Brasileiro) e gera empregos para 22% da população ativa.¹

No período de 2000 à 2008, as exportações agrícolas do Brasil cresceram 18,6%, em média, por ano. Em 2000 o País ocupava o sexto lugar no ranking dos exportadores agrícolas.

No complexo soja (grão, farelo e óleo), as exportações mais do que quadruplicaram, saindo de US\$ 4,2 bilhões em 2000 para US\$ 78 bilhões na safra 2010/2011.² Nos últimos dez anos, o Brasil manteve liderança nas exportações de produtos como café, suco de laranja e açúcar. No mercado de café a participação brasileira oscilou entre 29% e 33% e, no mercado de suco de laranja o país é responsável por 80% das exportações mundiais - a maior fatia de um produto agrícola brasileiro.³

1.2 - Pragas Agro-pastorilflorestal do Brasil

A agricultura e a pecuária são atividades econômicas indispensáveis na produção de alimentos. Porém, tanto a agricultura como a pecuária possui a necessidade imediata de espaço físico. A agricultura moderna e a criação de pastagens estão relacionadas ao plantio de extensas áreas de monocultura, diminuindo a diversidade vegetal local e a diversidade animal.⁴ Assim, o uso de

monoculturas facilita o estabelecimento e o desenvolvimento de insetos que, por encontrarem nesses locais fontes de alimento em abundância e ausência de inimigos naturais, podem se tornar pragas, com destaque, no Brasil, para as formigas cortadeiras de gênero *Atta* e *Acromyrmex*.⁵

1.2.1 - Formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras (Figura 1) são insetos sociais e pertencem ao Reino Animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Família Formicidae, Subfamília Myrmecinae e Tribo Attini.⁶ Os gêneros de maior importância são *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas popularmente como saúvas e quenquéns, respectivamente.



Figura 1: Formigas cortadeiras.

Já foram identificadas cerca de 45 espécies de formigas cortadeiras,⁶ as quais são responsáveis por grandes perdas na atividade agro-pastorilflorestal. Elas cortam os vegetais e transportam os pedaços para o formigueiro onde, em câmaras especiais, esse material é utilizado para o cultivo de um fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* do qual se alimentam.⁷

As formigas cortadeiras apresentam grande distribuição desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, com exceção do Chile, algumas ilhas das Antilhas, Costa do Peru e Canadá. A maior diversidade de espécies são encontradas no Brasil,⁸ onde ocorrem 10 espécies e três subespécies de *Atta*. As principais espécies do gênero *Atta* e os locais de ocorrência no Brasil são descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Principais espécies do gênero *Atta* e os locais de ocorrência no Brasil

ESPÉCIES	LOCAIS DE OCORRÊNCIA
<i>Atta sexdens piriventris</i> (saúva-limão-sulista)	SP, PR, SC e RS
<i>Atta opaciceps</i> (saúva-do-sertão-do-nordeste)	PI, CE, RN, PB, PE, SE, e BA
<i>Atta sexdens rubropilosa</i> (saúva-limão)	SP, MG, ES, RJ, MT, GO e PR
<i>Atta cephalotes</i> (saúva-da-mata)	AM, RO, RR, PA, AP, MA, PE e BA
<i>Atta laevigata</i> (saúva-cabeça-de-vidro)	SP, AM, RR, PA, MA, CE, PE, AL, BA, MG, RJ, MT, GO e PR.
<i>Atta sexdens sexdens</i> (formiga-mandioca)	AM, AC, RO, RR, PA, AP, MT, GO, MA, PI, CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA e MG.

1.2.2 - Danos e benefícios causados pelas formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras quando em ambientes ecologicamente equilibrados, contribuem para o reflorestamento de muitos ecossistemas ao dispersarem e promoverem a germinação de sementes ao removerem a polpa dos frutos. Também, podam algumas plantas e promovem seu crescimento, contribuem na aeração do solo e o tornam fértil ao incorporarem matéria orgânica à terra, além de serem predadoras naturais de diversos artrópodes, dos quais muitos são pragas agrícolas.

Entretanto, as formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* estão entre as mais importantes pragas de culturas agrícolas, áreas de reflorestamento e pastagens,⁹ cortando até 15% da safra de folha de pé em suas áreas de forrageio.¹⁰ No entanto, o sucesso de colonização é atribuído a sua grande voracidade e capacidade de proliferação,¹¹ pois um saúveiro adulto (6 anos de idade) pode abranger uma área de cerca de 100 m² e consumir cerca de 1 tonelada de matéria vegetal fresca/ano.¹²

Em áreas de reflorestamento as formigas cortadeiras são as principais pragas, representando mais de 75% dos custos e do tempo gastos no controle de pragas florestais no Brasil.¹³

O Brasil possui uma das maiores áreas de plantio comercial do mundo para utilização na produção de pasta de celulose, construção civil, siderurgia e movelaria. No entanto, a persistência formigas cortadeiras também regula a produtividade desses plantios.¹⁴ Vários trabalhos na literatura demonstram que árvores de *Eucalyptus grandis*, desfolhadas aos seis meses de idade têm 99,3% de probabilidade de morrer, enquanto que o crescimento em altura e diâmetro é reduzido em 31,7% e 25,1%, respectivamente, provocando uma redução de 61,6% na produção de madeira em relação às árvores não desfolhadas. Isto representa uma perda anual de 0,87% no volume de madeira para cada 2,76 m² de saueiro/ha. Já as árvores de *Pinus caribaea* atacadas reduzem 12% no crescimento em altura e 17,4% em diâmetro, além de apresentar mortalidade média de 11,7%.

Alguns estudos também mostram que cerca de dez saueiros com cinco anos de idade podem atingir 715 m² de pastagens, consumir 21 kg/dia de folhas e reduzir em cerca de 50% a capacidade da pastagem.¹⁵

As formigas cortadeiras também estão entre as principais pragas da cana-de-açúcar, resultando em perdas de produtividade de três a cinco toneladas de cana, por saueiro, ao ano, e na redução de até 30% no teor de sacarose da cana colhida na área de forrageamento.

Além dos prejuízos na área agrícola, em função das escavações que fazem no solo (conhecidas como galerias e painéis dos formigueiros), elas podem provocar acidentes com veículos e máquinas agrícolas e causar danos a prédios, pontes, estradas de rodagem e de ferro, pois tais escavações dos formigueiros no subsolo são susceptíveis ao peso dessas construções.¹⁶

1.3 - Controle de Pragas Agro-pastorilflorestal do Brasil

O aumento populacional e a necessidade de aumentar a produção, associadas ao desenvolvimento econômico, social e científico, possibilitou a criação de novas tecnologias para o uso na agricultura, dentre as quais se destacam os agrotóxicos para o controle de pragas, objetivando aumentar e assegurar a produção agrícola.

1.3.1 - Agrotóxicos

Segundo a legislação brasileira, os agrotóxicos e afins são “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.¹⁷

A utilização dos agrotóxicos na agricultura brasileira iniciou-se na década de 1920. Inicialmente, eles foram empregados em programas de saúde pública no combate de vetores e controle de parasitas. Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND) incentivou o uso de agrotóxicos na agricultura com adoção de medidas que condicionavam o agricultor à compra de veneno com recursos de crédito rural, ao instituir a inclusão de uma cota definida de agrotóxico para cada financiamento requerido.¹⁸

Em 1998, o Brasil foi responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade de agrotóxicos utilizados na América Latina, o que envolveu um comércio estimado em cerca de US\$ 2,56 bilhões.¹⁹ Em 2000, o consumo nacional de agrotóxico foi de 158,737 toneladas, com o perfil de consumo no meio rural obedecendo a seguinte ordem: herbicidas > inseticidas > fungicidas > acaricidas. Os dados fornecidos pela Associação Brasileira de Indústria Química (ABIQ) mostraram que, em 2004, o Brasil consumiu US\$ 4,2 bilhões de agrotóxicos, o que colocou o país como o quarto maior consumidor mundial. O emprego de agrotóxicos nos Estados de Espírito Santo, Goiás, Mato grosso de Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins corresponde atualmente a 70% do total utilizado no país.²⁰

Segundo a Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA), até 14 de julho de 2006, havia 409 ingredientes ativos registrados para uso agrícola ou domissanitário no Brasil.²¹ De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), que pertence ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, até 28 de maio de 2006, existiam 1.153 produtos agrotóxicos registrados no país.²²

1.3.2 - Controle de formigas cortadeiras

Apesar de inúmeros estudos e o desenvolvimento de várias alternativas de controle tais como o controle mecânico, controle cultural, controle físico e controle biológico, os métodos químicos são os mais utilizados para controle de formigas cortadeiras. Dentre as várias formulações disponíveis, como pós-secos, concentrados emulsionáveis, gases liquefeitos, produtos para termonebulização, as iscas formicidas são as mais amplamente utilizadas por apresentar maior eficiência no combate à insetos praga.²³

As iscas formicidas são compostas por um substrato atrativo em mistura com um princípio ativo tóxico. O inseticida formulado em isca tóxica deve agir por ingestão e apresentar algumas características particulares, dentre elas a ação tóxica retardada, com mortalidade menor que 15% após o primeiro dia e maior que 85% após o décimo quarto dia a partir do oferecimento das iscas; deve ser letal em baixas concentrações; e não causar danos ambientais; o inseticida deve ser inodoro e não repelente.

As primeiras iscas tóxicas continham o inseticida organoclorado aldrin, como princípio ativo. Contudo, o controle eficiente desses insetos, tanto na agricultura como em áreas de reflorestamento, foi conseguido com o uso de iscas contendo, como princípio ativo, o inseticida organoclorado dodecacloro.²⁴ No entanto, a ação desse princípio ativo foi muito questionada. Assim, após vários estudos terem constatado os efeitos tóxicos ao ambiente e aos animais, em primeiro de janeiro de 1993 foi proibido o registro, a produção, a importação, a exportação, a comercialização e a utilização de iscas formicidas à base de dodecacloro em todo o território nacional.

Com isso, tornou-se necessária a busca de novas substâncias, que mantivessem a alta eficiência do dodecacloro para o controle desses insetos, mas que fossem mais seletivos e menos agressivos ao ambiente e mais seguros para o homem. Tal investigação culminou com a descoberta da sulfluramida (N-etil-perfluooctano sulfonamida), a qual afeta o processo de fosforilação oxidativa, interrompendo a produção de ATP através de um modo de ação lento.

Portanto, o uso da sulfluramida como princípio ativo foi uma das alternativas encontradas para a formulação de novas iscas formicidas, sendo amplamente utilizada até os dias de hoje. Uma das vantagens com relação ao

dodecacloro seria a baixa persistência no ambiente com degradação de 42,59% em 28 dias,²⁵ enquanto a meia vida do dodecacloro é 5 a 12 anos.

No entanto, há sérias limitações quanto ao uso da sulfluramida em muitos países²⁶. Isto se deve à sua potencial toxicidade e bioacumulação em animais terrestres e aquáticos, além de evidências de seu efeito tóxico no desenvolvimento e reprodução de animais. Assim todos os produtos que contém o pesticida sulfluramida em sua formulação estão sob um cronograma específico para serem extintos até 2016.²⁷

Por este motivo, as empresas continuam investigando novos produtos que apresentem eficiência comparável à sulfluramida. Dos novos grupos químicos, merece destaque o inseticida fipronil, um fenil-pirazol, que atua no sistema nervoso central, especificamente no sistema GABA (ácido gama-aminobutírico). O produto apresenta-se ativo principalmente por ingestão. Porém ainda pouco se sabe sobre a toxicidade do fipronil, mas estudos já apontam que este inseticida apresenta toxicidade significativa em sistema aquáticos, merecendo cuidados no manejo da água de irrigação da lavoura.²⁸

1.4 - Inseticidas

1.4.1 - Resalvas

Apesar de vários efeitos impactantes de muitos pesticidas para a saúde e o meio ambiente, o uso racional destes podem trazer várias vantagens para a sociedade. Por exemplo, o DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano),²⁹ atualmente um pesticida proscrito, devido aos seus efeitos ambientais devastadores, salvou milhões de italianos da febre tifóide e é o responsável pela erradicação da malária na Europa e América do Norte. Outro exemplo é a fisiostigmina (vulgarmente conhecida por eserina),²⁹ um inseticida da classe dos carbamatos e que também foi bastante utilizado em tribos da África ocidental em “julgamentos por prova”, onde os suspeitos eram forçados a ingerí-las. Hoje, com o uso de doses adequadas, a fisiostigmina é amplamente utilizada no tratamento do Mal de Alzheimer. Além disso, após a elucidação da sua estrutura foram sintetizados análogos com atividade tanto do ponto de vista farmacêutico (a neostigmina, por exemplo) como do ponto de vista agroquímico.

Contudo o manejo adequado de formulações pesticidas, incluindo o uso racional de iscas formicidas como a aplicação localizada em épocas não chuvosas, por exemplo,¹² pode minimizar um possível impacto negativo sobre a mirmecofauna não alvo que é importante para o equilíbrio ambiental.³⁰

1.4.2 - Inseticidas naturais

Algumas plantas possuem metabolitos secundários como piretrina, rotenona e nicotina,³¹ por exemplo, que proporcionam certa proteção às plantas contra insetos predadores.³² A atividade inseticida de flavonóides contra formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* também tem sido descrita.³³ Esses compostos podem servir como agentes tóxicos poderosos para insetos e, em alguns casos, servir como ponto de partida para o desenvolvimento de novos inseticidas para uso comercial.³⁴ A exemplo disto tem-se os produtos Baygon, piretróides de origem sintética baseados em piretróides encontrados nas flores da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium*, comercializado pela Bayer AG desde 1996 contra insetos voadores.³⁵

1.4.2.1 - Flavonóides

Os flavonóides são um grupo amplamente distribuído de compostos polifenólicos caracterizado por uma estrutura de benzo-pirona comum. Eles representam uma classe muito diversificada de metabolitos secundários de plantas com cerca de 9000 estruturas já identificadas até agora. Estudos farmacológicos mostram que muitos flavonóides possuem atividades biológicas tais como inibição de enzimas,³⁶ sequestro de radicais livres,³⁷ atividades anti-inflamatória,³⁸ anti-estrogênica³⁹ e inibição de promoção de vários tipos de câncer.⁴⁰ Estes compostos são abundantes em frutas, verduras, sementes e plantas medicinais. Flavonóides de casca de frutas cítricas são constituídos basicamente de flavanonas glicosídicas, agliconas e flavonas glicosídicas.⁴¹

Dentre os compostos fenólicos, escolhemos para este projeto as flavanonas hesperidina (5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo, hesp), hesperetina (5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona, hespt), naringina (4',5-

dihidroflavanona-7-ramnoglicosídeo, naringina) e a naringenina (4',5,7-trihidroflavanona, naringina), Figura 2.

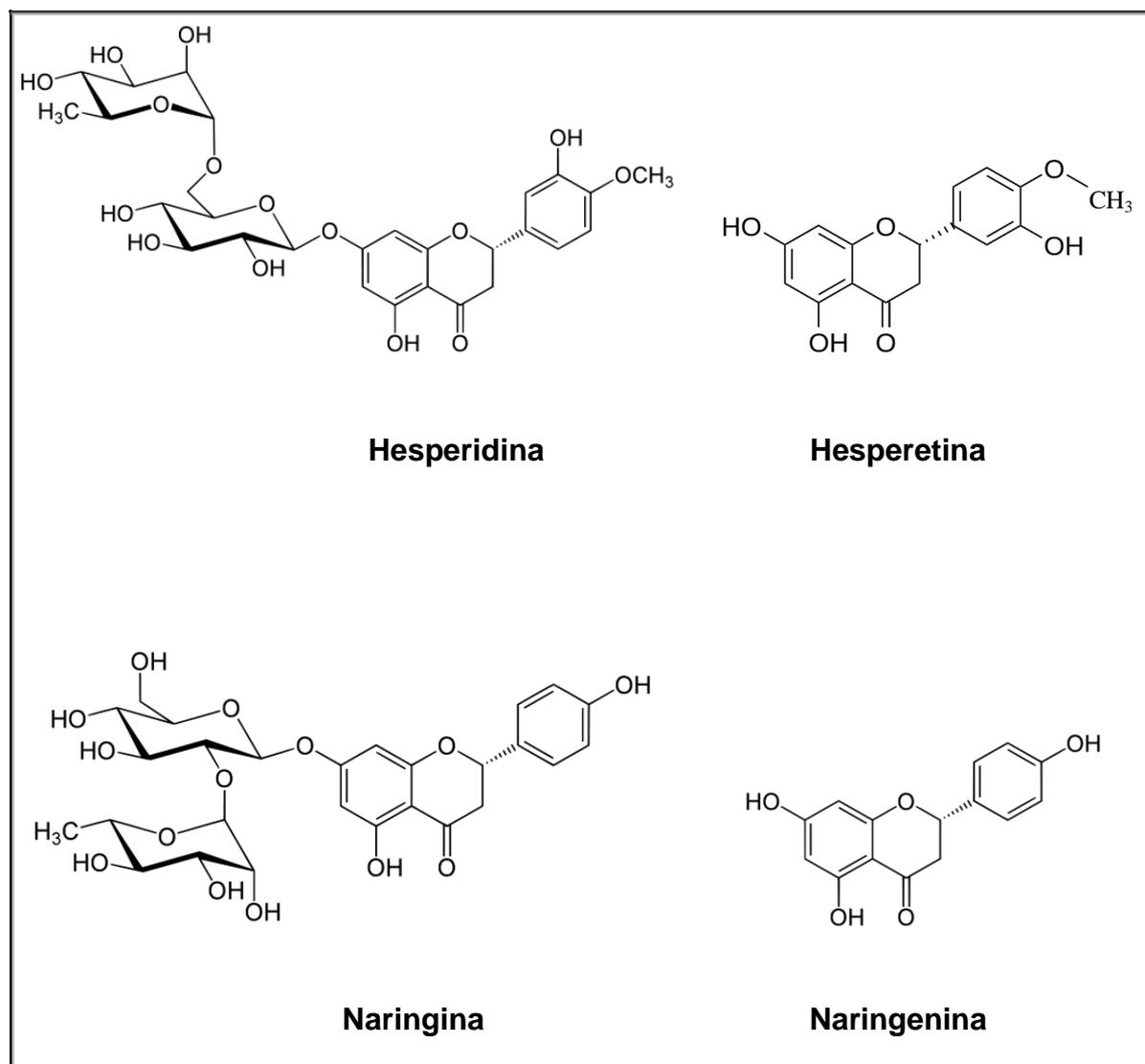


Figura 2: Representação das estruturas dos flavonóides hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina.

Estes flavonóides possuem atividades biológicas especiais tais como anti-inflamatória,⁴² anticarcinogênica, antitumoral,⁴³ regulação da síntese de colesterol hepático.⁴⁴⁻⁴⁶ No entanto, como muitos outros flavonóides, apresentam fraca biodisponibilidade, devido principalmente à baixa solubilidade em água.^{47, 48}

Hesperidina, naringina, hesperetina e naringenina são flavonóides amplamente encontrados em frutas cítricas. A hesperidina, por exemplo, é um dos flavonóides mais abundante, sendo encontrado na casca e nas partes membranosas

da laranja (*Citrus sinensis*), constituindo mais de 40% do peso seco dos frutos imaturos.⁴⁹ Vale ressaltar que o Brasil foi considerado no ano de 2011 o maior produtor de frutas cítricas em todo o mundo, produzindo 115 milhões de toneladas, seguido pela China com 20,68 milhões de toneladas.⁵⁰

1.4.2.2 - Complexos metal-flavonóides

As pesquisas com compostos de coordenação visando aplicabilidade biológica começaram no início de 1900. Desde então, a versatilidade desses compostos fez com que hoje os complexos metálicos possuem papel essencial nas indústrias farmacêuticas, químicas e agrícola.⁵¹

Em 1962 foi obtido o primeiro complexo de flavonóides com alumínio como um íon central. Desde o início dos anos 80, os cientistas têm investigado cerca de 40 complexos do tipo metal-flavonóide,⁵² e foi verificado que o efeito da quelação, na maioria dos casos melhorou a biodisponibilidade e as várias atividades biológicas antes apresentadas pelos flavonóides livres.⁵³

Nos sistemas naturais, têm-se a complexação de antocianinas, uma subclasse de flavonóides, a íons Mg^{2+} , cujas moléculas são de fundamental importância para proteção das plantas contra organismos patogênicos e predadores.⁵⁴

Assim, utilizando-se os sistemas naturais como modelo, estudos têm revelado que a atividade inseticida e antifúngica de outras classes de compostos tais como os pirazóis⁵⁵ e carboxina foram potencializadas quando complexados a íons metálicos. Isto mostra que, o desenvolvimento de compostos de coordenação com aplicação pesticida é uma alternativa para o uso na agricultura.

1.4.3 - Inseticidas sintéticos inorgânicos

Os primeiros inseticidas sintéticos foram de origem inorgânica, provavelmente devido a estes elementos existirem em abundância em minas. Muitos materiais inorgânicos foram usados como inseticidas, incluindo enxofre, cobre, mercúrio, boro, arsênio, antimônio, selênio, etc.²⁹ O “Verde de Paris” o primeiro inseticida sintético que se conhece, é um composto cristalino de acetato e arsenito de cobre, $Cu(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3Cu(AsO_2)_2$,²⁹ mas cuja alta fitotoxicidade limita muito a sua

utilização. Entre os sais de outros elementos, o fluoreto de sódio, altamente tóxico para os insetos, é utilizado principalmente como barreira para insetos rastejantes, como baratas e formigas. O ácido bórico é também largamente utilizado contra baratas, sendo muito efetivo.²⁹

Dentre os compostos de coordenação, Figura 3, destacam-se os ditiocarbamatos metálicos (exemplo: Ferban e Ziram) e os etilenobisditiocarbamatos metálicos (exemplo: mancozeb, metiram e propinebe).

O pesticida Ferban (dimetilditiocarbamato de ferro(II), de fórmula molecular $C_9H_{18}FeN_3S_6$) é usado como protetor foliar na prevenção de manchas de folhas ou doenças que levam as plantas à secura⁵⁴ Lembrando que o Ferban foi um dos primeiros fungicidas da classe dos ditiocarbamatos metálicos a serem comercializados, sendo que o primeiro trabalho de campo com este pesticida foi publicado em 1942.⁵⁴

O Ziram (dimetilditiocarbamato de zinco(II), de fórmula molecular $C_6H_{12}N_2S_4Zn$), possui propriedade antifúngica e previne frutos como laranja, maçã, trigo, pêssigo, damasco e uva à antracnose e sarna.⁵⁶ Foi liberado para uso conforme Portaria da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) de nº 22, de 18 de maio de 1984 e é comercializado no Brasil com o nome de Rodisan SC.

Os complexos fungicidas mancozeb, metiram e propinebe, da classe dos etilenobisditiocarbamatos metálicos, são registrados no Brasil e utilizados até hoje.²¹ O mancozeb, por exemplo, é um etilenobisditiocarbamato de manganês e zinco que contém 20% de Mn e 2,25% de Zn em sua molécula. No comércio é conhecido pelos nomes de Combilan PM, Manzate 800 e Rodomil-Mancozeb BR, sendo um dos fungicidas mais eficientes e amplamente utilizado em diversas plantações como tomate, batata, tabaco, alho, cebola, abóbora, pepino, etc.⁵⁶ Um dos principais mecanismo de ação dos etilenobisditiocarbamatos metálicos envolve a interação do hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo –NH– destes fungicidas com os grupos tiólicos de enzimas e coenzimas, comprometendo os processos vitais do organismo do fungo.

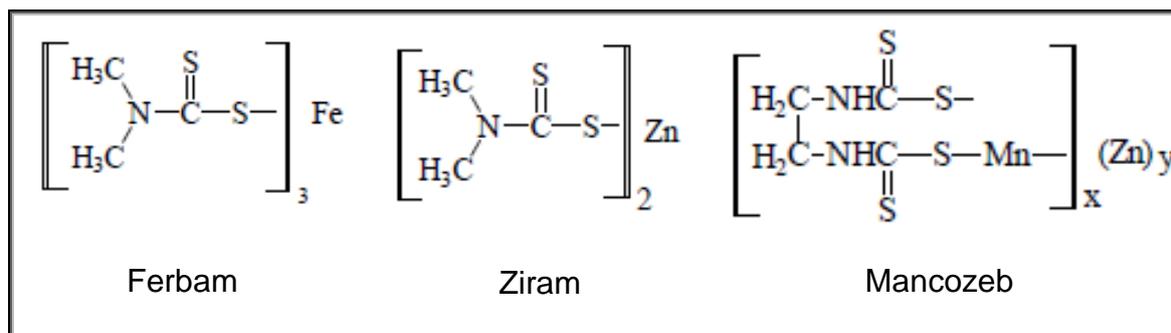


Figura 3: Fórmulas estruturais de pesticidas inorgânicos Ferbam, Ziram e Mancozeb.⁵⁷

1.5 - Os metais nos sistemas biológicos

Vários elementos metálicos são essenciais no meio biológico, já que muitos compostos orgânicos utilizados em sistemas biológicos requerem íons metálicos para a ativação ou a biotransformação a fim de alcançar o seu modo de ação. Por exemplo, a hemoglobina, que se liga e proporciona oxigênio para os tecidos do corpo requer um átomo de ferro para a função. Centros metálicos deficientes em elétrons atraem biomoléculas ricas em elétrons, tais como as proteínas ou o DNA, levando os íons metálicos se ligarem e interagirem com alvos biológicos importantes. Assim, podemos afirmar que a presença de íons metálicos nos sistemas naturais motivam os químicos inorgânicos a investigar o potencial uso de compostos de coordenação em aplicações biológicas.⁵⁸ Uma abordagem com sucessos notáveis e crescente nos últimos anos vem sendo o desenvolvimento de complexos metálicos que incorporam ligantes biologicamente ativos. Tais compostos oferecem a possibilidade de desenvolvimento de moléculas bioativas, cuja atividade frente a um determinado alvo é melhorada pela combinação de uma especificidade do ligante ao interagir com um determinado sítio molecular com as propriedades inerentes ao centro metálico.

1.5.1 - Química e Biologia do Rutênio

O elemento químico Rutênio (Ru) faz parte do grupo 8 de metais de transição posicionado no quinto período da tabela periódica. Possui número atômico 44 e em temperatura ambiente se encontra no estado sólido. Em seu estado fundamental possui configura eletrônica [Kr] 4d⁷ 5s¹. Os seus estados de oxidação

mais comuns são (+II) e (+III), os quais conferem grande versatilidade ao Ru no que se refere à conversão entre as configurações eletrônicas d^6 e d^5 , possibilitando a obtenção de uma grande variedade de compostos penta e hexacoordenados, preferencialmente.⁵⁹ O íon Ru^{2+} apresenta configuração $(t_{2g})^6$ e comporta-se como um íon doador π , conseqüentemente, tem grande afinidade por ligantes de características moles que apresentam orbitais vazios tais como N-heterocíclicos por exemplo.

Compostos de rutênio têm sido bastante estudados devido suas amplas propriedades biológicas.⁶⁰ Rutênio é um metal promissor porque em seus complexos, geralmente, velocidades de troca de ligantes são lentas, as quais são similares às de complexos de Pt^{2+} e comparáveis aos processos de divisão celular.⁶¹ Além disso, apresenta baixa toxicidade, provavelmente devido à sua capacidade de mimetizar o ferro e, conseqüentemente, se ligar a biomoléculas específicas tais como albumina de soro e transferrina, por exemplo.⁶² Outra característica é que os estados de oxidação Ru^{2+} , Ru^{3+} e Ru^{4+} são acessíveis sob condições fisiológicas, onde redutores tais como glutatona e ascorbato são capazes de reduzir Ru^{3+} e Ru^{4+} e, a oxidação de Ru^{2+} é prontamente induzida por oxigênio molecular ou citocromo oxidase.⁶² Além disso, estudos relatados na literatura revelam que complexos do tipo Ru^{2+} -fenantrolina, como $[(Ru(phen)_3)]^{2+}$ por exemplo, interagem eficientemente com a enzima acetilcolinesterase.^{63, 64}

1.5.2 - Química e Biologia do Magnésio

O elemento químico Magnésio (Mg) faz parte do Grupo 2 da Tabela Periódica e, assim, um elemento alcalino-terroso com configuração $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2$. É um elemento muito abundante, sendo comumente encontrado em minerais silicatos e ocorre em grandes depósitos de $CaMg(CO_3)_2$ (dolomite) e $MgKCl_3 \cdot 3H_2O$ (carnalita). O estado de oxidação +II é o mais comum em compostos de magnésio.⁶⁵ Mg^{2+} é um dos íons metálicos mais abundantes na crosta terrestre.⁶⁶ Possui raio iônico de 0,72 Å para o número de coordenação 6, e em soluções⁶⁷ aquosas os cátions Mg^{2+} são coordenados com seis ligantes de maneira octaédrica, $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$.⁶⁸

Devido ao seu pequeno raio iônico e sua bivalência, Mg^{2+} forma complexos estáveis com ânions fosfato e carboxilato e com bases nitrogenadas

(embora sejam menos comuns).⁶⁹ Como exemplo têm-se as clorofilas, que são essenciais para a fotossíntese em todas as plantas verdes, as quais possuem Mg^{2+} coordenado ao nitrogênio nos macrocíclicos derivados da porfina.⁶⁵ Além do mais, os íons Mg^{2+} são essenciais em inúmeras funções celulares e enzimáticas, incluindo canais iônicos, ciclos metabólicos e vias de sinalização. Assim, são indispensáveis em quase todas as funções anabólicos e catabólicos. Diante de tamanha versatilidade, o íon Mg^{2+} se liga a elementos eletronegativos (O,N) do DNA ou RNA e, assim, reduz a densidade de carga negativa localizada, estabilizando a estrutura do DNA.⁷⁰

Estudos também mostram que íons Mg^{2+} interagem com as sequências de nucleotídeos formando complexos $Mg(H_2O)_5(\text{nucleotídeo})$. Também, o complexo $MgATP^{2-}$, conhecido como “combustível da vida”, é um dos mais importantes nos sistema biológicos, pois o seu papel catalítico na hidrólise do ATP em ADP é crucial no metabolismo energético das células. Portanto, a química de coordenação e os mecanismos bioquímicos da ligação do íon Mg^{2+} são de interesse devido a sua importância nos processos biológicos.⁷¹⁻⁷³ Além disso, magnésio e os seus compostos são pouco tóxicos⁷⁴ e por isso possuem muitas aplicações.

1.6 - Modo de Ação

O sistema nervoso é responsável pela maioria das funções de controle em um organismo, coordenando e regulando as atividades corporais. As unidades funcionais deste sistema são os neurônios, os quais comunicam-se através de sinapses, propagando os impulsos nervosos. A enzima Acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), codificado pelo gene *ace*, é uma serina hidrolase e desempenha papel chave na neurotransmissão colinérgica, cuja função principal é a hidrólise eficiente e específica do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas.^{75, 76}

As enzimas colinesterases são encontradas em diversos tecidos e em todos os vertebrados e invertebrados. No sistema nervoso central dos insetos (Figura 4), constituído por cérebro, gânglios subesofágico (constituído de glândulas salivares) e cadeia nervosa ventral (glândulas torácicas e abdominais), as sinapses ocorrem através da ação do neurotransmissor acetilcolina.⁷⁷

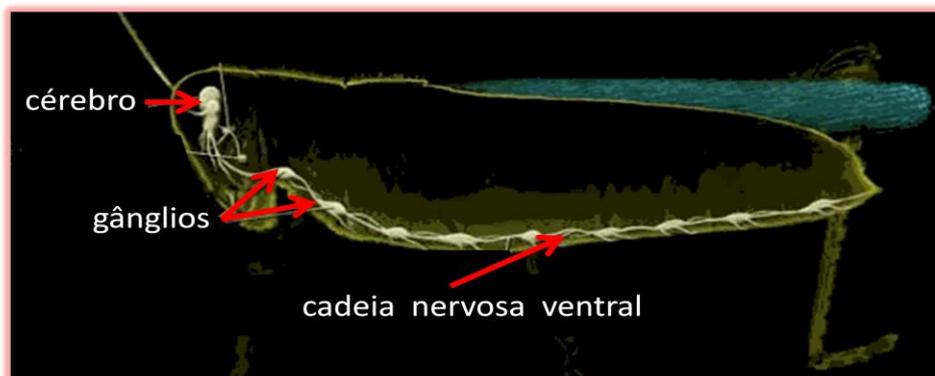


Figura 4: Ilustração do sistema nervoso dos insetos. FONTE: FILGUEIRA.⁷⁷

Porém, a enzima AChE de invertebrados, de modo geral, possui dois genes diferentes,⁷⁸⁻⁸² onde um deles é constituído por um resíduo de cisteína livre (Cys), o qual não é encontrado em mamíferos, aves e peixes.⁸³ No entanto, a maioria dos pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos que atuam no controle de insetos praga agem por inibição da enzima acetilcolinaesterase.⁸⁴ Contudo, a alta toxicidade de muitos desses inseticidas é principalmente por serem potentes inibidores irreversíveis da acetilcolinaesterase, formando uma ligação covalente com um resíduo de serina no sítio ativo.⁸⁵ Assim, a não seletividade desses pesticidas causam sérios danos à saúde humana, e nos motivam a desenvolver inseticidas eficazes e que sejam mais seletivos contra as pragas alvo e mais seguros para o homem e o meio ambiente.

1.7 - Busca de novas estratégias para o controle de formigas cortadeiras

Com o crescente aumento populacional e com a previsão de que a área de cultivo agrícola mundial aumente em até 14% entre 2010 e 2030,⁸⁶ um dos maiores desafios mundiais é, sem dúvida, produzir alimentos suficientes para o sustento da população, mas preservando o meio ambiente.

Também com esta preocupação, neste trabalho busca-se o desenvolvimento de um novo inseticida, aliando as propriedades de produtos naturais com as de íons metálicos. Assim, com base nos estudos da estabilidade térmica destes compostos, bem como suas propriedades físico-químicas (tais como solubilidade e lipofilicidade), ecotoxicidade e citotoxicidade, espera-se conhecer suas habilidades de absorção e toxicidade. Isto é fundamental para estabelecer um compromisso entre produção agrícola e um ambiente saudável.

Capítulo 2

Objetivos

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O objetivo geral desta tese consiste em sintetizar e investigar as propriedades espectroscópicas, físico-químicas e toxicológicas de novos complexos de rutênio(II) e magnésio(II) com ligantes flavonóides biologicamente ativos para aplicação inseticida. Além disso, avaliar o efeito dos complexos de magnésio(II) no sequestro de radicais superóxido.

2.1.1 - Objetivos específicos:

- A. Sintetizar, isolar e caracterizar complexos polipiridínicos de Ru(II) e Mg(II) com os ligantes flavonóides hesperidina, hesperitina, naringina e naringenina usando técnicas tais como IV, UV-Vis, ESI-MS, análise elementar, RMN ^1H e ^{13}C , voltametria cíclica e luminescência;
- B. Avaliar a estabilidade química e fotoquímica dos complexos;
- C. Investigar as propriedades físico-químicas tais como potencial redox, solubilidade e lipofilicidade dos complexos;
- D. Investigar a ação inseticida dos compostos realizando ensaios *in vivo* com formigas *Atta sexdens rubropilosa*;
- E. Investigar os possíveis mecanismos de ação e seletividade dos complexos por estudos de inibição das enzimas acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*, EAcH(*E.e*), e *Atta sexdens rubropilosa*, EAcH(*A.s.r*);
- F. Realizar ensaios de ecotoxicidade dos complexos pelos estudos de inibição da bioluminescência da bactéria aquática *Vibrio fischeri*;
- G. Realizar ensaios de citotoxicidade dos complexos utilizando células HeLa.
- H. Investigar a habilidade dos complexos em atuar como sondas fluorescente em meio celular utilizando células HeLa;
- I. Avaliar a habilidade dos complexos **5** e **7** em sequestrar radicais superóxido (gerado pelo sistema MET/Vit.B2/NBT).

Capítulo 3

Parte Experimental

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Reagentes

Os compostos $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, cloreto de lítio (LiCl), 1,10'-fenantrolina (phen), todos de procedência Aldrich, foram utilizados como reagentes de partida para a síntese do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$. Tal precursor juntamente com os flavonóides hesperidina (hesp), hesperitina (hespt), naringina (ngina) e naringenina (ngnina), todos de procedência Aldrich, foram usados para sintetizar os compostos do tipo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{flavonóide})(\text{phen})_2]^+$, os quais precipitaram na forma iônica, usando-se hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6), de procedência Aldrich. $\text{Mg}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi utilizado na preparação dos complexos do tipo $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{flavonóide})_2(\text{phen})]$ e $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{flavonóide})_2(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2]$. Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) e cloreto de potássio (KCl), ambos de procedência Fluka, foram usados como eletrólito suporte nos experimentos eletroquímicos. Ferroceno ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$, sigla Fc) de procedência Aldrich foi usado como padrão de referência interna nas medidas eletroquímicas. Ácido fosfórico (H_3PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), todos da Aldrich, foram usados no preparo de soluções tampão. Albumina Sérica Bovina (BSA), Trizma hydrochloride, ambos da Aldrich, acetilcolinesterase (ECh) de *Electrophorus electricus*, iodeto de acetiltiocolina e ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), da Fluka, foram utilizados nos ensaios de inibição enzimática. Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) da Aldrich e Células HeLa (obtidas da American Type Culture Collection - ATCC (Rockville, MD, EUA) foram usados nos ensaios de citotoxicidade e de microscopia confocal. Todas as medidas espectroscópicas foram realizados utilizando-se solventes com grau de pureza HPLC e todas as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q. Cloreto de nitroazul tetrazólio (em inglês, *Nitro-blue tetrazolium* (NBT), metionina (MET) e riboflavina (Vit. B_2), todos da Aldrich, foram utilizados nos ensaios de sequestro de radicais superóxido.

3.2 - Preparação dos complexos

O complexo precursor, *cis*-[RuCl₂(phen)₂], foi preparado de acordo com método descrito na literatura para complexos com 2,2'-bipiridina,⁸⁷ conforme descrito a seguir, item 3.2.1. Os complexos 1-4 foram sintetizados, de modo geral, pela adição do precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂]_(s) à solução etanólica (etanol/água 1:1) do respectivo ligante flavonóide, previamente desprotonado, sob atmosfera de nitrogênio.

As sínteses dos complexos 1-4 foram realizadas considerando-se uma relação estequiométrica de 1:1 complexo precursor/flavonoide (L'), de acordo com a Equação geral:



Os complexos 5-8 foram sintetizados pela adição do sal Mg(OAc)₂·4H₂O_(s) seguida do ligante phen_(s) à solução metanólica do respectivo ligante flavonóide. As sínteses foram realizadas considerando-se uma relação estequiométrica de 1:1:2 Mg²⁺/phen/flavonóide, de acordo com a Equação abaixo:



onde: L = 1,10'-fenantrolina e L' = flavonóide (hesperidina, hesperetina, naringina ou naringenina). Cabe ressaltar que as moléculas de água da esfera interna de coordenação dos complexos 6 e 8 foram omitidos na equação 2. Quanto ao complexo 9, o modo de preparo foi similar ao do complexo 5, mas na ausência do ligante fenantrolina.

Os materiais usados na preparação dos complexos são ilustrados na Figura 5.

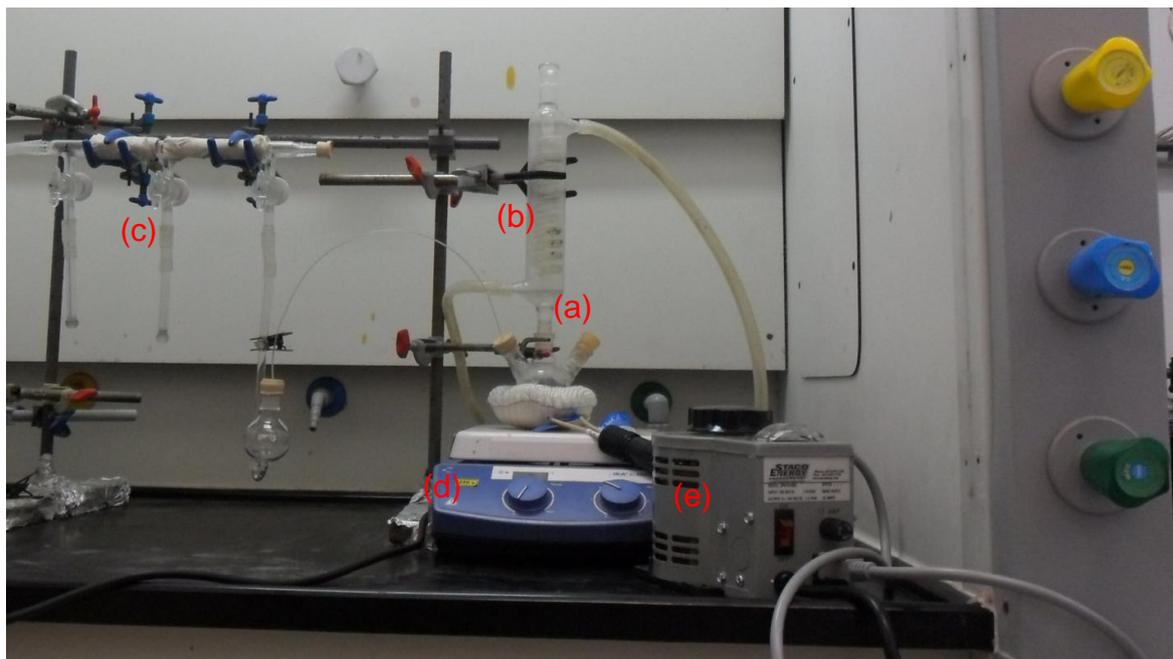


Figura 5: Esquema para a preparação dos complexos **1-9**. Os materiais usados foram um balão de três bocas com capacidade de 50 mL (a) acoplado a um condensador (b), e conectado a uma linha de gás nitrogênio (c), um agitador magnético (d) e controlador de temperatura (e).

3.2.1 - Síntese de *cis*-[RuCl₂(phen)₂] (complexo precursor)

Em um balão de fundo redondo, com duas bocas e capacidade de 50 mL, contendo 10 mL de N,N-dimetilformamida (DMF), previamente desaerado com gás nitrogênio, adicionou-se 200 mg (0,76 mmol) de RuCl₃·3H₂O sob agitação constante e aquecimento. Em seguida, adicionou-se 275,5 mg (1,53 mmol) de 1,10'-fenantrolina e 0,226 mg (5,3 mmol) de LiCl, para garantir a permanência dos íons cloreto ligados ao íon Ru²⁺. A mistura reacional de coloração roxa foi refluxada por oito horas sob atmosfera de gás nitrogênio e agitação constante. Após o sistema reacional ser resfriado, adicionou-se 250 mL de acetona previamente destilada e resfriada em banho de gelo. A mistura resultante foi mantida sob refrigeração a 0 °C por uma noite para a precipitação do composto. O sólido preto obtido foi filtrado e lavado com 50 mL de água destilada, 2 mL de etanol e 2 gotas de éter, respectivamente, previamente resfriados num banho de gelo. O complexo foi seco sob vácuo e armazenado. Rendimento: 43 %. Os resultados obtidos de análise elementar para RuC₂₄N₄H₁₆Cl₂·2H₂O foram os seguintes: Valores encontrados: C, 51.86; H, 3.00; N, 10.43. Valores calculados: C, 51.79; H, 2,80; N, 10.43%.

3.2.2 - Síntese de *cis*-[Ru(hesp)(phen)₂](PF₆) (complexo 1)

Hesperidina (0,17 g; 0,28 mmol) e trietilamina (39 µL; 0,28 mmol) foram dissolvidos em 30 mL de uma mistura 1:1 EtOH/H₂O. O sistema reacional ficou sob atmosfera de N₂ e agitação constante por 10 min e, em seguida, foi adicionado 0,15 g (0,26 mmol) de *cis*-[RuCl₂(phen)₂]. A mistura reacional permaneceu sub refluxo, atmosfera de N₂ e agitação por 8 horas. Após alcançar a temperatura ambiente (~ 22 °C) adicionou-se 0,1 g (0,61 mmol) de NH₄PF₆, previamente dissolvido em etanol:água (1:1) e, a mistura resultante foi mantida sob refrigeração a 0°C por uma noite para a precipitação do composto. O sólido marrom avermelhado obtido foi filtrado e lavado com 20 mL de água destilada, 2 mL etanol e 2 gotas de éter, respectivamente, previamente resfriados num banho de gelo. O composto foi seco sob vácuo e armazenado. Rendimento: 80 %.

3.2.3 - Síntese de *cis*-[Ru(hespt)(phen)₂](PF₆) (complexo 2)

Hesperetina (0,085 g; 0,28 mmol) e trietilamina (39 µL; 0,28 mmol) foram dissolvidos em 30 mL de uma mistura 1:1 EtOH/H₂O. O sistema reacional ficou sob atmosfera de N₂ e agitação constante por 10 min e, em seguida, foi adicionado 0,15 g (0,26 mmol) de *cis*-[RuCl₂(phen)₂]. A mistura reacional permaneceu sub refluxo, atmosfera de N₂ e agitação por 8 horas. Após alcançar a temperatura ambiente (~ 22 °C) adicionou-se 0,1 g (0,61 mmol) de NH₄PF₆, previamente dissolvido em etanol:água (1:1) e, a mistura resultante foi mantida sob refrigeração a 0°C por uma noite para a precipitação do composto. O sólido marrom avermelhado obtido foi filtrado e lavado com 20 mL de água destilada, 2 mL etanol e 2 gotas de éter, respectivamente, previamente resfriados num banho de gelo. O composto foi seco sob vácuo e armazenado. Rendimento: 75 %.

3.2.4 - Síntese de *cis*-[Ru(ngina)(phen)₂](PF₆) (complexo 3)

Naringina (0,1625 g; 0,28 mmol) e trietilamina (39 µL; 0,28 mmol) foram dissolvidos em 30 mL de uma mistura 1:1 EtOH/H₂O. O sistema reacional ficou sob atmosfera de N₂ e agitação constante por 10 min e, em seguida, foi adicionado 0,15 g (0,26 mmol) de *cis*-[RuCl₂(phen)₂]. A mistura reacional permaneceu sub refluxo,

atmosfera de N_2 e agitação por 8 horas. Após alcançar a temperatura ambiente ($\sim 22\text{ }^\circ\text{C}$) adicionou-se 0,1 g (0,61 mmol) de NH_4PF_6 , previamente dissolvido em etanol:água (1:1) e, a mistura resultante foi mantida sob refrigeração a 0°C por uma noite para a precipitação do composto. O sólido marrom avermelhado obtido foi filtrado e lavado com 20 mL de água destilada, 2 mL etanol e 2 gotas de éter, respectivamente, previamente resfriados num banho de gelo. O composto foi seco sob vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 70 %.

3.2.5 - Síntese de *cis*-[Ru(ngnina)(phen)₂](PF₆) (complexo 4)

Naringenina (0,0762 g; 0,28 mmol) e trietilamina (39 μL ; 0,28 mmol) foram dissolvidos em 30 mL de uma mistura 1:1 EtOH/ H_2O . O sistema reacional ficou sob atmosfera de N_2 e agitação constante por 10 min e, em seguida, foi adicionado 0,15 g (0,26 mmol) de *cis*-[RuCl₂(phen)₂]. A mistura reacional permaneceu sub refluxo, atmosfera de N_2 e agitação por 8 horas. Após alcançar a temperatura ambiente ($\sim 22\text{ }^\circ\text{C}$) adicionou-se 0,1 g (0,61 mmol) de NH_4PF_6 , previamente dissolvido em etanol:água (1:1) e, a mistura resultante foi mantida sob refrigeração a 0°C por uma noite para a precipitação do composto. O sólido marrom avermelhado obtido foi filtrado e lavado com 20 mL de água destilada, 2 mL etanol e 2 gotas de éter, respectivamente, previamente resfriados num banho de gelo. O composto foi seco sob vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 78 %.

3.2.6 - Síntese de *cis*-[Mg(hesp)₂(phen)] (complexo 5)

A 40 mL de metanol foi adicionado 0,3052 g (0,5 mmol) de hesperidina e 140 μL (0,5 mmol) de trietilamina. O sistema ficou sob agitação e atmosfera de $N_2(g)$ por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,054 g (0,25 mmol) de $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ e subsequentemente 0,04505 g (0,25 mmol) de 1,10'-fenantrolina. A mistura reacional ficou sob agitação, atmosfera de N_2 e refluxo por mais duas horas. A mistura foi filtrada a aproximadamente $25\text{ }^\circ\text{C}$. A solução remanescente foi rotaevaporada para redução do volume para cerca de 5 mL, à qual foram adicionados 10 mL de água gelada. O precipitado amarelo formado foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada e 10 mL de metanol gelado. O composto foi seco à vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 65 %.

3.2.7 - Síntese de *cis*-[Mg(hespt)₂(phen)(H₂O)₂] (complexo 6)

A 40 mL de uma mistura 1:1 MeOH/H₂O foi adicionado 0,3023 g (1 mmol) de hesperidina e 140 µL (1 mmol) de trietilamina. O sistema ficou sob agitação e atmosfera de N₂(g) por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1072 g (0,5 mmol) de Mg(CH₃COO)₂·4H₂O e subsequentemente 0,90 g (0,5 mmol) de 1,10'-fenantrolina. A mistura reacional ficou sob agitação, atmosfera de N₂ e refluxo por mais quatro horas. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25 °C. A solução remanescente foi rotaevaporada para redução do volume para cerca de 15 mL, havendo imediata precipitação do composto à temperatura ambiente (~ 22 °C). O precipitado amarelo claro foi filtrado e lavado com 30 mL metanol gelado. O composto foi seco a vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 79 %.

3.2.8 - Síntese de *cis*-[Mg(ngina)₂(phen)] (complexo 7)

A 40 mL de metanol foi adicionado 0,581 g (1 mmol) de hesperidina e 140 µL (1 mmol) de trietilamina. O sistema ficou sob agitação e atmosfera de N₂(g) por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1072 g (0,5 mmol) de Mg(CH₃COO)₂·4H₂O e subsequentemente 0,90 g (0,5 mmol) de 1,10'-fenantrolina. A mistura reacional ficou sob agitação, atmosfera de N₂ e refluxo por mais quatro horas. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25 °C. A solução remanescente foi rotaevaporada para redução do volume para cerca de 5 mL, à qual foram adicionados 10 mL de água gelada. O precipitado amarelo foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada e 10 mL de metanol gelado. O composto foi seco a vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 58 %.

3.2.9 - Síntese de *cis*-[Mg(ngnina)₂(phen)(H₂O)₂] (complexo 8)

A 30 mL de uma mistura 1:1 MeOH/H₂O foi adicionado 0,3052 g (0,5 mmol) de hesperidina e 140 µL (1 mmol) de trietilamina. O sistema ficou sob agitação e atmosfera de N₂(g) por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,054 g (0,25 mmol) de Mg(CH₃COO)₂·4H₂O e subsequentemente 0,04505 g (0,25 mmol) de 1,10'-fenantrolina. A mistura reacional ficou sob agitação, atmosfera de N₂ e refluxo por mais duas horas. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25 °C. A solução

remanescente foi rotaevaporada para redução do volume para cerca de 5 mL, à qual foram adicionados 10 mL de água gelada. O precipitado amarelo claro foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada e 10 mL de metanol gelado. O composto foi seco a vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 73 %.

3.2.10 - Síntese de *cis*-[Mg(hesp)₂(H₂O)₂] (complexo 9)

Em 40 mL de metanol foi adicionado 0,3052 g (0,5 mmol) de hesperidina e 140 µL (0,5 mmol) de trietilamina. O sistema ficou sob agitação e atmosfera de N₂(g) por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,054 g (0,25 mmol) de Mg(CH₃COO)₂·4H₂O. A mistura reacional ficou sob agitação, atmosfera de N₂ e refluxo por mais duas horas. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25 °C. A solução remanescente foi rotaevaporada para redução do volume para cerca de 5 mL, à qual foram adicionados 10 mL de água gelada. O precipitado amarelo formado foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada e 10 mL de metanol gelado. O composto foi seco à vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 54 %.

3.3 - Equipamentos e Metodologias

3.3.1 - Equipamentos gerais

- **Evaporador Rotativo** da BUCHI modelo RII.
- **Centrífuga** da FANEM modelo 206-R.
- **Banho termostetizado** da TECNAL, modelo TE 2005.
- **Banho Metabólico Bubnoff** da SOLAB, modelo SL 157.
- **Reatores fotoquímico** montados no laboratório LAFIB, que consistem de um sistema carrossel com 8 lâmpadas cada e irradiação monocromática a 420 nm ou 350 nm.
- **PHmetro** modelo QX 1500 Plus, da Qualwtron. O pHmetro foi previamente calibrado com soluções tampão em pH 4,0, 7,0 e 10,0.
- **Estufa** da FANEM modelo 515.
- **Ultrason** da BRANSON modelo 2510.
- **Purificador de água** da MILLIPORE modelo Mille UNI.
- **Balança analítica** da SARTORIUS modelo CP 225D.

3.3.2 - Atmosfera inerte

As sínteses e todos os estudos eletroquímicos e de absorção UV-Vis foram realizados sob atmosfera de $N_2(g)$ (com pureza de 99,99%).

3.3.3 - Análise elementar

A análise elementar dos complexos, para a determinação das porcentagens (%) dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio (C,H,N), foi obtida em um equipamento modelo EA 1108 da FISON, NA Central Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.4 - Espectrometria de massas com ionização por Electrospray (ESI-MS)

Os espectros de massas foram obtidos usando modo de ionização positiva por electrospray (ESI+), usando $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos complexos 1-4 em metanol com um fluxo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$, em um espectrômetro AB Sciex, modelo PPI 2000™ do Laboratório de Bioquímica Molecular de Microorganismos (LABIOMMI)-DQ-UFSCar.

3.3.5 - Espectrometria de absorção atômica de chama

As concentrações de magnésio em amostras do complexo 5 em solução aquosa foram determinadas utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica de chama (AA240FS; Varian, Mulgrave, Australia) equipado com lâmpada de catodo oco de magnésio para as determinações deste elemento, operando em comprimento de onda 285,2 nm. A chama foi produzida por fluxos de ar e acetileno com vazões iguais a 13,5 e 2,0 L min^{-1} . A solução para curva padrão do magnésio foi o nitrato de magnésio em ácido nítrico a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck®), nas concentrações de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0 $\mu\text{g Mg/mL}$. As amostras foram previamente digeridas com ácido nítrico (HNO_3) e diluídas com água deionizada, de modo que a concentração final estipulada para o metal ficasse dentro da faixa de detecção da curva de calibração.

3.3.6 - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

A quantificação de rutênio e magnésio em amostras dos complexos **1**, **5-8**, nos experimentos para determinação de $\log P$ (procedimento descrito no item 3.3.15.2), foram realizadas no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM, UFSCar, São Carlos, SP) utilizando ICP-OES (modelo VISTA, da Varian).

Na etapa de preparo das amostras dos complexos, para posterior quantificação do elemento Ru ou Mg no ICP-OES, foi utilizada a técnica de decomposição de materiais orgânicos por via úmida usando os ácidos nítrico (HNO_3) e perclórico (HClO_4), descrita na literatura.⁸⁸

Para a quantificação do elemento Ru ou Mg contido nas amostras adotou-se o método de calibração por padrão. Assim, soluções com concentrações conhecidas do analito (Ru ou Mg) preparadas a partir de uma solução de referência (metal Rutênio ou Magnésio, concentração 1000 ppm) foram injetadas para obtenção de uma curva padrão. Estas soluções foram preparadas em cinco concentrações diferentes de metal (0, 1,5, 3,0, 4,5 e 6 ppm), em cuja faixa foi esperada ser encontrada a concentração do metal Ru ou Mg nas frações orgânica (1-octanol) e aquosa (água) do experimento *shake flask* (descrito no item 3.3.15.2).

3.3.7 - Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) utilizando-se um espectrofotômetro de feixe duplo UV-Vis-HP KAIK XA (HP Hewlett Packard 8453). Utilizou-se celas de quartzo de caminho óptico de 10,0 e 2,0 mm e 4,0 e 0,7 mL de capacidade, respectivamente.

3.3.8 - Luminescência no estado estacionário

Os espectros de emissão foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Shimadzu Modelo RF-5301PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

3.3.9 - Tempo de vida de luminescência

O método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (em inglês, *Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC) foi usado para determinar o tempo de vida de luminescência. Os experimentos foram realizados no laboratório do Grupo de Fotobiofísica da FFCLRP – USP, usando-se como fonte de excitação um laser pulsado *Tsunami 3950* (*Spectra Physics*) de titânio-safira (*Ti:sapphire*) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*), de Nd:YVO₄, que tem saída com potência máxima de 10 W no comprimento de onda 350 nm.

O *Tsunami* possui cristal dobrador de triborato de lítio (LBO), e a frequência é ajustada por um Pulse Picker 3986 (*Spectra Physics*). A saída do laser ocorre entre 855 e 900 nm. O comprimento de onda do feixe de excitação pode ser ajustado com o auxílio de geradores de harmônicos, (*Flexible Harmonic Generator*, *FHG*, da *Spectra Physics*), que dobram ou triplicam a frequência originada no *Tsunami*. O pulso de excitação é direcionado para o espectrômetro *Edinburgh FL900* com configuração em formato-L. O comprimento de onda de emissão é selecionado por um monocromador e os fótons emitidos são detectados por uma fotomultiplicadora refrigerada (placa micro-canais *Hamamatsu C4878*) e são correlacionados temporalmente com os pulsos de excitação por meio do conversor tempo-amplitude (TAC). A largura à meia altura da função de resposta do instrumento é tipicamente 0,12 ns. O *software F900* fornecido pela *Edinburgh Instruments* foi utilizado para ajuste dos dados experimentais de decaimento a funções multiexponenciais, baseado no método de ajustes de funções não lineares por mínimos quadrados. A qualidade do ajuste realizado pelo *software* foi avaliada pela observação dos gráficos dos resíduos e o parâmetro estatístico X^2 (*chi-square*) reduzido.

3.3.10 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no estado sólido utilizando-se um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB102 na região compreendida entre 4000 e 300 cm⁻¹. As amostras no estado sólido foram diluídas em Csl, mantido em estufa a 120 °C, na proporção 1/100 (amostra/Csl).

3.3.11 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz pertencente ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.12 - Cálculos computacionais

O método teórico DFT (Teoria do Funcional de Densidade) foi utilizado para analisar a estrutura eletrônica do complexo **5**.⁸⁹ A geometria do complexo foi otimizada pelo programa Gaussian 09,⁹⁰ em que o cálculo da geometria do composto foi desenvolvida primeiramente no vácuo em nível de teoria DFT utilizando-se o funcional híbrido B3LYP⁹¹ com o conjunto de base LanL2DZ.⁹² Feito isso, realizou-se cálculos levando-se em consideração o efeito dos solventes metanol e água, utilizando-se o modelo de polarização contínua, cujo efeito de polarização é representado numericamente e computado por uma integração numérica. Assim, tal estrutura otimizada foi utilizada nos estudos de estado excitado. As energias das transições eletrônicas foram obtidas pelo método TD-DFT (dependente do tempo).

3.3.13 – Eletroquímica

As medidas eletroquímicas (voltametria cíclica) para os complexos de rutênio foram realizadas utilizando-se o potenciostato/galvanostato μ AutoLab Tipo III, usando cela eletroquímica de vidro, com capacidade para 10 mL, consistindo de três eletrodos: o eletrodo de referência foi Ag/AgCl, armazenado em solução 3,0 mol L⁻¹ de KCl (solução saturada) e os eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de discos de platina (Pt) de 1,5 mm e 4 mm de diâmetro, respectivamente. A concentração dos compostos foi de 10⁻³ mol L⁻¹ em DMF, com 0,1 mol L⁻¹ de PTBA como eletrólito suporte. Ferroceno (Fc) foi usado como padrão interno de referência. Todas as soluções foram previamente desaeradas com gás nitrogênio.

Os voltamogramas cíclicos dos complexos de magnésio foram medidos em um potenciostato/galvanostato portátil modelo μ STAT 400, usando-se um sistema

de três eletrodos. O eletrodo de trabalho foi carbono vítreo com diâmetro de 4 mm, e os eletrodos de referência e auxiliar foram constituídos de prata. As medidas foram feitas à temperatura ambiente (~20 °C) em água e em tampão fosfato (0,065 mM, pH 7,8 e 10,0) contendo 0,1 M de KCl como eletrólito suporte.

3.3.14 - Avaliação da estabilidade

3.3.14.1 - Estabilidade fotoquímica (efeito da luz)

A estabilidade fotoquímica dos complexos foi investigada em irradiação monocromática a 420 nm ou 350 nm, e sob a irradiação solar por 30 dias.

Nas investigações sob irradiação monocromática utilizou-se dois reatores fotoquímicos montados em nosso laboratório. Estes reatores consistem de um sistema carrossel com 8 lâmpadas cada, sendo um no comprimento de onda de 420 nm (usado para o complexo **1**, já que este composto apresenta absorção próxima dessa região) e o outro em 350 nm (usado para o complexo **5**, já que este composto absorve luz em comprimentos de onda próximos dessa região). As soluções aquosas foram irradiadas durante períodos de tempo definidos e o progresso da fotorreação foi monitorada por espectroscopia UV-Vis. As soluções dos complexos foram preparadas na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A intensidade de luz irradiada foi medida por actinometria usando-se Ferrioxalato de potássio, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$,⁹³ um actinômetro bastante sensível na faixa de comprimento de onda de 253-577 nm. O actinômetro foi preparado de acordo com Calvert e Pitts.⁹⁴ Para a determinação da intensidade de luz na irradiação no comprimento de 420 nm, previamente preparou-se uma solução de $0,006 \text{ mol L}^{-1}$ do actinômetro ferrioxalato de potássio e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. Pipetou-se 3 mL da solução do actinômetro com a concentração adequada para o comprimento de onda de irradiação e a solução foi irradiada em uma cela de 1 cm de caminho ótico por 3 min. Uma alíquota de 2 mL da solução irradiada foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL contendo 2,5 mL de tampão acetato (obtido pela mistura de 600 mL de uma solução 1 mol L^{-1} de NaCH_3COO e 360 mL de uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , e essa mistura foi diluída para o volume final de um litro), e 1 mL de uma solução 0,1 % de 1,10'-fenantrolina. A solução foi diluída para 10 mL com água destilada. Preparou-se um branco seguindo o mesmo procedimento, exceto que

a solução de actinômetro não foi adicionada. As duas soluções foram mantidas no escuro por uma hora e após esse tempo foram medidas as suas respectivas absorvâncias no comprimento de onda de 510 nm.

A intensidade da luz incidente (I_i) foi calculada pela Equação 3:

$$I_i = (V_1 \times V_3 \times \Delta A) / (\phi_{Fe^{2+}} \times t \times V_2 \times l \times \epsilon_{Fe^{2+}} \times f) \quad (3)$$

onde:

V_1 = volume da solução de actinômetro irradiada (mL);

V_2 = volume da alíquota de solução de actinômetro irradiada para análise (mL);

V_3 = volume final no qual V_2 foi diluído (mL);

ΔA = diferença da absorvância em 510 nm entre a solução irradiada e a não irradiada;

$\phi_{Fe^{2+}}$ = rendimento quântico de formação de Fe^{2+} no comprimento de onda da luz irradiada (1,11);

t = tempo de irradiação da solução do actinômetro (s);

l = caminho ótico da cela fotolisada usada (cm);

$\epsilon_{Fe^{2+}}$ = coeficiente de extinção molar do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ a 510 nm ($1,11 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$);

I_i = intensidade da luz incidente (Einstein s^{-1}).

O valor encontrado para a intensidade das lâmpadas usadas nos experimentos de fotólise contínua em solução aquosa para os complexos **1** e **5** foram $1,0 \times 10^{-7}$ e $1,2 \times 10^{-7}$ Einstein s^{-1} , respectivamente.

A estabilidade dos complexos também foi avaliada com a irradiação solar, onde os frascos de vidro transparente tampados, contendo as soluções dos complexos, foram expostos à luz do sol durante 30 dias. Alíquotas dessas soluções foram retiradas em tempos regulares e os experimentos foram acompanhados por espectroscopia UV-Vis.

3.3.14.2 - Estabilidade química (efeito do pH)

A estabilidade dos complexos **1** e **5** em solução tampão na faixa de pH 3,09 - 9,11, com força iônica de 0,1 M (KCl), foi avaliada. Para isso, soluções tampão do complexo **1** e **5** ($2,0 \times 10^{-5}$ M) foram preparadas e mantidas no escuro

por 30 dias. Após decorrido esse tempo, os espectros eletrônicos foram registradas em um espectrofotômetro no UV-Vis na faixa de 250-800 nm.

No caso dos complexos apresentarem alterações em seus espectros eletrônicos em resposta a um eventual equilíbrio de protonação/desprotonação de espécies na faixa de pH estuda, então, uma curva de absorção (em $\lambda_{\text{máx}}$) do complexo em função do pH da solução foi construída pela equação modificada de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pKa} = \text{pH} - \log [(A_i - A_{\text{prot.}}) / (A_{\text{dep.}} - A_i)] \quad (4)$$

onde $A_{\text{prot.}}$ é a absorvância da forma protonada, $A_{\text{dep.}}$ é a absorvância da forma desprotonada, e A_i é a absorvância total da mistura (forma protonada e desprotonada) em um determinado pH.

O programa de computador ORIGEM 7.5⁹⁵ foi usado e o ponto de inflexão da curva sigmoidal dá o valor de pKa (o logaritmo negativo da constante de dissociação ácida, Ka), o qual corresponde ao pH em que metade das espécies em solução estão dissociadas.

3.3.15 - Avaliação da Solubilidade e Lipofilicidade

A solubilidade (ou coeficiente de solubilidade) é quantitativamente definida como a concentração máxima que uma determinada substância pode dissolver-se em um dado solvente em uma dada temperatura. Já a lipofilicidade de uma substância é definida através de seu coeficiente de partição, $\log P$, o qual é um parâmetro físico-químico que é utilizado para estimar a tendência que um determinado composto tem em interagir com membranas biológicas (parte lipofílica) ou permanecer na fase aquosa (parte hidrofílica). Geralmente, o sistema imiscível octanol/água é usado para mimetizar a interface membrana/água já que a partição água/octanol representa uma boa aproximação do particionamento entre o citosol e as membranas lipídicas de sistemas vivos. Assim, o valor de $\log P$ é definido como o log da razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa, em um sistema em equilíbrio.⁹⁶ O método *shake flask*,⁹⁷ foi usado para determinação da solubilidade e $\log P$ por ser um método convencional simples e válido em uma ampla faixa de valores ($-4 < \log P < 4$).

3.3.15.1 - Solubilidade

A solubilidade da hesperidina livre e dos complexos **1** e **5-9** em água pura e do complexo **5** em solução tampão Tris/HCl em pH 3,09-9,05 foi determinado a $37,0 \pm 0,5$ °C pelo método *shake flask*.⁹⁷ Estes experimentos foram realizadas por adição de excesso dos complexos, individualmente, a 2 mL de água ou solução tampão até a saturação. As suspensões foram agitadas durante 24 horas a 50 rpm até que o equilíbrio fosse atingido. As amostras foram centrifugadas durante 8 minutos em uma centrífuga FANEM 206-R a 220 rpm. A concentração do complexo no filtrado foi determinada em um espectrofotômetro no UV-Visível.

3.3.15.2 - Determinação de log P

O valor de log *P* foi determinado através do método *shake flask*⁹⁷ utilizando-se octanol como fase orgânica e água como fase aquosa. Os complexos (100 ppm) e a hesperidina foram adicionados, individualmente, à mistura de 1 mL de n-octanol e 1 mL de água, que permaneceu sob agitação durante 24 horas a 50 rpm. Depois, as amostras foram centrifugadas durante 8 min a 220 rpm. As duas fases foram separadas e a concentração dos complexos foram determinada nas fases orgânica e aquosa por ICP-OES (Varian VISTA). Os experimentos foram realizados em duplicata. O valor de Log *P* foi calculado através da Equação 5:

$$\text{Log } P = \log (C_o / C_a) \quad (5)$$

onde, *C_o* e *C_a* são as concentrações molares do complexo na fase orgânica e na fase aquosa, respectivamente.

Já a concentração do flavonóide hesperidina foi determinada por espectroscopia UV-Vis. Assim, para determinação do valor de log *P*, os valores dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) em n-octanol e água foram previamente obtidos através do gráfico de Absorbância vs. as concentrações conhecidas da hesperidina, usando-se a Lei de Beer, Equação 6.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (6)$$

onde, **A** é absorvância, **c** é a concentração (em mol L⁻¹) do composto e **b** é o caminho óptico da cubeta (em cm), **b**.

3.3.16 - Atividade inseticida: ensaios *in vivo* com as formigas cortadeiras

3.3.16.1 - Coleção de insetos

As formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* foram coletadas aleatoriamente em formigueiros de laboratório.⁹⁸ Elas tinham uma massa corporal de 20-25 mg. Os formigueiros eram abastecidos diariamente com folhas de *Eucalyptus sp.*, sementes de aveia e, ocasionalmente, com folhas de outras plantas, tais como *Hibiscus sp.*, *Ligustrum sp.* ou pétalas de rosa. Para cada concentração testada, cinquenta formigas operárias foram removidas dos formigueiros e colocadas em cinco placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro (dez formigas cada). As placas foram colocadas em estufa para B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio, do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*) com temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade relativa variando entre 70 - 80%.

3.3.16.2 - Bioensaios

Durante os ensaios, as formigas foram mantidas em dieta artificial preparada com 1,25 g de glicose, 0,25 g de peptona bacteriológica, 0,025 g de extrato de levedura e 0,25 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 25 mL de água destilada.⁹⁹ Os complexos **1-8**, seus respectivos flavonóides livres (hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina), fenantrolina livre e o inseticida comercial sulfluramida foram adicionados, individualmente, à dieta imediatamente após ter sido autoclavada. O teor dos compostos na dieta foi de 0,2 %. A dieta (0,4 – 0,5 g por frasco), com os compostos teste ou sem (controle) foram oferecidas diariamente em uma pequena tampa de plástico. As formigas foram examinadas diariamente, para anotação do número de formigas mortas e retirada das mesmas, durante um período de 25 dias. Através dos dados obtidos os valores de sobrevivência mediana de 50% (S₅₀) foram calculados e comparados através do teste não paramétrico “*log-rank*”, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Graph-Pad™, aplicativo Prisma 3.0.¹⁰⁰

3.3.17 - Modo de ação: estudo de inibição da enzima acetilcolinesterase

A eficiência catalítica de uma determinada enzima pode ser inibida por compostos que, quando presentes no meio, ligam-se à enzima, impedindo sua ação.

A velocidade inicial (V_0) de uma reação pode ser relacionada com a concentração do substrato, tal como representado pela equação de Michaelis-Menten (Equação 7) e pela curva hiperbólica da Figura 6.¹⁰¹

$$V_0 = (V_{\text{máx}} \cdot [S]) / (K_m + [S]) \quad (7)$$

onde, V_0 é a velocidade inicial da reação, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

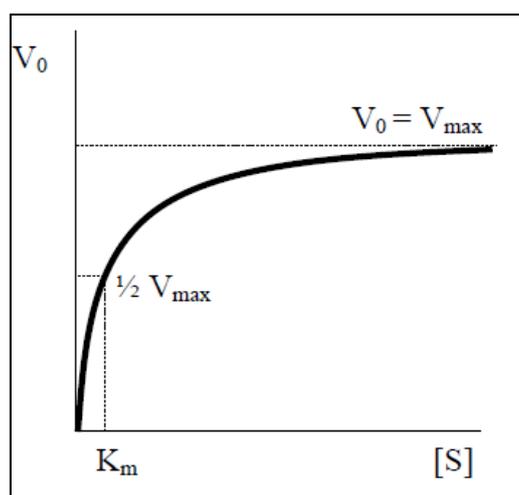


Figura 6: Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten.

K_m é definido como a concentração do substrato em que V_0 é metade de $V_{\text{máx}}$. Assim, um baixo valor de K_m corresponde a uma maior afinidade da enzima pelo substrato, já que uma menor concentração do substrato é necessária para se obter o mesmo valor de V_0 .

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada na equação de Lineweaver-Burk (Equação 8), sendo que o respectivo gráfico de $1/V$ vs. $1/S$ representado na Figura 7 nos permite determinar os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ de uma determinada reação enzimática.

$$1/V = [(K_m/V_{\max})(1/[S]) + (1/V_{\max})] \quad (8)$$

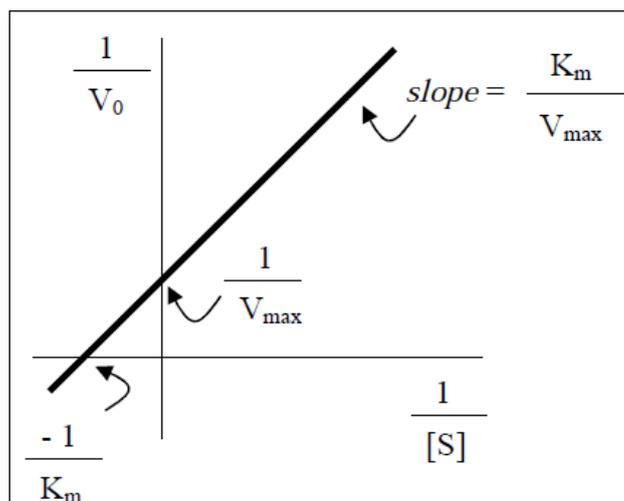


Figura 7: Representação da cinética enzimática de acordo com a equação 8 através do gráfico de Lineweaver-Burk ou de duplos inversos.

3.3.17.1 - Ensaios com a enzima Acetilcolinesterase ECh(E.e.)

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*, ECh(E.e.), foi realizada visando conhecer um dos possíveis mecanismos de ação dos compostos **1** e **5**. Para fins de comparação também foram ensaiados os ligantes livres fenantrolina e hesperidina e complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂]. Os ensaios foram realizados à 25 °C e medidos espectroscopicamente, de acordo com o método de Ellman modificado.¹⁰² A atividade da enzima foi medida pela reação da tiocolina (o produto de hidrólise da ação da ECh sobre o substrato acetiltiocolina) com DTNB, a qual produz o ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (íon TNB) medido em 412 nm. A mistura reacional possui um volume final de 3 mL contendo 50 mM Tris/HCl (solução tampão, pH 8.0), 0,025 unidades de acetilcolinesterase de *E. electricus*, 0,10 mM de iodeto de acetiltiocolina e 333 μM de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB). Curvas de inibição foram realizadas em triplicata com incubação de pelo menos 4 concentrações do complexo por 15 min. Triplicatas de amostras sem o complexo também foram realizadas paralelamente aos ensaios para assegurar um rendimento de 100% da atividade da ECh. Devido à baixa solubilidade de algumas amostras em água (em especial as flavanonas livres estudadas neste trabalho), as mesmas foram solubilizadas em metanol em concentrações cerca de 150 μM. O teor final de metanol no meio

reacional foi 0,83% e as constantes cinéticas da enzima são as mesmas que na água.¹⁰³

3.3.17.1.1 - Determinação da velocidade da reação enzimática

Os dados obtidos graficamente (Absorbância vs. Tempo), Figura 8, foram tratados em termos de velocidade de reação, determinado pelo quociente da variação da absorbância pelo tempo, que então é dividido pelo coeficiente de absorvidade molar do íon TNB, Equação 9.¹⁰² Lembrando que, tomou-se os devidos cuidados para que o intervalo de tempo selecionado mantivesse a relação com melhor linearidade possível, uma vez que, a não linearidade pode mascarar efeitos que não são considerados no cálculo da velocidade de reação.

$$V \text{ (mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}) = [(\Delta \text{Absorbância} / t \text{ (s)}) / (1,36 \times 10^4)] \quad (9)$$

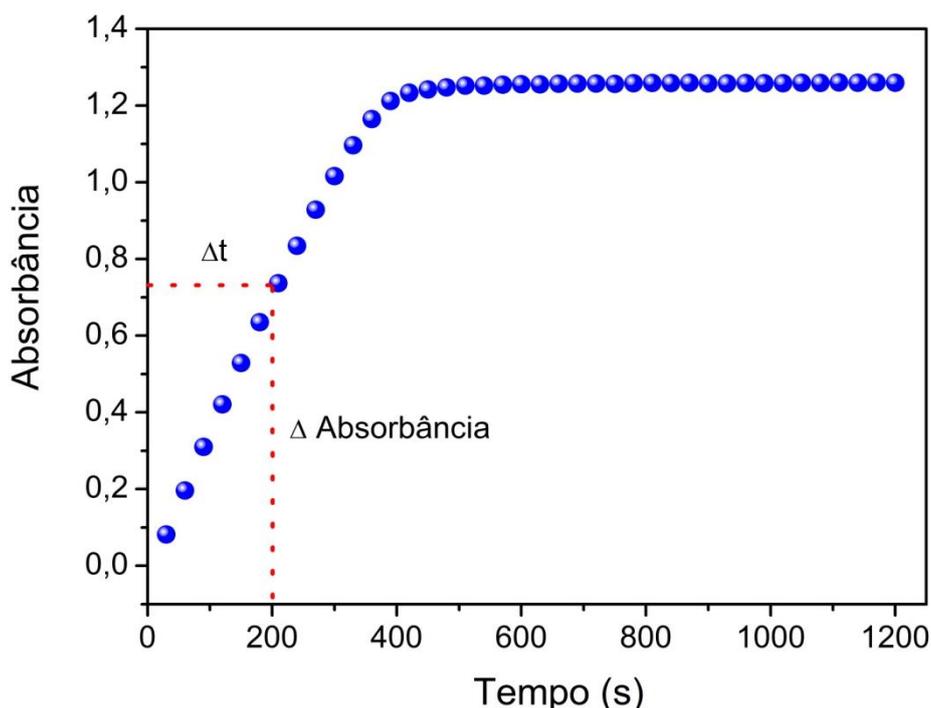


Figura 8: Representação da curva cinética de Absorbância (em 412 nm) vs. Tempo (s) para o acompanhamento reacional da formação do íon TNB.

3.3.17.1.2 - Determinação da porcentagem de atividade da enzima

A porcentagem de atividade da enzima foi calculada através da expressão:

$$[(A - B) / (C - B)] \times 100\% \quad (10)$$

onde A = absorvância em 412 nm do ensaio contendo os compostos testes (ligantes livres ou complexos, individualmete); B = absorvância do controle negativo ("branco") e C = absorvância do controle positivo (ensaio na ausência dos compostos teste).

3.3.17.1.3 - Determinação do tipo de inibição da EAC_h

Para saber o tipo de inibição da enzima pelo complexo **1**, estudos cinéticos foram realizados da seguinte maneira: a velocidade de hidrólise do substrato pela AChE foi medida à 25 °C por 5 min, usando sete concentrações de substrato (50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 μM) na presença ou ausência de três concentrações do complexo **1** (0,0, 50,0 e 100,0 μM). Os dados foram plotados pelo método de Lineweaver–Burk para revelar o mecanismo de inibição. Gráficos de 1/v vs. a concentração do inibidor dá o valor estimado de *K_i*, a constante de dissociação da ligação EAC_h-inibidor.¹⁰⁴

3.3.17.1.4 - Determinação do valor de IC₅₀

A velocidade de hidrólise do substrato acetilcolina pela enzima EAC_h foi medida a 25 °C durante 5 min, usando sete concentrações do complexo **1** (0, 15, 25, 35, 50, 75 e 100 μM) e 100,0 μM do substrato. A representação gráfica da actividade da EAC_h vs. concentração do complexo **1** dá uma estimativa do valor de IC₅₀, a concentração que inibe a actividade da enzima EAC_h em 50%.

3.3.17.2 - Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase EAC_h(A.s.r.)

3.3.17.2.1 - Obtenção do extrato de formigas contendo EAC_h

A cada duas formigas operárias *Atta sexdens rubropilosa*, mantidas em ninhos de laboratório, foram maceradas e homogeneizadas em 40 μL de tampão Tris/HCl (50 mM, pH 8,0), usando almofariz e pilão. Os extratos foram centrifugados à 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi centrifugado mais uma vez

para remover traços de partículas. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios realizados no mesmo dia.

A determinação da porcentagem de atividade da enzima EAcH de *Atta sexdens rubropilosa* foi similar ao descrito acima para a enzima EAcH de *E. Electrus*, apenas com as modificações: a concentração do substrato foi de 300 μM e adição de 5 μL de extrato de formigas contendo a enzima. A porcentagem de atividade da enzima foi calculada através da expressão 10.

3.3.18 - Ensaios de Ecotoxicidade (testes de toxicidade aguda)

A toxicidade aguda corresponde a uma resposta dos organismos aquáticos a um estímulo, que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas.¹⁰⁵ Por isso, esse teste é largamente usado nas primeiras avaliações realizadas com compostos tóxicos. Através desse teste pode-se determinar a concentração letal média (CL_{50}), definida como a concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade na população de organismos submetidos ao teste, ou quando se observa o efeito do agente tóxico sobre as funções vitais ou funcionais dos organismos teste, utiliza-se o índice de toxicidade CE, que corresponde à concentração ou dose efetiva que causa efeito em 20% (CE_{20}) ou 50% (CE_{50}) dos organismos testados.¹⁰⁵

A bactéria bioluminescente *V. fischeri* (Sistema Microtox[®]) é muito utilizada em estudos ecotoxicológicos. Bioensaios realizados com tal bactéria mostram-se bastante eficientes em comparação a outros organismos testes como peixes e outros organismos aquáticos, inclusive da água doce, devido à rapidez de obtenção de resultados e reprodutibilidade.¹⁰⁶

O método de determinação da inibição da luminescência emitida pela bactéria *Vibrio fischeri* encontra-se descrito nas Normas ABNT NBR 15411-2 (2006), ASTM D 5660-96, DIN 38 412-34 e AFNOR T90-320.

3.3.18.1 - Bioensaios com *V. fischeri* (Sistema Microtox[®])

Os testes de ecotoxicidade foram realizados no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Departamento de Química, da UFSCar.

A ecotoxicidade dos complexos **1** e **5** foi avaliada através do teste Microtox. As bactérias que estavam inicialmente liofilizadas, foram ativadas por uma solução de reconstituição para ajustamento da pressão osmótica com salinidade 2%, usando uma solução concentrada contendo 22% de NaCl em água desionizada. A análise de emissão de luz das bactérias obtido por seu contato direto com o complexo **1** ou com o complexo **5** foi realizada em um Microtox Model 500 Analyzer (Azur Environmental, Newark, DE, USA) após um período de tempo de exposição de 15 min. Os dados foram analisados por regressão linear padrão. Os valores de EC_{20} (concentração do complexo que causou a inibição de 20% da bioluminescência da bactéria, expressa em $mg\ L^{-1}$) dos complexos **1** e **5** foram determinados. Para fins de comparação e validação do bom funcionamento das bactérias, também foram realizados experimentos com o padrão ecotoxicológico $ZnSO_4$ ($EC_{20} = 0,32$).¹⁰⁷

3.3.19 - Ensaio de citotoxicidade em células humanas

3.3.19.1 - Cultura das células

As células HeLa foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. As culturas foram mantidas à 37 °C em uma incubadora húmida contendo 5% de CO_2 . Para separar as células do frasco utilizou-se solução de tripsina/EDTA.

3.3.19.2 - Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos complexos **1**, **5** e **7** frente às células cultivadas de carcinoma cervical humano (HeLa) foi avaliada através do ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Este ensaio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células vivas em clivar os anéis tetrazólio do MTT, formando cristais de formazan de cor violeta, o qual pode ser medido espectrofotometricamente.¹⁰⁸ O número de células viáveis é estimado a partir da quantidade do produto formazan formado.

As células HeLa foram distribuídas em placas de 24 orifícios na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/orifício, contendo o meio de cultura DMEM sem soro

fetal bovino, e incubadas a 37 °C sob uma atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h. O complexo **1**, **5** e **7**, individualmente, foi então adicionado aos poços com concentrações que variam de 0-1000 µM dissolvido em 1% de DMSO e diluído com o meio de cultura das células. Em seguida, as células foram colocadas em uma incubadora de CO₂ onde permaneceram por 3 h a 37 °C. Os poços contendo o meio de crescimento sem células foram utilizados como controle (o branco). Após a incubação, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com PBS e 50 µL de solução de MTT (1,2 mg mL⁻¹ em tampão fosfato salino) foi adicionado em cada poço. A incubação continuou durante mais 48 h, a 37 °C sob uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, 500 µL de DMSO foi adicionado aos poços para dissolver os cristais de formazan formados pelas células vivas. A viabilidade celular foi determinada pelo valor da leitura de densidade óptica (absorbância dos poços) em um leitor de microplacas a 560 nm, para as diferentes concentrações dos complexos **1**, **5** e **7**. Para verificar o efeito do solvente DMSO, controles adicionais receberam 1% deste solvente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram apresentados como média ± desvio padrão. A partir destes dados determinou-se a concentração dos complexos **1**, **5** e **7** que inibe em 50% o crescimento celular (IC₅₀).

A viabilidade celular foi calculada através da seguinte expressão:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (O_D \text{ teste} / O_D \text{ controle}) \times 100 \quad (11)$$

onde, O_D teste = densidade óptica do composto testado e O_D controle = densidade óptica do controle.

3.2.19.3 - Microscopia confocal

A imagem fluorescente obtida por microscopia confocal é um sistema não-invasivo e é uma das técnicas disponíveis mais poderosas para se investigar a absorção celular de biomoléculas e as suas interações com componentes celulares.

Para obtenção das imagens confocal, as células foram semeadas em placas individuais contendo lamelas de vidro (1 × 10⁴ células por poço). Dezoito horas depois, as células foram expostas aos complexos **5** e **7**, individualmente, em concentração 5 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ em meio de cultura DMEM, sem vermelho de fenol, e

1% de FCS) durante 4 horas. Após lavagem com PBS, as lamelas foram montadas em lâminas para as medições. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio confocal (Zeiss LSM510) com um comprimento de onda de excitação em 370 nm. A intensidade de emissão foi medida entre 400 e 600 nm.

3.2.20 - Avaliação da atividade sequestradora de radicais superóxido

Os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foram gerados pelo sistema MET/VitB₂/NBT,¹¹¹ onde a metionina (MET) e a VitB₂ (vitamina B2) produzem os radicais superóxido e o nitroazul tetrazólio (NBT) é o indicador. A atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ pela hesperidina e naringina livres e os complexos **5** e **7** foram avaliadas através de medidas de absorvância em $\lambda_{m\acute{a}x} = 560$ nm, do azul de formazano, o qual corresponde ao ao produto da redução, quantitativa, de NBT por $O_2^{\bullet-}$. As soluções de MET, VitB₂ e NBT foram preparadas em tampão fosfato 0,067 M (pH 7,4) ao abrigo da luz. Os compostos testados, hesperidina, naringina e os complexos **5** e **7**, foram dissolvidos em DMF. Neste experimento, o radical superóxido foi gerada em 3 mL de tampão de fosfato (0,067 M, pH 7,4) contendo MET (0,01 mol L⁻¹), NBT ($4,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), VitB₂ ($3,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e os compostos testados, individualmente, em diferentes concentrações (1,51-130 μ M).

Após incubação a 30 °C durante 10 min e irradiação com uma lâmpada fluorescente por 3 min, a absorvância (A_i) das amostras foi medida em 560 nm em um espectrofotômetro. A amostra sem o composto testado e guardada ao abrigo da luz foi usada como controle. A porcentagem de inibição de $O_2^{\bullet-}$ foi calculada a partir da seguinte expressão:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\% \quad (12)$$

onde A_i é a absorvância na presença do composto testado, A_0 é a absorvância na ausência do composto testado.

Os valores de IC₅₀ (concentração do composto teste que inibe em 50% a formação de $O_2^{\bullet-}$) foram calculados a partir de curvas de regressão em que: o eixo x corresponde ao log da concentração do composto testado em μ M e o eixo y corresponde à porcentagem de inibição dos compostos testados.

Capítulo 4

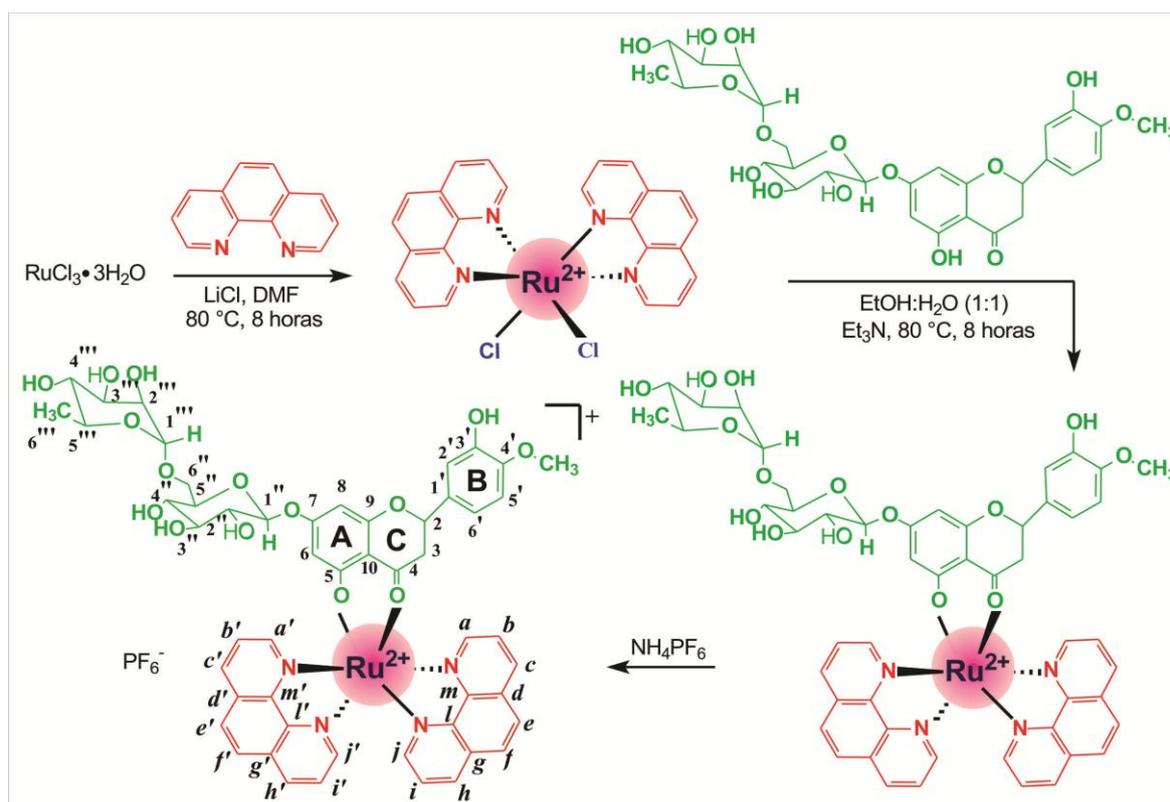
Resultados e Discussão

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido às várias diferenças de propriedades entre as duas classes de compostos investigados nesta Tese (complexos de rutênio e complexos de magnésio), os resultados e discussão da caracterização de ambos serão descritos separadamente. Os itens **4.1** e **4.2** descrevem a preparação e caracterização dos complexos de Ru^{2+} e Mg^{2+} , respectivamente. Já nos itens **4.3** e **4.4** estão descritas as propriedades físico-químicas e biológicas, respectivamente, de ambas as classes de compostos. No item **4.5** serão feitas algumas considerações relevantes referentes à versatilidade de alguns complexos obtidos neste trabalho na aplicação em diferentes sistemas biológicos.

4.1 - Preparação e caracterização dos complexos de Ru(II) (1-4)

O complexo **1** foi obtido pela reação do ligante hesp com o complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ em etanol:água (1:1), como indicado no Esquema 1. Para a síntese dos complexos **2-4** seguiu-se o mesmo procedimento, porém, os ligantes utilizados foram hespt (complexo **2**), ngina (complexo **3**) e ngnina (complexo **4**). Os complexos **1-4**, obtidos como pós amorfos com coloração marrom avermelhada, foram caracterizados por RMN ^1H , IV, UV-Vis e voltametria cíclica. A composição dos compostos foram evidenciadas através das análises elementar (H,C,N) e ESI-MS.



Esquema 1: Via de síntese para obtenção do complexo 1.

4.1.1 - Análise Elemental e ESI/MS dos complexos 1-4

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray foi uma importante ferramenta para a confirmação da composição da esfera de coordenação do íon Ru(II) nos complexos 1-4.

Os espectros de massas dos complexos 1-4 exibiram picos intensos correspondentes aos adutos $[M]^+$ dos respectivos cátions complexo, Figura 9. Assim, os picos base em m/z 1070,05 (a), 762,03 (b), 1042,02 (c) e 732,74 (d), e correspondem aos pesos moleculares dos cátions complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{hesp})(\text{phen})_2]^+$ (1) (PM = 1070,30 g mol⁻¹), *cis*- $[\text{Ru}(\text{hespt})(\text{phen})_2]^+$ (2) (PM = 761,38 g mol⁻¹), *cis*- $[\text{Ru}(\text{ngina})(\text{phen})_2]^+$ (3) (PM = 1042,20 g mol⁻¹) e *cis*- $[\text{Ru}(\text{ngnina})(\text{phen})_2]^+$ (4) (PM = 732,74 g mol⁻¹), respectivamente.

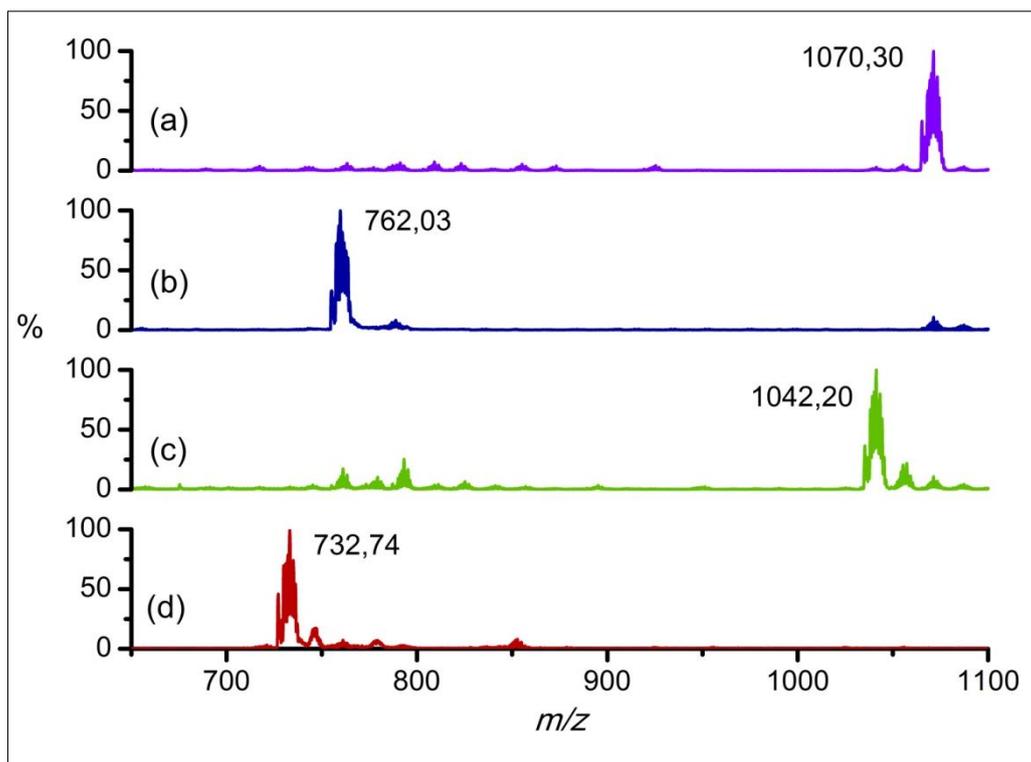


Figura 9: Espectros de massas (ESI = 70 eV) dos complexos (a) **1**, (b) **2**, (c) **3** e (d) **4** em metanol.

Adicionalmente, a composição dos quatro compostos foram confirmados por comparação com os seus respectivos dados de microanálise (H,C,N), Tabela 2. Os valores experimentais obtidos para os teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio nos complexos são coerentes com os dados teóricos, confirmando as formulações propostas para **1** ($\text{Ru}_1\text{C}_{52}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{P}_1\text{F}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), **2** ($\text{Ru}_1\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}_1\text{F}_6$), **3** ($\text{Ru}_1\text{C}_{51}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{P}_1\text{F}_6$) e **4** ($\text{Ru}_1\text{C}_{39}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}_1\text{F}_6$).

Tabela 2. Dados percentuais para os teores de C, N e H, experimentais e teóricos, para os complexos 1-4

COMPOSTOS	%H	%C	%N
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)
Complexo 1	4,38 (4,23)	48,60 (49,80)	4,60 (4,46)
Complexo 2	3,33 (3,54)	52,01 (52,75)	6,49 (6,15)
Complexo 3	3,90 (3,99)	48,55 (51,59)	4,77 (4,72)
Complexo 4	3,41 (3,42)	50,08 (51,20)	6,22 (6,13)

Exp. = valor experimental . Calc. = valor calculado

4.1.2 - Espectros vibracionais no IV dos complexos 1-4

Os espectros no IV da hesperidina livre, do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] e do complexo 1 obtidos em pastilhas de CsI são apresentados na Figura 10 e as atribuições sugeridas para os picos dos principais modos vibracionais estão sumarizados na Tabela 3.

No espectro do complexo 1 observa-se que o pico da carbonila, que na hesp livre aparece em 1647 cm⁻¹, diminuiu em intensidade e é deslocada para menor energia, aparecendo em 1610 cm⁻¹. Também, o pico em 560 cm⁻¹, atribuído ao estiramento Ru-N da phen no complexo precursor, aumenta de intensidade no complexo 1, sugerindo a presença do estiramento Ru-O. Além disso, a ausência do pico em 328 cm⁻¹ correspondente à distorção da ligação Ru-Cl no complexo precursor, é coerente com a substituição dos ligantes cloreto e subsequente coordenação do ligante hesperidina ao íon Ru²⁺.^{112, 113} Picos adicionais observados na faixa de 1444 - 1110 cm⁻¹ são atribuídos aos estiramentos C-H da deformação do anel dos ligantes fenantrolina e hesperidina e, o alargamento do pico em 844 cm⁻¹ é atribuído à sobreposição do modo ν (P-F) do íon PF₆⁻, o qual é consistente com a literatura.¹¹⁴

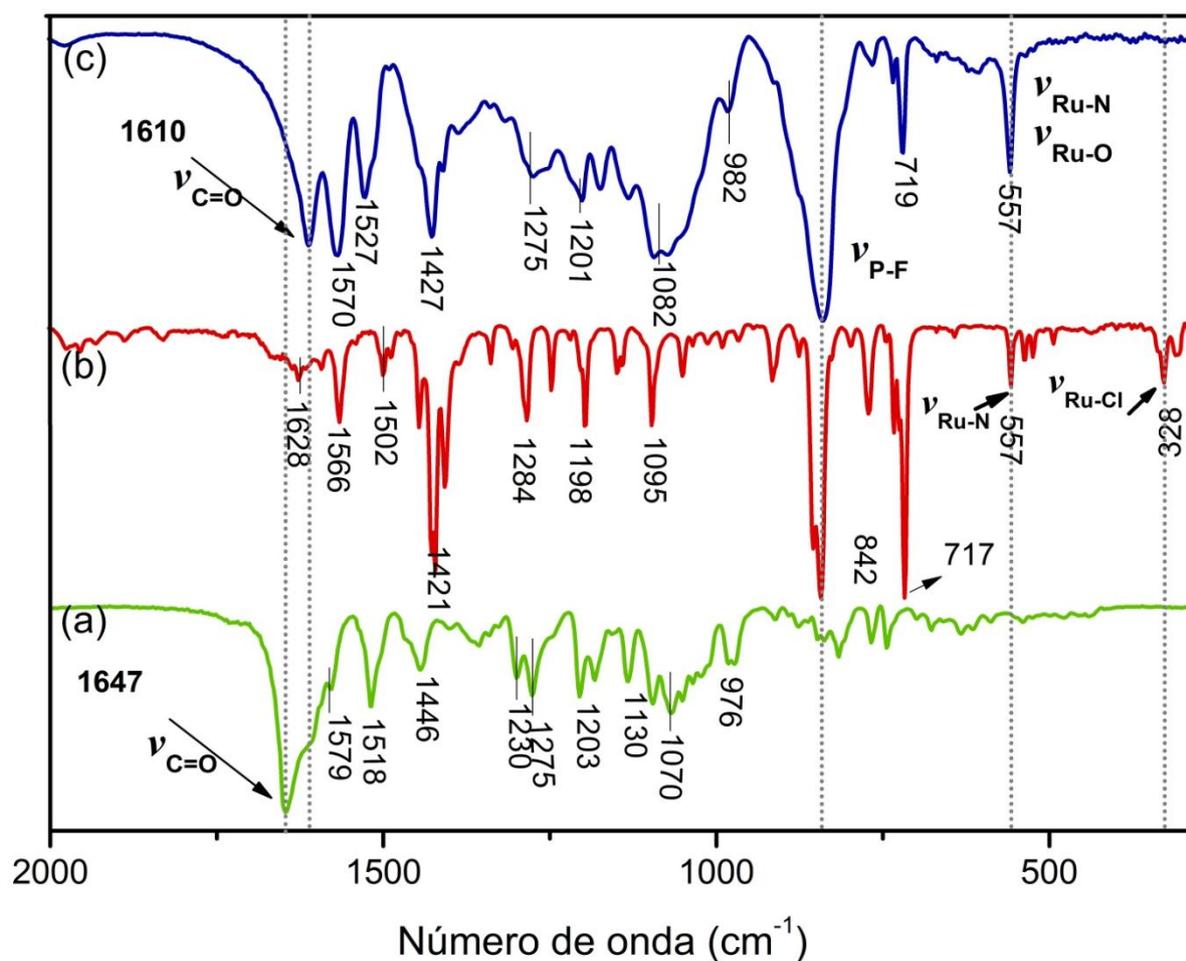


Figura 10: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante hesperidina (a), do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] (b) e do complexo **1** (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.

Tabela 3: Freqüências vibracionais e atribuições sugeridas para as principais bandas para os ligantes hesperidina e fenantrolina livres e seu respectivo complexo **5**

Atribuições	Compostos		
	Hesperidina	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂]	Complexo 1
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1647F	-	1612 F
$\nu(\text{C}=\text{N})$	-	1630 f	1569 F
$\nu(\text{C}=\text{C})$	1609 F; 1579 f	1566 m	1529 F
$\nu(\text{C}-\text{O})$	1519 m	-	1427 F
$\nu(\text{C}-\text{N})$	-	1500 F	1411 f
$\nu(\text{C}-\text{C})$	1447 m	1421 m	1380 f
$\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1275 m	-	1267 f
$\delta(\text{CH}_2)$	1196 F	-	1203 f
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{Aromático}}$	1090 f; 1072 F	1097 m; 1051 f	1072 F, 1078 F
$\gamma(\text{C}-\text{H})$	817 f	845 F; 717 F	841 F, 719 F
$\nu(\text{Ru}-\text{O}, \text{Ru}-\text{N})$	-	557 f	557 F
$\nu(\text{Ru}-\text{Cl})$	-	330 f; 328 f	-
$\nu(\text{P}-\text{F})$	-	-	841 mF

ν : deformação axial; δ : deformação angular no plano; γ : deformação angular fora do plano; f: fraco; m: médio; F: forte, MF: muito forte

Os espectros no IV dos complexos **2-4** e dos seus respectivos ligantes flavonóides estão apresentados nas Figuras 11, 12 e 13, respectivamente, e as atribuições dos picos dos principais modos vibracionais estão sumarizados na Tabela 4. Nestes complexos também foi verificado o deslocamento do pico referente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ dos respectivos flavonóides livres (hesperetina, naringina ou naringenina) para regiões de menor energia quando complexados. Também, o desaparecimento do pico referente ao estiramento Ru-Cl e o surgimento do estiramento Ru-O nos complexos **2-4**, assim como abordado para o complexo **1**, suportam a idéia de que houve a quelação dos grupos C5-O⁻ e C4=O, dos respectivos flavonóides, ao íon Ru²⁺. Além disso, o pico referente ao estiramento $\nu(\text{P}-\text{F})$ do contáion PF₆⁻, assim como no complexo **1**, também ocorrem nos complexos **2-4**. Contudo, estas observações são consistentes com os

deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN destes complexos, conforme abordado no item a seguir.

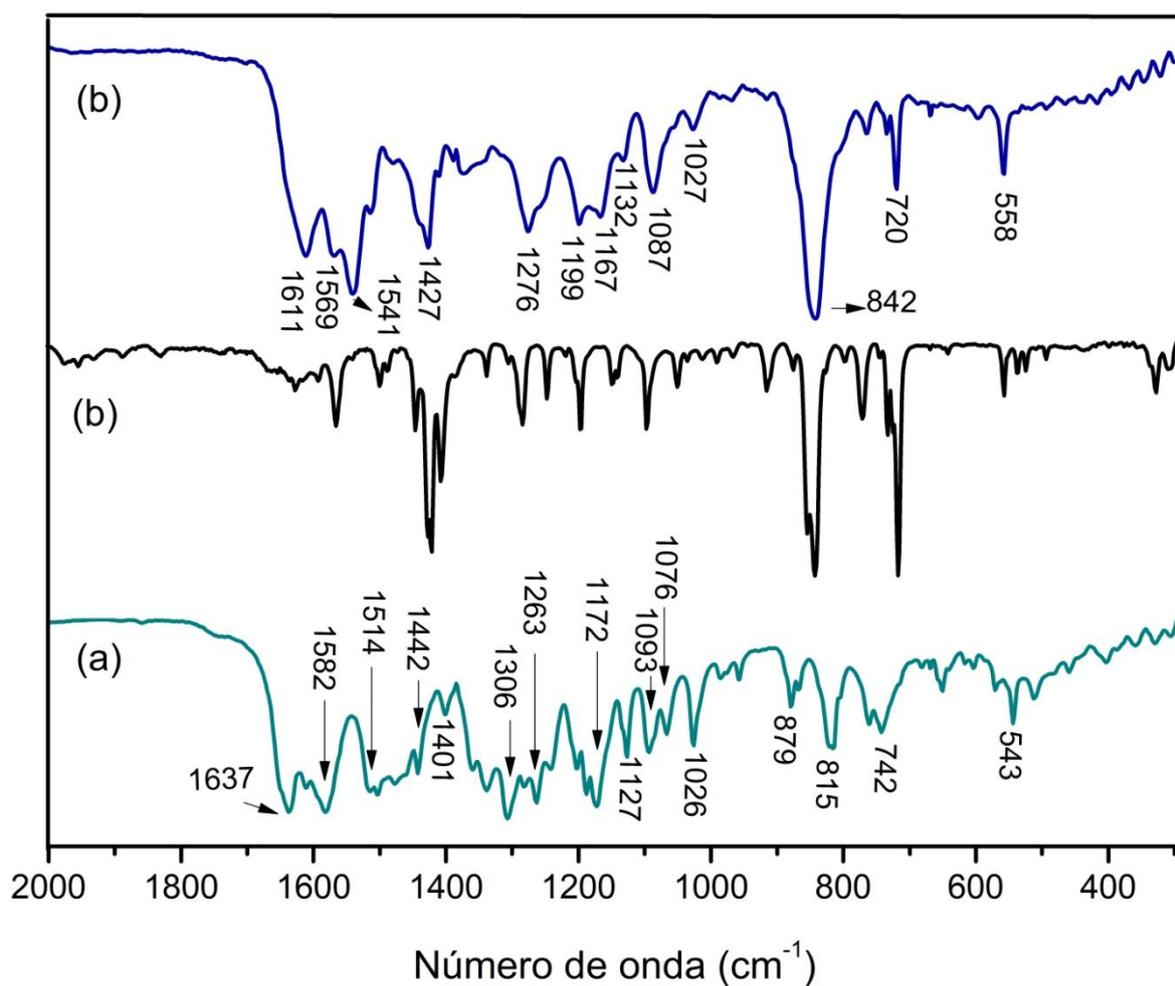


Figura 11: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante hesperitina (a), do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ (b) e do complexo **2** (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.

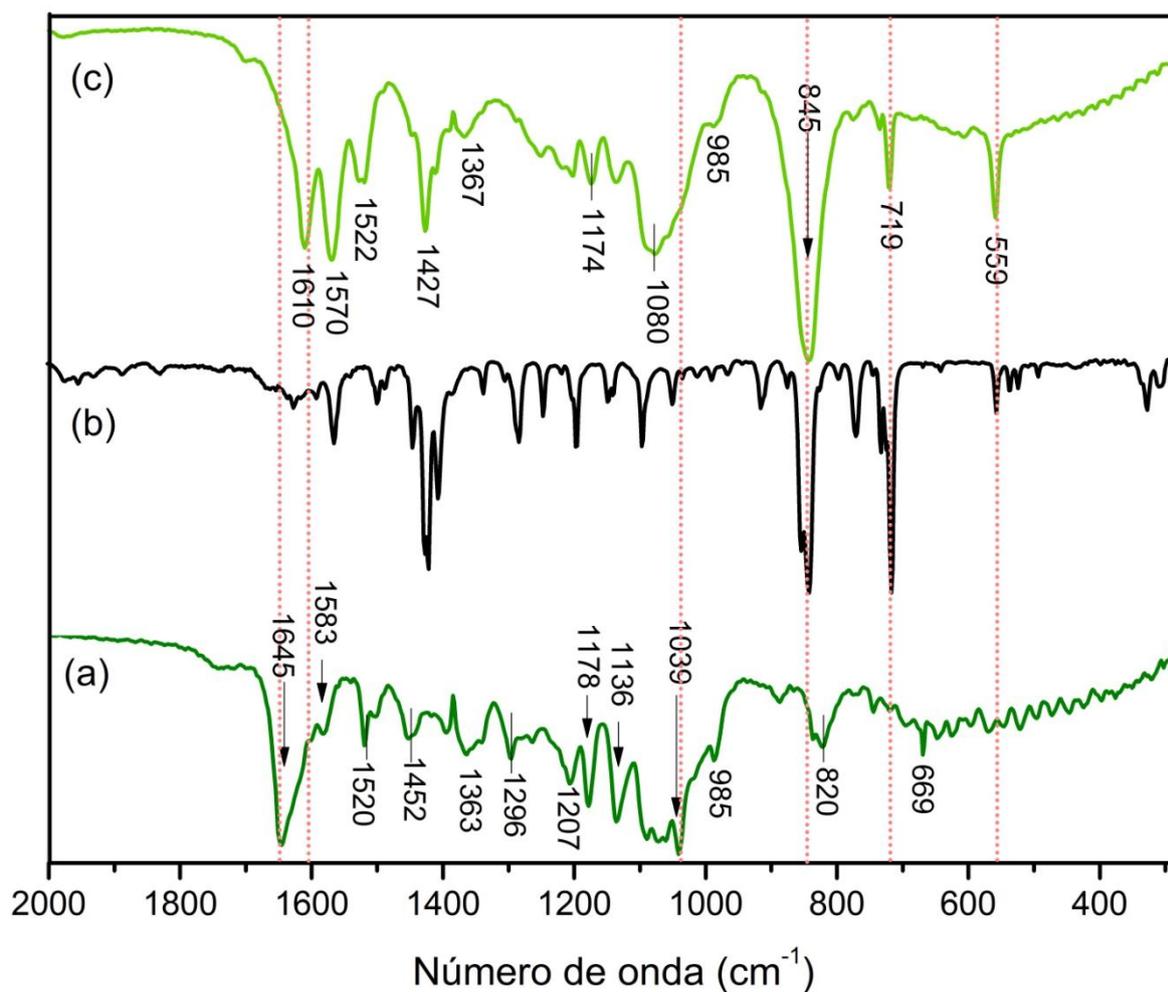


Figura 12: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante naringina (a), do complexo precursor cis - $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ (b) e do complexo **3** (c), em pastilhas de CsI na proporção 1:100.

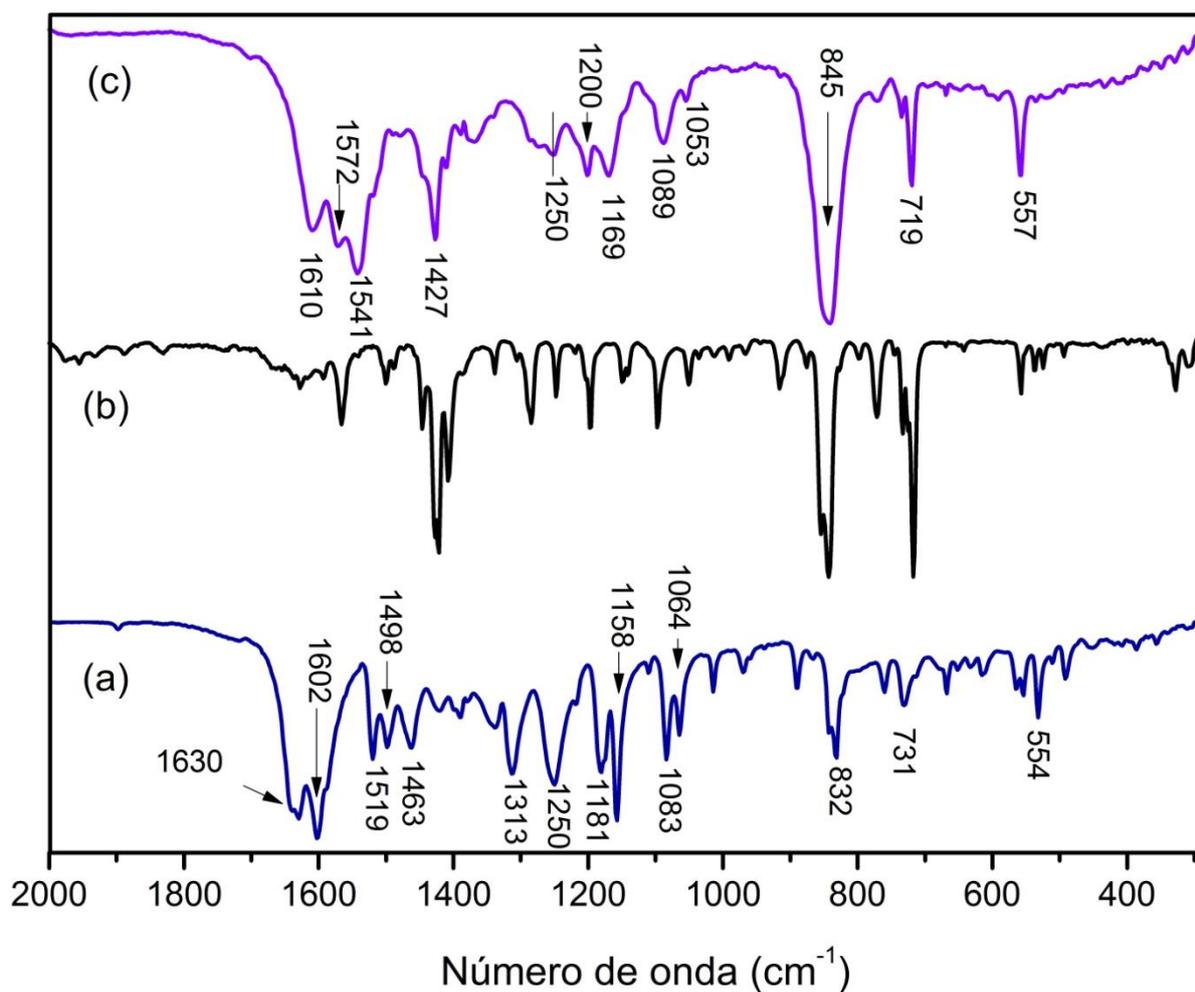


Figura 13: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante naringenina (a), do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] (b) e do complexo **4** (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.

Tabela 4: Freqüências vibracionais e atribuições sugeridas para as principais bandas para os ligantes livres hesperetina, naringina e naringenina e seus respectivos complexos **6-8**. As atribuições foram de acordo com a literatura⁵⁰

Atribuições	Ligantes livres			Complexos		
	Hespt	Ngina	Ngnina	(2)	(3)	(4)
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1637 F	1647 F	1637	1612 F	1610 F	1608 F
$\nu(\text{C}=\text{N})$	-	-	-	1572 F	1570 F	1573 F
$\nu(\text{C}=\text{C})$	1610 f	1583	1601 F	1541 F	1523 F	1543 F
$\nu(\text{C}-\text{O})$	1508 F	1520 m	1520 m	1425 F	1425 F	1427 F
$\nu(\text{C}-\text{N})$	-	-	-	1411 f	1411 f	1411 f
$\nu(\text{C}-\text{C})$	1442 m	1454 m	1462 m	1375 f	1369 f	1365 f
$\delta(\text{COH}), \delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1263 f	1285 f	1253 f	1280 f	1250 f	1280 f
$\delta(\text{CH}_2)$	1172 F	1180 m	1180 m	1200 m; 1169 m	-	1201 m; 1168
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{Aromático}}$	1093 m; 1066 m	1086 f	1084 m; 1062 m	1088 m	1078 F	1090 m
$\gamma(\text{C}-\text{H})$	820 m	825 m	831 m	841 F; 719 m	843 F; 719 m	843 F; 719 m
$\nu(\text{Ru}-\text{O}, \text{Ru}-\text{N})$	-	-	-	557 m	559 m	557 m
$\nu(\text{P}-\text{F})$	-	-	-	841 F	843 F	843 F

v: deformação axial; δ : deformação angular no plano; γ : deformação angular fora do plano; f: fraco; m: médio; F: forte, MF: muito forte

4.1.3 - Espectros eletrônicos no UV-Vis dos complexos 1-4

Os espectros de absorção eletrônica do complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ e dos complexos **1-4**, obtidos em DMF, são mostrados na Figura 14. Observa-se que os quatro compostos apresentam $\lambda_{\text{máx}} = 470 \text{ nm}$. Neste comprimento de onda, os valores de absorvidade molar (ϵ) dos complexos **1-4** foram determinados através da equação de Beer ($\mathbf{A} = \epsilon \cdot \mathbf{b} \cdot \mathbf{c}$) usando-se a relação linear entre a absorbância, **A**, e a concentração, **c** e mantendo-se o caminho óptico constante, **b**. A Figura 15 ilustra os resultados obtidos para o complexo **1**. Assim, os

espectros eletrônicos dos complexos **1-4** apresentam bandas de absorção intensas e largas observadas na região do visível de 400 à 600 nm com ombros em 470, 510 e 580 nm. Dentre estas, as bandas de absorção de maior intensidade nos espectros dos complexos $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ ($\lambda_{\text{max}} = 552 \text{ nm}$, $\varepsilon = 8.100 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), **1** ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$, $\varepsilon = 11.800 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), **2** ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$, $\varepsilon = 10.600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), **3** ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$, $\varepsilon = 13.600 \text{ L cm}^{-1}$) e **4** ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$, $\varepsilon = 12.800 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) são qualitativamente atribuídas à transição eletrônica MLCT ($\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$). Observa-se que a energia da transição MLCT dos complexos **1-4**, são similares entre si, e são maiores do que para o complexo precursor, $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$. Isto sugere a ocorrência de uma maior estabilização dos orbitais $d\pi$ do Ru(II) no complexos **1-4** em comparação ao seu precursor, uma vez que o efeito quelante estabiliza o centro metálico. Estas observações também estão coerentes com investigações eletroquímicas descritas no item a seguir.

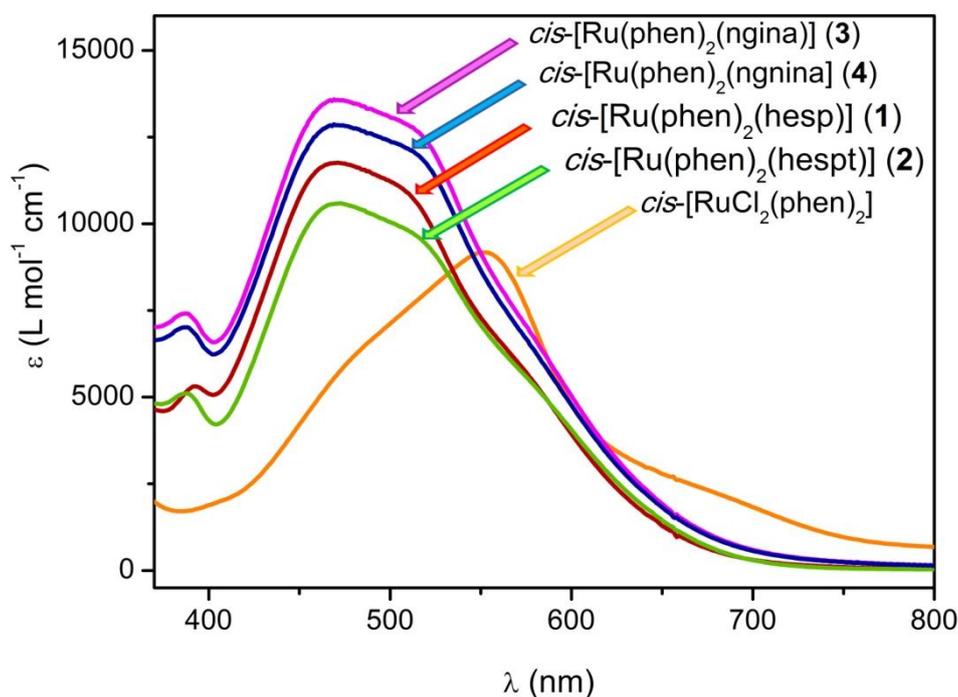


Figura 14: Espectros eletrônicos na região UV-Vis do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ e dos complexos **1-4** em DMF, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

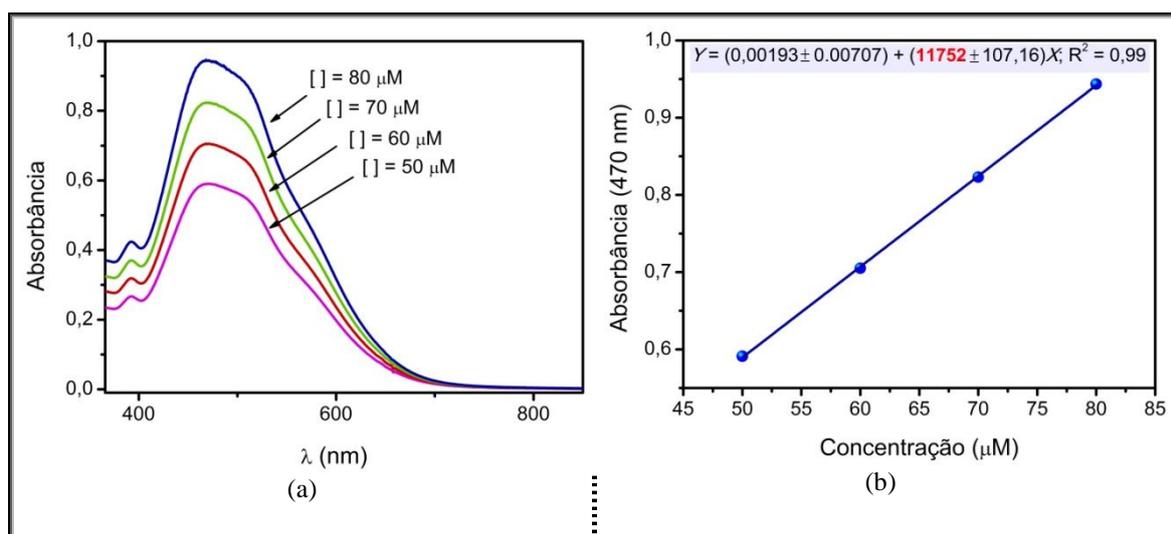


Figura 15: (a) Absorbância vs. comprimento de onda para o complexo **1** em diferentes concentrações em DMF; (b) Representação gráfica da Lei de Beer, para o complexo **1** em DMF, em $\lambda_{\text{máx}} = 470 \text{ nm}$ e caminho óptico de 1 cm, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.1.4 – Eletroquímica

A Figura 16 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ e para os complexos **1-4** em DMF. Em todos os casos observa-se na primeira varredura oxidativa o processo Ru^{2+} para Ru^{3+} e na varredura reversa a redução do Ru^{3+} para Ru^{2+} . Os valores dos potenciais de meia onda, $E_{1/2} (\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+})$, para os complexos **1-4** foram de 0,65, 0,67, 0,65 e 0,67 V, respectivamente, cujo deslocamento em relação ao complexo precursor ($E_{1/2} = 0,40 \text{ V}$) foi de aproximadamente +270 mV. Isto é consistente com o aumento da estabilização do centro metálico resultante da coordenação do quelato flavonóide (hesperidina, hesperetina, naringina ou naringenina). Além disso, os deslocamentos dos potenciais redox dos complexos **1-4** em relação ao complexo precursor também concordam com os espectros de absorção eletrônica UV-Vis destes compostos, conforme descrito no item anterior.

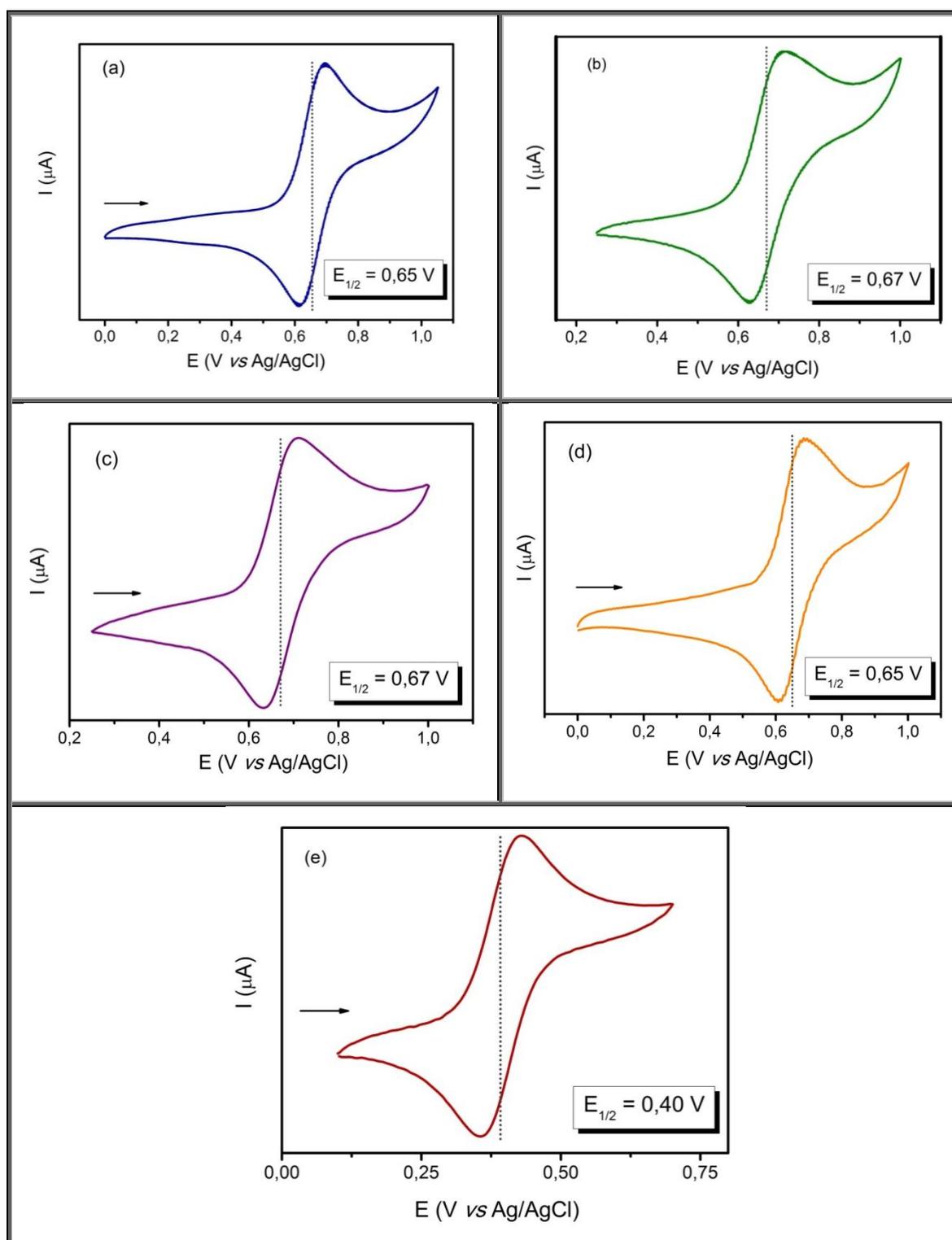


Figura 16: Voltamogramas cíclicos dos complexos **1** (a), **2** (b), **3** (c), **4** (d) e do precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] (e) em DMF (0,1 mol L⁻¹ de PTBA), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os voltamogramas cíclicos do complexo **1** em diferentes velocidades de varredura são mostrados na Figura 17. Analisando-se os dados notou-se que a corrente de pico (ip) aumenta com o aumento da velocidade de varredura, Figura 17(a). Uma informação obtida desses voltamogramas diz respeito à reversibilidade do sistema. Assim, a análise da dependência das correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 17(b)) indica uma representação satisfatória da transferência de carga controlada por difusão e sugere a ocorrência de um processo reversível para o par redox $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ do sistema em estudo. Este comportamento também foi verificado para os demais complexos **2-4**, sugerindo que nestes casos também o par redox $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ trata-se de um processo reversível.

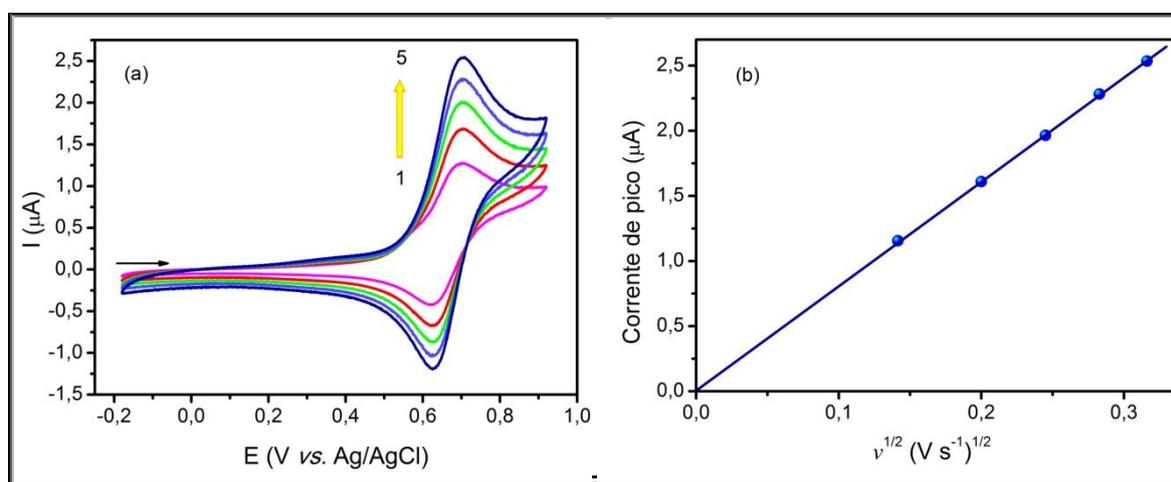


Figura 17: (a) Voltamogramas cíclico do complexo **1** (1×10^{-3} mol L⁻¹) em DMF (0,1 mol L⁻¹ TBAPF₆), $v(1-5) = 20, 40, 60, 80$ e 100 mV s⁻¹, respectivamente; (b) Corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, à $25 \pm 0,1$ °C.

4.1.5 - Espectros de RMN dos complexos 1-4

Os espectros de RMN ¹H dos complexos **1-4** foram obtidos em DMSO-*d*₆ a 25 °C. Através da integração da área dos sinais de hidrogênio no espectro de RMN ¹H, verificou-se que os sinais correspondentes às porções flavonóide e 1,10'-fenantrolina estão presentes na proporção de 1:2, indicando que o íon Ru^{2+} está hexacoordenado aos sítios quelantes de duas fenantrolinas e um flavonóide (hesperidina, hesperetina, naringina ou naringenina, em seus respectivos complexos). Também, os deslocamentos químicos observados sugerem que a

quelação ocorreu através dos átomos de nitrogênio das duas fenantrolinas e dos átomos de oxigênio dos grupos C5-O⁻ (anel A) e C4=O (anel C) dos respectivos flavonoides.

4.1.5.1 - RMN de ¹H e ¹³C do complexo 1

O espectro do complexo **1** está apresentado na Figura 18 e as atribuições, utilizando a numeração do Esquema 1, estão resumidas nas Tabelas 5 e 6.

No espectro de RMN ¹H do complexo **1** o sinal em 12,1 ppm atribuído ao próton do grupo 5-OH da hesperidina livre está ausente em consequência de sua desprotonação por Et₃N e subsequente coordenação ao íon metálico Ru²⁺.

Do ponto de vista estrutural, hesperidina é um composto quiral, em que na posição C2 o grupo 2-metoxifenol possui duas formas tautoméricas: 2*R* e 2*S*.¹¹⁵ Assim, esperava-se que o complexo **1** tivesse a mistura dos dois isômeros. Tal previsão foi confirmada através dos espectros de ¹H e ¹³C, cujos dados espectrais foram atribuídos por comparação com os dos ligantes livres (hesperidina e 1,10'-fenantrolina) e estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Foi verificado que os sinais dos prótons H3 (anel C) e H6 (anel A) próximos do sítio de coordenação de Ru²⁺ foram duplicados e deslocados (para H6: $\Delta\delta = -0,52$ e $-0,47$ ppm; para H3: $\Delta\delta = -0,13$ e $-0,08$ (equatorial) e $+0,04$ ppm (axial). Em particular, o sinal do hidrogênio do C2 quiral (anel C) também foi duplicado e deslocado para campo mais alto ($\Delta\delta = -0,19$ e $-0,29$ ppm). Contudo, a duplicação dos sinais dos prótons indica conformações diferentes do ligante hesperidina.

Também foi verificado que os Ha ($\Delta\delta = -0,29$ e $-0,91$ ppm) e Ha' ($\Delta\delta = -0,07$, $+0,04$) foram deslocados e duplicados. Esta pequena diferença entre os deslocamentos químicos de Ha e Ha' ocorre devido à proximidade do Ha com o anel aromático **A** do ligante hesperidina, tornando-se ligeiramente mais protegidos.

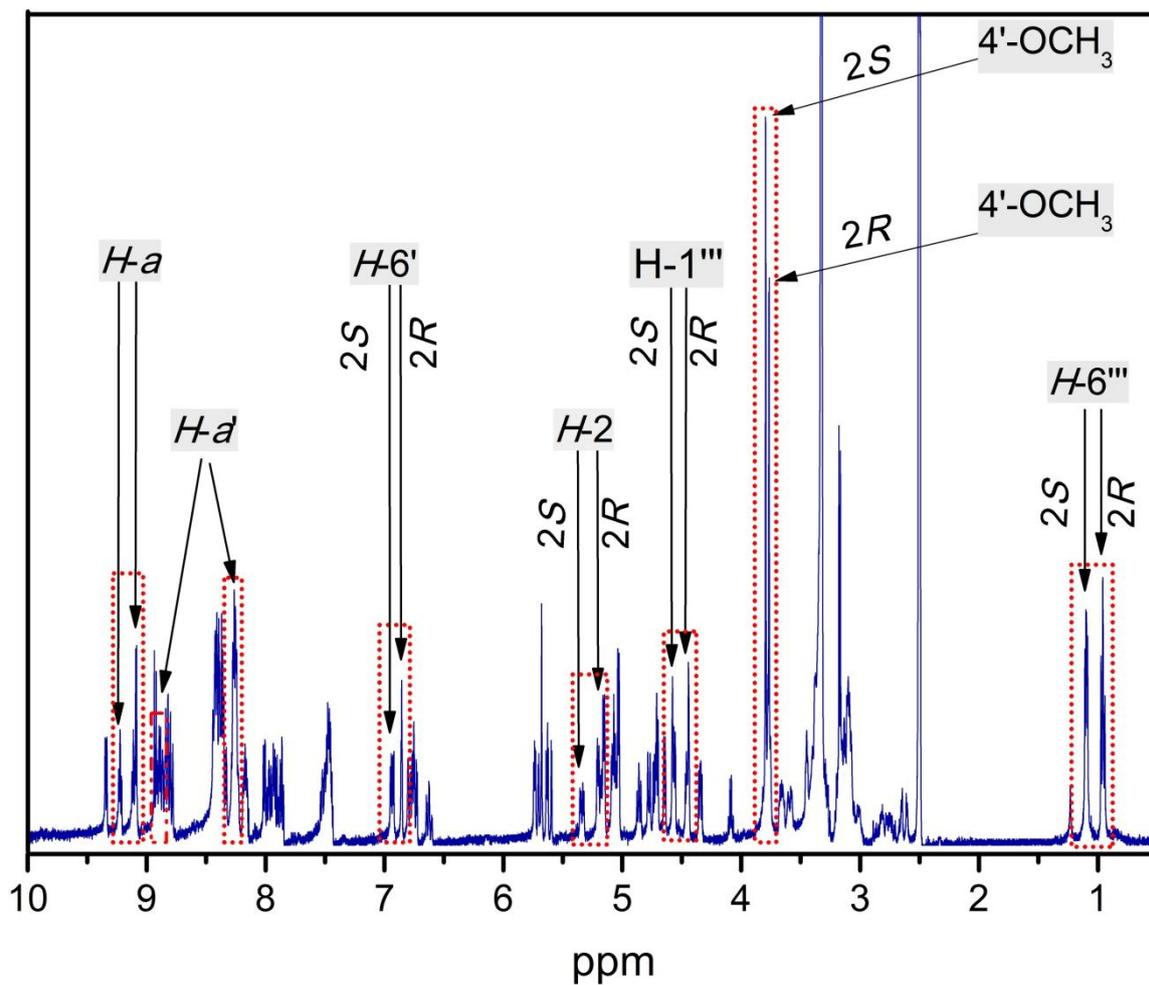


Figura 18: Espectro de RMN ^1H do complexo **1** em $\text{DMSO-}d_6$ à 25 °C.

Tabela 5: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C NMR do ligante livre hesperidina e do complexo 1 em DMSO- d_6

Posição	Hesperidina		Complexo 1	
	δ_{H} (mult, Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (mult, Hz)	δ_{C} (ppm)
4	-	197,0	-	189,00 2C
5	-	163,0	-	162,20; 163,90
7	-	165,1	-	164,10; 2C
9	-	162,5	-	161,60; 161,90
10	-	103,3	-	107,13; 107,30
1'	-	130,9	-	131,02 - 2C
3'	-	146,4	-	146,21; 146,32
4'	-	148,0	-	147,51; 148,15
2	5,49 (<i>dd</i> ; 3,12; 12,00)	78,3	5,3 (<i>dd</i> ; 3,7; 10,0), 5,2 (<i>dd</i> ; 3,6; 9,0)	76,08; 75,97
6	6,14 (<i>d</i> ; 2,04)	96,3	5,67 (<i>sl</i>), 5,62 (<i>d</i> ; 2,04)	92,28; 92,52
8	6,12 (<i>d</i> ; 2,44)	95,5	5,73 (<i>d</i> ; 2,52)	92,07; 92,23
2'	6,93 (<i>m</i>)	114,1	6,75 (<i>m</i>) 6,73 (<i>m</i>)	113,67 114,06
5'	6,93 (<i>m</i>)	112,0	6,62 (<i>dd</i> ; 1,9; 9,0), 6,80 (<i>d</i> ; 8,0)	111,65; 112,01
6'	6,93 (<i>m</i>)	117,9	6,92 (<i>dd</i> ; 3,0; 8,4), 6,85 (<i>m</i>)	117,21; 117,36
1''	4,98 (<i>d</i> ; 7,3)	100,6	4,85 (<i>d</i> ; 7,0), 4,77 (<i>d</i> ; 7,3)	98,71; 98,64
2''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	72,9	3,20 – 3,64 (<i>m</i>) – 2 H	72,87; 73,30
3''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	76,2	3,20 – 3,64 (<i>m</i>) – 2 H	75,84; 75,97
4''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	69,6	3,20 – 3,64 (<i>m</i>) – 2 H	69,03; 69,61
5''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	75,5	3,20 – 3,64 (<i>m</i>) – 2 H	75,05; 75,22
1'''	4,51 (<i>s</i>)	99,4	4,56 (<i>s</i>), 4,44 (<i>s</i>)	100,19; 100,29
2'''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	70,2	3,20 – 3,64 (<i>m</i>) – 2H	70,17; 70,38
3'''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	70,7		70,61; 70,71
4'''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	72,0		71,93; 72,13
5'''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	68,3		68,14; 68,24
3ax	2,76 (<i>dd</i> ; 3,12; 14,0)	42,0		2,63 (<i>dd</i> ; 3,7; 17,0), 2,74 (<i>dd</i> ; 4,4; 12,0)
3eq	3,16 (<i>m</i>)	42,0	3,2 (<i>m</i>) – 2 H	-
6''	3,20 – 3,64 (<i>m</i>)	65,9	3,64 – 3,66 (<i>m</i>) – 2 H	65,70; 66,60
H6'''	1,09 (<i>d</i> ; 6,12)	17,8	1,10 (<i>d</i> ; 6,1), 0,96 (<i>t</i> ; 6,6)	17,82; 17,64
4'-MeO	3,77 (<i>s</i>)	55,5	3,79 (<i>s</i>), 3,76 (<i>s</i>)	55,57; 55,66
5-OH	12,10 (<i>s</i>)	-	-	-
3'-HO	9,12 (<i>s</i>)	-	-	-

s = singleto; sl = singleto largo; d= dubleto; dd =duplo dubleto; m = multipleto; t = tripleto

Tabela 6: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C NMR do ligante livre 1,10'-fenantrolina e do complexo **1** em $\text{DMSO}-d_6$

Posição	1,10'-fenantrolina		Complexo 1	
	δ_{H} (mult, Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (mult, Hz)	δ_{C} (ppm)
<i>a</i>	9,18	149,90	8,89 (<i>dd</i> ; 1,2; 5,5); 8,27 (<i>dd</i> ; 1,6; 5,6)	154,21; 153,92
<i>b</i>	7,83	123,25	7,48 (<i>dd</i> ; 5,6; 8,6) – 2H	127,63 – 2C
<i>c</i>	8,54	136,13	8,8 (<i>d</i> ; 8,2) – 2H	135,35; 135,43
<i>e</i>	8,02	126,63	8,40 (<i>s</i>) – 2H	129,76; 128,81
<i>f</i>	8,02	126,63	8,43 (<i>s</i>) – 2H	129,88; 128,98
<i>h</i>	8,54	136,13	8,7 (<i>d</i> ; 8,4) – 2H	135,43 – 2C
<i>i</i>	7,83	123,25	8,26 (<i>dd</i> ; 4,9; 8,8) – 2H	131,31 – 2C
<i>j</i>	9,18	149,90	8,01 (<i>d</i> ; 5,4), 7,97 (<i>dd</i> ; 1,0; 6,0)	149,24 – 2C
<i>a'</i>	9,18	149,90	9,11 (<i>dd</i> ; 0,8; 5,4); 9,22 (<i>dd</i> ; 1,2; 5,5)	154,21; 153,92
<i>b'</i>	7,83	123,25	7,52 (<i>dd</i> ; 5,6; 7,4) – 2H	127,73 – 2C
<i>c'</i>	8,54	136,13	7,86 (<i>d</i> ; 5,24) -1 H	133,0
<i>e'</i>	8,02	126,63	8,17 (<i>s</i>) – 2H	129,76; 128,81
<i>f'</i>	8,02	126,63	8,38 (<i>s</i>) – 2H	129,88; 128,98
<i>h'</i>	8,54	136,13	-	135,43 – 2C
<i>i'</i>	7,83	123,25	8,37 (<i>m</i>)	131,31 – 2C
<i>j'</i>	9,18	149,90	7,92 (<i>dd</i> ; 1,3; 5,4), 8,25(<i>dd</i> ;1,3;4,9)	149,24 – 2C
<i>d, d'</i>	-	128,41	-	131,31 - 2C
<i>g, g'</i>	-	128,41	-	131,37, 2C
<i>l, l'</i>	-	145,55	-	149,54; 149,90
<i>m, m'</i>	-	145,55	-	149,24 - 2C

s = singlete; sl = singlete largo; d= dubleteo; dd =duplo dubleteo; m = multipleteo; t = tripleteo

No espectro de RMN de ^{13}C NMR os deslocamentos químicos foram mais pronunciados, especialmente para os carbonos C4 ($\Delta\delta = -8$ ppm), C5 ($\Delta\delta = +0.8$ e -0.9 ppm) e C10 ($\Delta\delta = +4.0$ e $+3.83$ ppm), comparados com a hesperidina

livre. Estes dados refletem a forte redistribuição de densidade eletrônica no ligante hesperidina após sua coordenação ao íon Ru^{2+} . Estes resultados indicam uma forte interação entre o grupo carbonil do ligante hesperidina e o íons Ru^{2+} , atribuído à formação do complexo mononuclear pela quelação através dos átomos de oxigênio da hesperidina. Além disso, a coordenação da hesperidina ao íon Ru^{2+} .

Além disso, a coordenação da hesperidina ao íon Ru^{2+} de forma bidentada leva ao desaparecimento da ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila C5-OH e o grupo carbonila (C4=O),¹¹⁶ e conseqüentemente um forte efeito de desblindagem ocorre no carbono C10. Assim, os deslocamentos químicos observados para os carbonos do ligante hesperidina, próximos da esfera de coordenação, comportam-se em um sistema ressonante (de blindagem/desblindagem) de maneira semelhante ao que ocorre em grupos ceto-enol.¹¹⁷

4.1.5.2 - RMN de ^1H dos complexos 2-4

Os espectros de RMN ^1H dos complexos **2-4** estão apresentados em anexo nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente, e as atribuições para tais complexos e seus respectivos flavonóides livres (hesperetina, naringina e naringenina), utilizando a numeração do Esquema 1, estão descritos nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Similarmente ao espectro de RMN ^1H do complexo **1**, os sinais em ~12,14 a 12,17 ppm nos complexos **2-4**, atribuídos aos prótons do grupo 5-OH dos seus correspondentes flavonóides livres (hesperetina, naringina e naringenina), também estão ausentes em consequência da desprotonação do referido grupo por Et_3N e subsequente coordenação ao íon metálico Ru^{2+} .

Foi verificado que estes complexos também apresentam misturas de isômeros *R* e *S*, conforme abordado para o complexo **1**, já que os ligantes hesperetina, naringina e naringenina também possuem o carbono quiral C2.

De modo geral, os deslocamentos químicos observados para os sinais de ^1H e/ou ^{13}C são consistentes com a redistribuição de elétrons- π nos flavonóides quando coordenados ao íon Ru^{2+} em seus respectivos complexos. Além disso, estas observações também são coerentes com o deslocamento dos potenciais redox

referentes os sistema $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ nos complexos **1-4**, conforme será descrição feita no item a seguir.

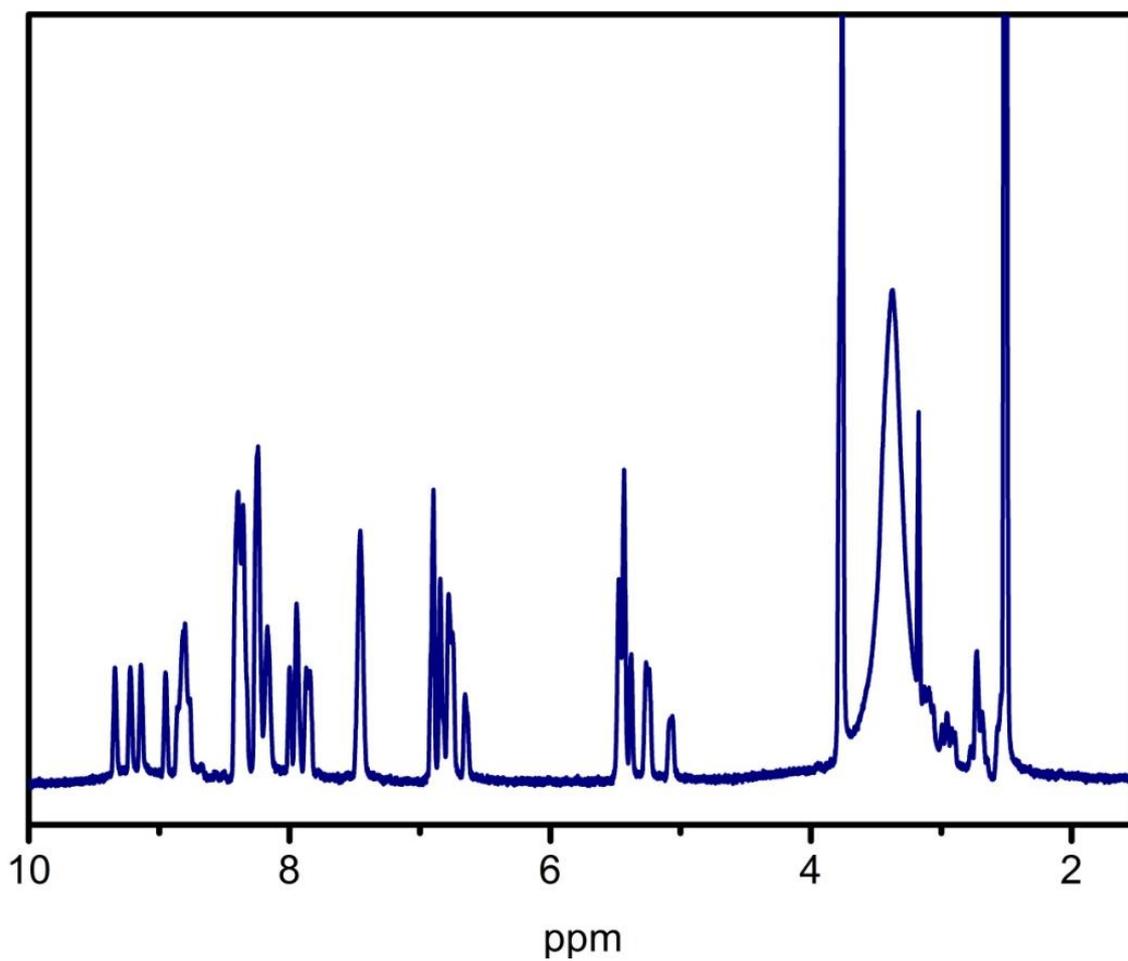


Figura 19: Espectro de RMN ^1H do complexo **2** em $\text{DMSO-}d_6$ à $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 7: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H da hesperetina livre e do complexo **2** em $\text{DMSO-}d_6$

H	Hesperitina	Complexo 2
posições	δ (J)	δ (J)
2	5,46, dd (12,3; 3,0) – 1H	5,24, d (10,36) – 2H
3ax	2,74, dd (17,2, 3,0) – 1H	2,73, m – 2H
3eq	3,23, dd (17,2, 12,3) – 1H	3,13, m – 2H
6	5,91, d (1,9) – 1H	5,47, sl – 2H
8	5,92, d (1,9) – 1H	5,43, sl – 2H
2'	6,95, d (1,6) – 1H	6,84, s – 2H
5'	5,97, d (8,2) – 1H	6,78, d (10,86) – 2H
6'	6,90, dd (8,2; 1,6) – 1H	6,89, s – 2H
4'-OCH ₃	3,81, s – 3H	3,76, s – 6H
a	-	9,14, s – 1H; 8,95, s – 1H
a'	-	9,34, s – 1H; 9,22, s – 1H
b, b'	-	7,46, sl – 4H
c, h	-	8,80, m – 4H
c', i, i'	-	8,24, m – 6H
e, f, f', h'	-	8,36, m – 8H
e'	-	8,17, m – 2H
j	-	7,95, s – 2H
j'	-	7,87, d (10,35) – 2H

s = singleto; sl = singleto largo; d= dubleto; dd =duplo dubleto; m = multipleto; t = tripleto

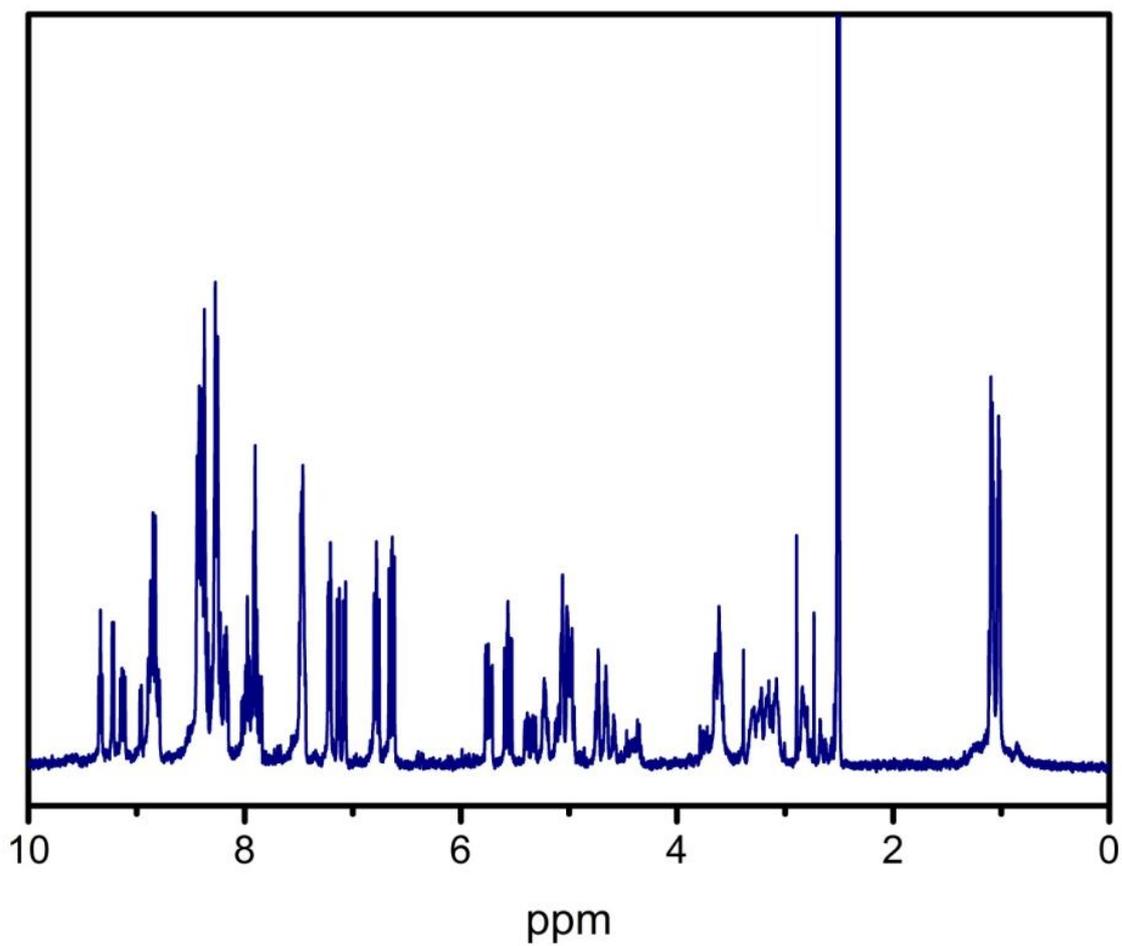


Figura 20: Espectro de RMN ^1H do complexo **3** em $\text{DMSO-}d_6$ à 25 °C.

Tabela 8: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H da naringina livre e do complexo **3** em $\text{DMSO}-d_6^{50}$

H	Naringina	Complexo 3
posições	δ (J)	δ (J)
2	5,56, dd (13,2; 3,4) – 1H	4,73, m – 1H; 4,64, m – 1H
3ax	2,73, dd (17,0; 3,34) – 1H	3,08, m – 1H; 3,15, m – 1H
3eq	3,36, dd (17,0; 13,2) – 1H	3,22, m – 1H; 3,29, m – 1H
6	6,11, d (2,4) - 1H	5,74, m – 1H; 5,36, m – 1H
8	6,10, s - 1H	5,56, m – 1H; 5,23, m – 1H
2'	7,31, d (8,4) -1H	7,13, d (8,54) – 1H; 7,07, d (8,57) – 1H
3'	6,80,d (8,4) - 1H	6,64, dd (11,44; 2,85) – 2H
5'	6,80, d (8,4) - 1H	6,78, dd (10,03; 1,59) – 2H
6'	7,31, d (8,4) - 1H	7,22, d (8,50) – 2H
Glc-1''	5,17, d (8,2) – 1H	5,06, m – 2H
Rha-1'''	5,13, d (2,2) – 1H	5,02, m – 2H
6'''	1,19, d (6,6) – 3H	1,08, dd (6,10; 2,32) – 3H; 1,02, dd (6,0; 1,71) – 3H
a	-	9,13,dd (11,32; 5,22) – 1H; 8,85, m – 1H
a'	-	9,3, t (6,05) – 1H; 9,21, d (5,06) – 1H
b, b'	-	7,47, m – 4H
c, h	-	8,85, m – 4H
c', i, i', e'	-	8,25, m – 8H
e, f, f',h'	-	8,37, m – 8H
j, j'	-	7,95, m – 4H

s = singleto; sl = singleto largo; d= dubleto; dd =duplo dubleto; m = multipleto; t = tripleto

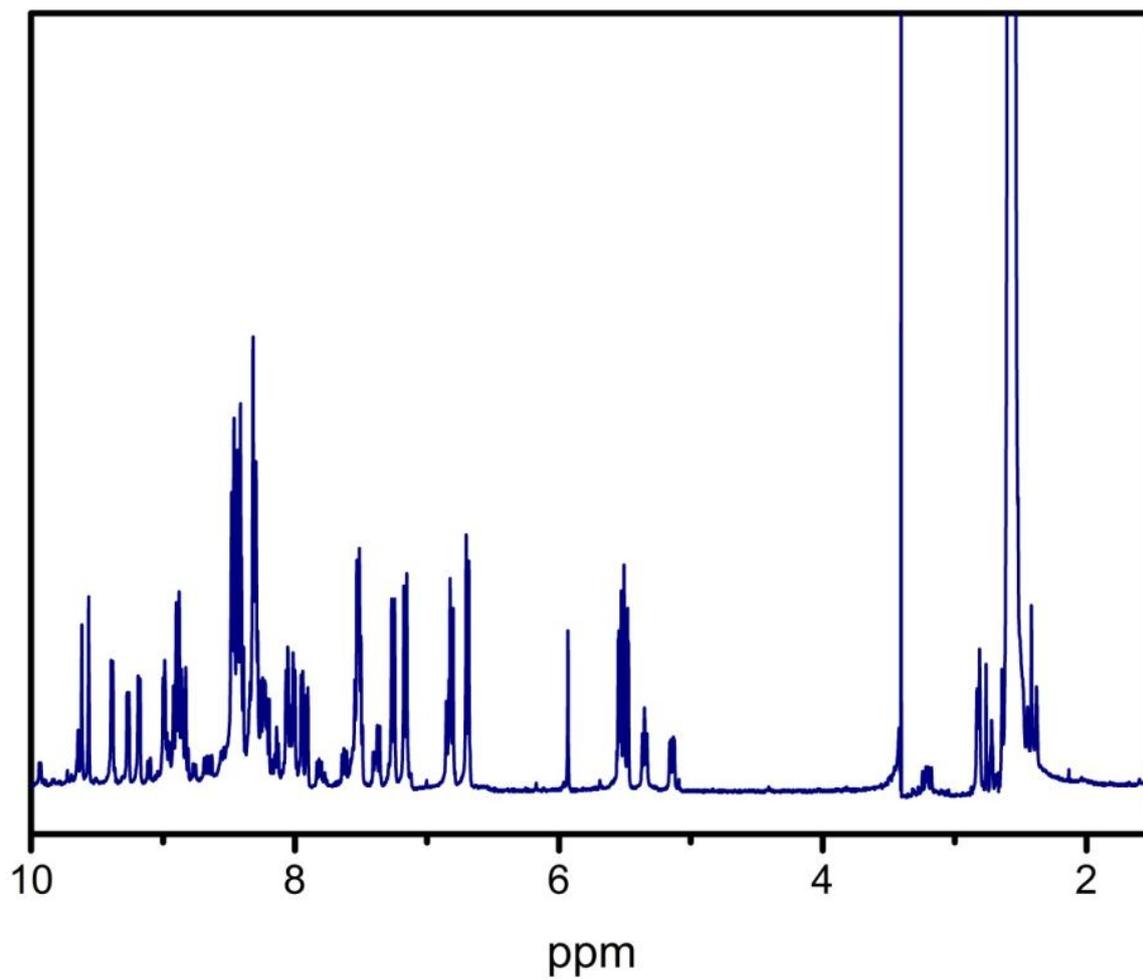


Figura 21: Espectro de RMN ^1H do complexo 4 em DMSO- d_6 à 25 °C.

Tabela 9: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H da naringenina livre e do complexo **4** em $\text{DMSO-}d_6$

H	Naringenina	Complexo 4
posições	δ (J)	δ (J)
2	5,43 (dd; 4,0; 13,0) – 1H	5,13, m – 2H
3ax	2,70 (dd; 2,8; 17,0) – 1H	3,0, m – 2H
3eq	3,20, m – 1H	3,2, m – 2H
6	5,88, s - 1H	5,66, s – 2H
8	5,88, s - 1H	5,49, s – 2H
2'	7,32, d (9,0) - 1H	7,25, d (8,7) – 1H; 7,16, d (8,75) – 1H
3'	6,79, d (9,0) - 1H	6,82, t (9,2) – 2H
5'	7,32, d (9,0) - 1H	6,69, d (9,0) – 2H
6'	6,79, d (9,0) - 1H	7,37, m – 1H; 5,51, m – 1H
a	-	9,18, d (9,5) – 1H; 9,0, d (8,7) – 1H
a'	-	9,38, d (9,7) – 1H; 9,26, d (10,2) – 1H
b, b'	-	7,52, m – 4H
c, h	-	8,87, m – 4H
c', i, i'	-	8,30, m – 6H
e, f, f', h'	-	8,40, m – 8H
e'	-	8,20, m – 2H
j	-	8,05, d (4,2) – 1H; 8,0, d (3,91) – 1H
j'	-	7,94, d (3,80) – 1H; 7,9, d (3,86) – 1H

s = singleto; sl = singleto largo; d= dubleto; dd =duplo dubleto; m = multipleto; t = tripleto

Assim, com base nas caracterizações feitas por análise elementar, ESI-MS, IV, UV-Vis e RMN de ^1H as possíveis estruturas sugeridas para os complexos **1-4** são apresentadas na Figura 22.

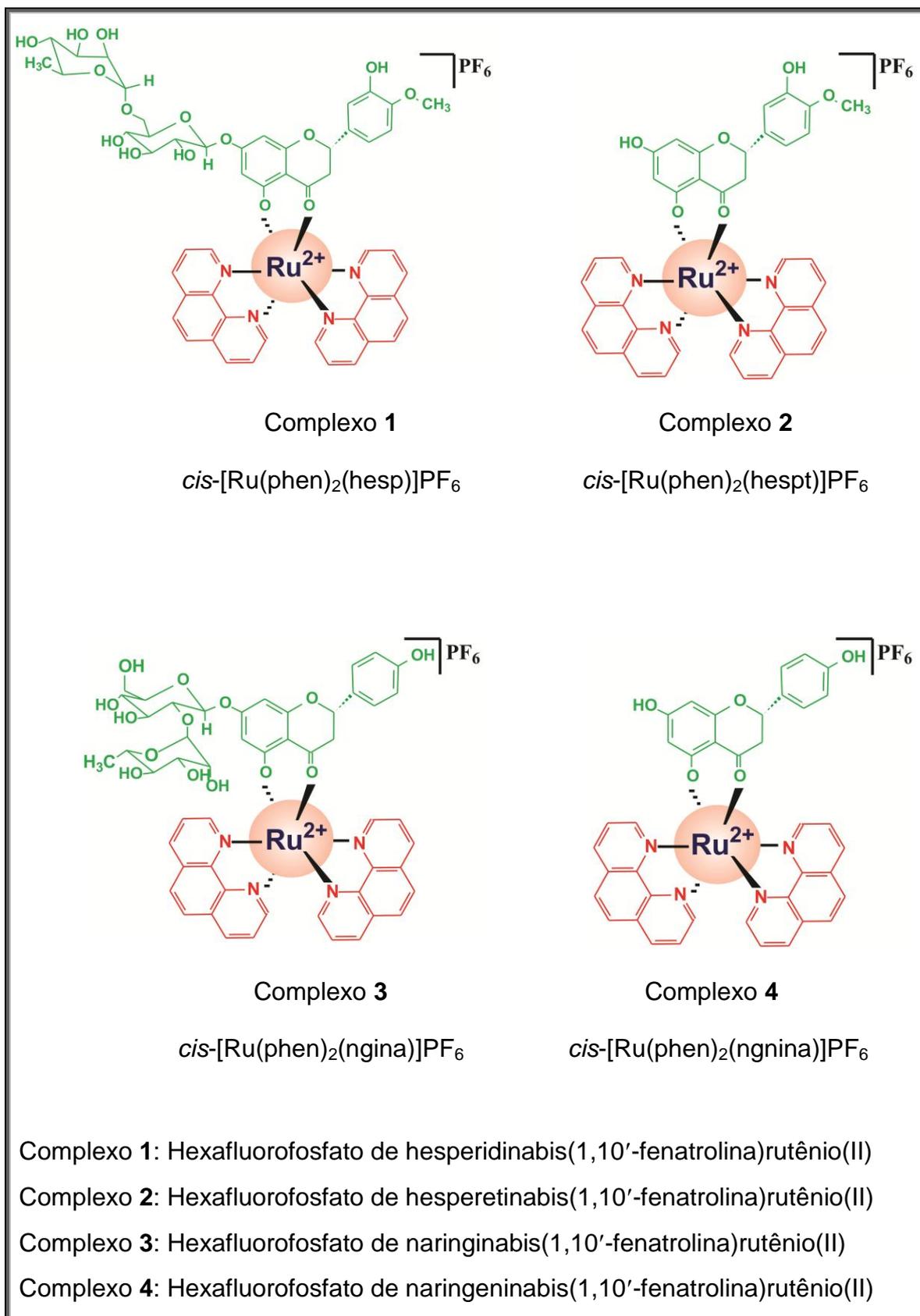


Figura 22: Estruturas sugeridas para os complexos 1-4.

Apesar dos resultados de análise elementar apresentarem desvios de até ~5% em relação aos valores calculados, as caracterizações feitas por RMN de ^1H demonstram a pureza dos compostos. No entanto, tais diferenças entre os valores teóricos e experimentais podem está associados com a presença de moléculas de água na esfera de coordenação externa destes complexos.

Adicionalmente, os dados de absorção atômica para a concentração do elemento Mg indica que o valor encontrado ($8,93 \pm 0,09 \text{ g mL}^{-1}$) e calculado ($9,13 \text{ g mL}^{-1}$) estão em excelente concordância, confirmando a formulação proposta para o complexo **5**.

Tabela 10: Dados percentuais para os teores de C, N e H, experimentais e teóricos, para os complexos **5-8**

COMPOSTOS	%H	%C	%N
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)
Complexo 5	5,32 (5,39)	53,05 (55,95)	1,97 (1,92)
Complexo 6	5,10 (5,03)	57,60 (59,98)	3,09 (3,18)
Complexo 7	5,36 (5,47)	57,05 (56,56)	1,96 (2,00)
Complexo 8	4,92 (4,97)	62,83 (61,44)	3,47 (3,41)

Exp. = valor experimental . Calc. = valor calculado

4.2.2 - Espectros vibracionais no IV dos complexos **5-9**

A análise dos complexos **5-9** por IV envolve a comparação dos espectros dos ligantes livres e coordenados ao metal. Os espectros são examinados através dos estiramentos de bandas de grupos funcionais tais como C=O, C-O-C, C-OH fenólico, etc. Deslocamentos destas bandas podem dar informações em relação ao sítio de ligação no qual o metal está ligado. Também, o aparecimento de bandas Metal-O na região de baixas frequências é um indicativo da formação do complexo entre flavonóide, por exemplo, e o metal em questão.

Os espectros no IV dos complexos **5-9** e de seus respectivos ligantes livres foram obtidos em pastilhas de CsI.

4.2.2.1 - Espectro no IV do complexo 5

Os espectros dos ligantes livres fenantrolina e hesperidina e do complexo **5**, são apresentados na Figura 23 e as atribuições para os principais modos vibracionais estão sumarizados na Tabela 11.

No espectro vibracional do complexo **5** o pico da carbonila, que na hesperidina livre aparece em 1647 cm^{-1} , foi deslocada para menores frequências, aparecendo em 1601 cm^{-1} . Este deslocamento confirma que o grupo C=O perde suas características originais ao formar ligação coordenada com o metal.¹¹⁸ Esta observação também é confirmada pela presença da banda larga $\nu(\text{Mg-O})$ em aproximadamente 570 cm^{-1} .¹¹⁹

Além disso, a fenantrolina coordenada exibe deslocamento de alguns modos vibracionais para maiores frequências em comparação ao ligante livre. Por exemplo, o modo vibracional do estiramento simétrico CC e CN, que na fenantrolina livre aparece em 1503 cm^{-1} foi deslocado para regiões de maior número de onda (1516 cm^{-1}), típico para o quelante fenantrolina localizado na esfera de coordenação interna do íon Mg^{2+} ,¹²⁰ indicando que a coordenação ao centro metálico levou a um fortalecimento dessas ligações. A complexação da fenantrolina também levou a deslocamentos de algumas vibrações para frequências mais baixas, como por exemplo as vibrações assimétricas CC e CN, que na fenantrolina livre aparece em 1419 cm^{-1} foi deslocado para 1400 cm^{-1} , assim como as deformações CH de aromáticos. Sugere-se que como consequência da formação do anel rígido quelante de seis membros, ocorre uma diminuição na energia ressonante nos anéis aromáticos, resultando no enfraquecimentos dessas ligações.

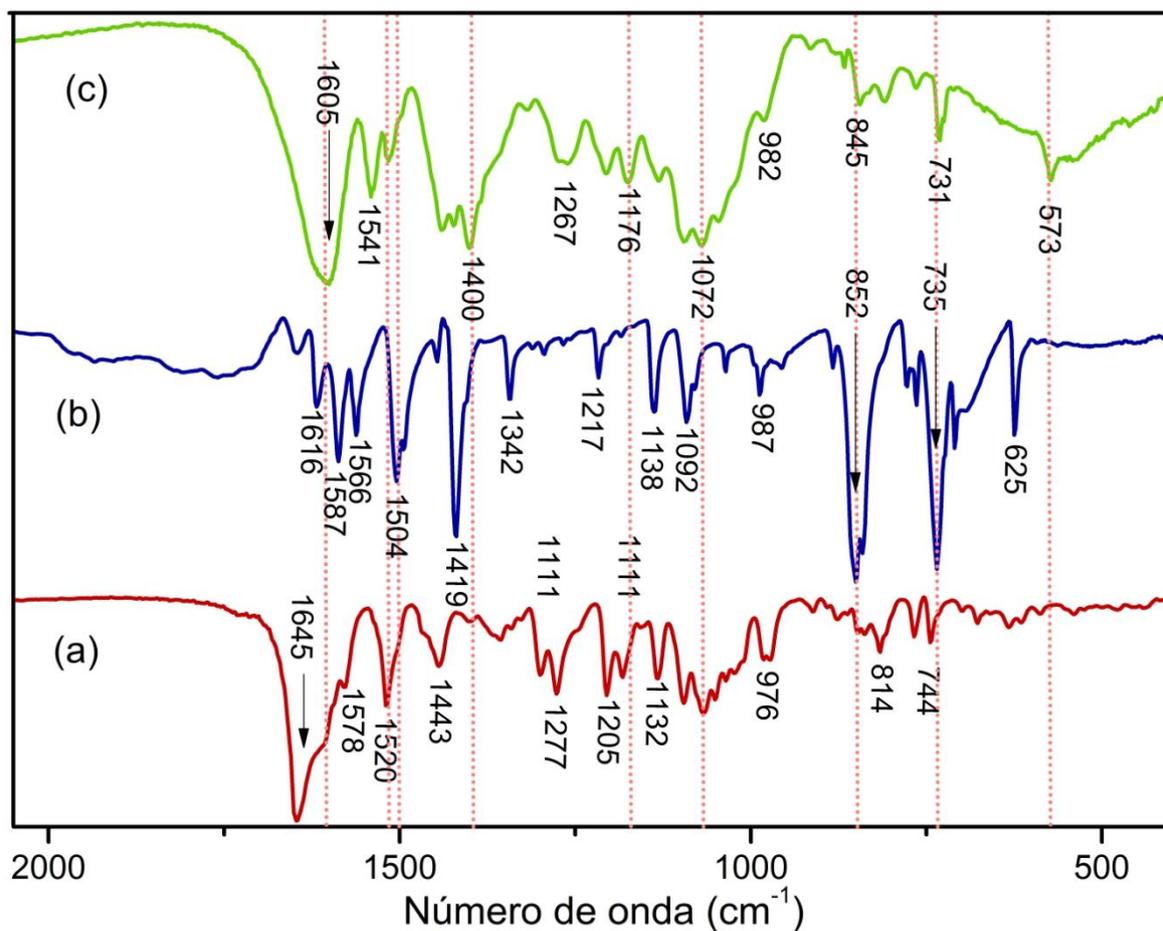


Figura 23: Espectro vibracional na região do infravermelho dos ligantes hesp (a) e phen (b) livres e do complexo **5** (c), em pastilhas de Csl na proporção 1:100.

Tabela 11: Frequências vibracionais e atribuições para as principais bandas para os ligantes hesperidina e fenantrolina livres e seu respectivo complexo **5**. As atribuições foram de acordo com a literatura¹¹²⁻¹¹⁴

Atribuições	Ligantes livres		Complexo 5
	Hesp	phen	
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1647 mF	-	1606 F
$\nu(\text{C}=\text{N})$	-	1579 F	1541 m1512 f
$\nu(\text{C}=\text{C})$	1609 F; 1579 f	1556 m	1442 F
$\nu(\text{C}-\text{O})$	1519 m	1520 m	1426 F
$\nu(\text{C}-\text{N})$	-	1250 F	1402 F; 1365 f
$\nu(\text{C}-\text{C})$	1447 m	1138 f	1269 m
$\delta(\text{COH}), \delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1285 F	-	1174 f
$\delta(\text{CH}_2)$	1196 F	-	1095 F, 1070 F
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{Aromático}}$	1090 f; 1072 mF	1083 f	846 f; 730 f
$\gamma(\text{C}-\text{H})$	817 m	852 F; 736 F	817 f
$\nu(\text{Mg}-\text{O})$	-	-	573 f

v deformação axial; δ deformação angular no plano; γ deformação angular fora do plano; f fraco; m médio; F forte, MF muito forte

4.2.2.2 - Espectros no IV dos complexos 6-9

Os espectros no IV dos complexos **6-9** são apresentados na Figura 24, 25, 26 e 27 e as atribuições para os principais modos vibracionais destes complexos estão sumarizados na Tabela 12.

Assim como no complexo **5**, no espectro vibracional do complexo **7** o pico da carbonila e do grupo C-O-C, que na naringina livre aparecem em 1647 e 1285 cm^{-1} , respectivamente, foram deslocados para menores frequências, aparecendo em 1608 e 1257 cm^{-1} , respectivamente. Também, uma banda larga referente a $\nu(\text{Mg}-\text{O})$ aparece em aproximadamente 600 cm^{-1} . Portanto, estes deslocamentos são sugestivos da coordenação da naringina ao íon Mg^{2+} no complexo **7** em seus respectivos complexos, através dos átomos de oxigênio dos grupos $5-\text{O}^-$ e C=O do anel condensado A-C.

Quanto ao espectro vibracional do complexo **9**, todas as observações feitas para a hesperidina coordenada ao íon Mg^{2+} no complexo **5** também foram aplicadas a este complexo, embora no complexo **9** alguns desses sinais tenha sido ligeiramente mais deslocados, provavelmente devido à ausência da fenantrolina na esfera de coordenação do íon Mg^{2+} .

Quanto aos complexos **6** e **8**, também foi verificado o deslocamento do pico da carbonila para regiões de menor frequência em comparação aos seus respectivos flavonóides livres. A absorção em aproximadamente 3200 cm^{-1} , devido às hidroxilas fenólicas nos ligantes livres hesperetina e naringenina mostram significativas mudanças espectrais nos complexos **6** e **8**, indicando a aquelação através deste grupo. Os dados espectrais dos complexos **6** e **8** também mostram uma banda larga em aproximadamente 3400 cm^{-1} , indicando água coordenada⁵⁴ A banda larga apresentada pelo espectro do complexo **9** também é sugestiva da presença de moléculas de água em sua estrutura.

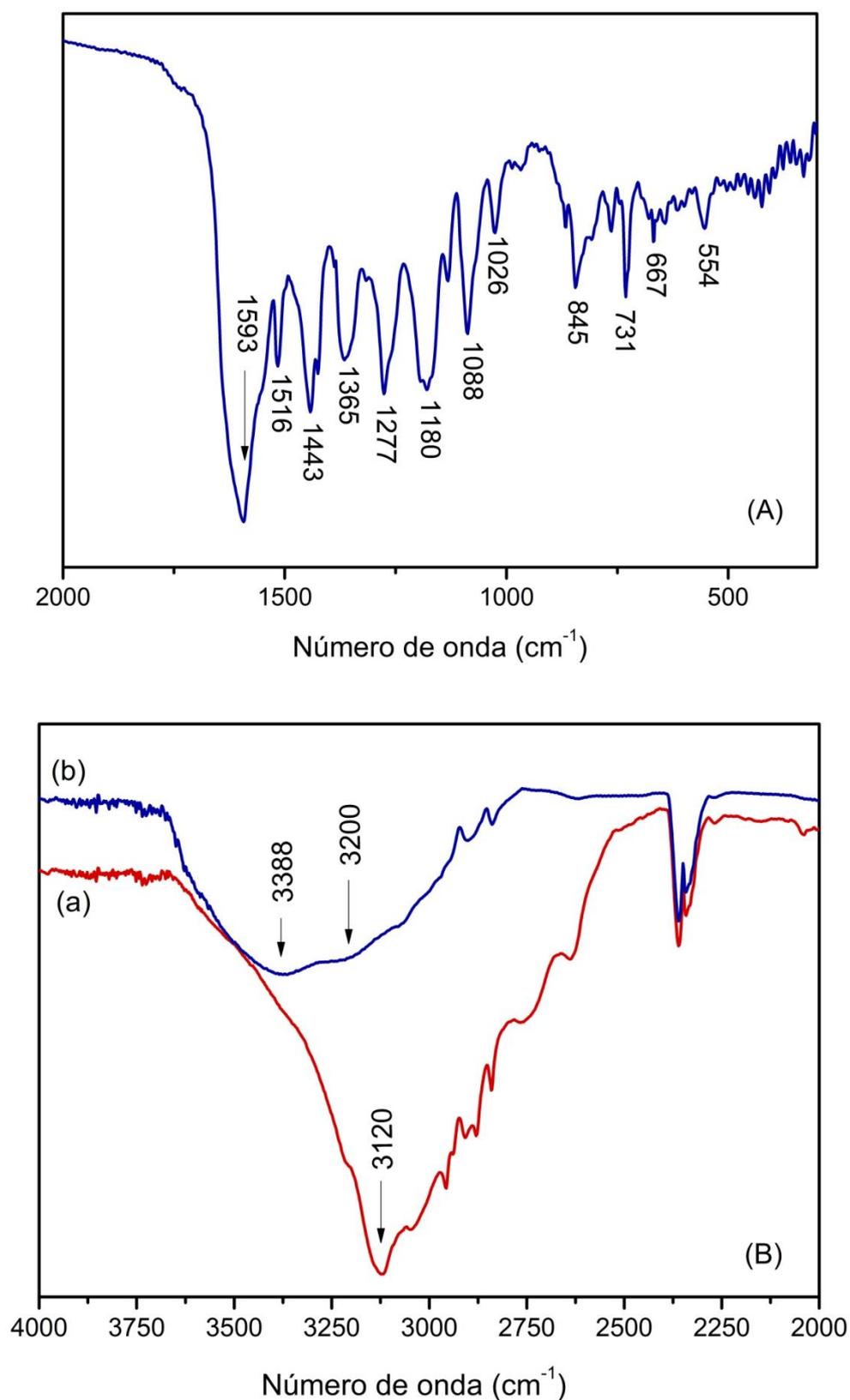


Figura 24: (A) Espectro vibracional na região de 2000-300 cm⁻¹ para o complexo **6**; (B) na região de 4000-2000 para a hesperetina livre (a) e o complexo **6** (b), em pastilha de Csl na proporção 1:100.

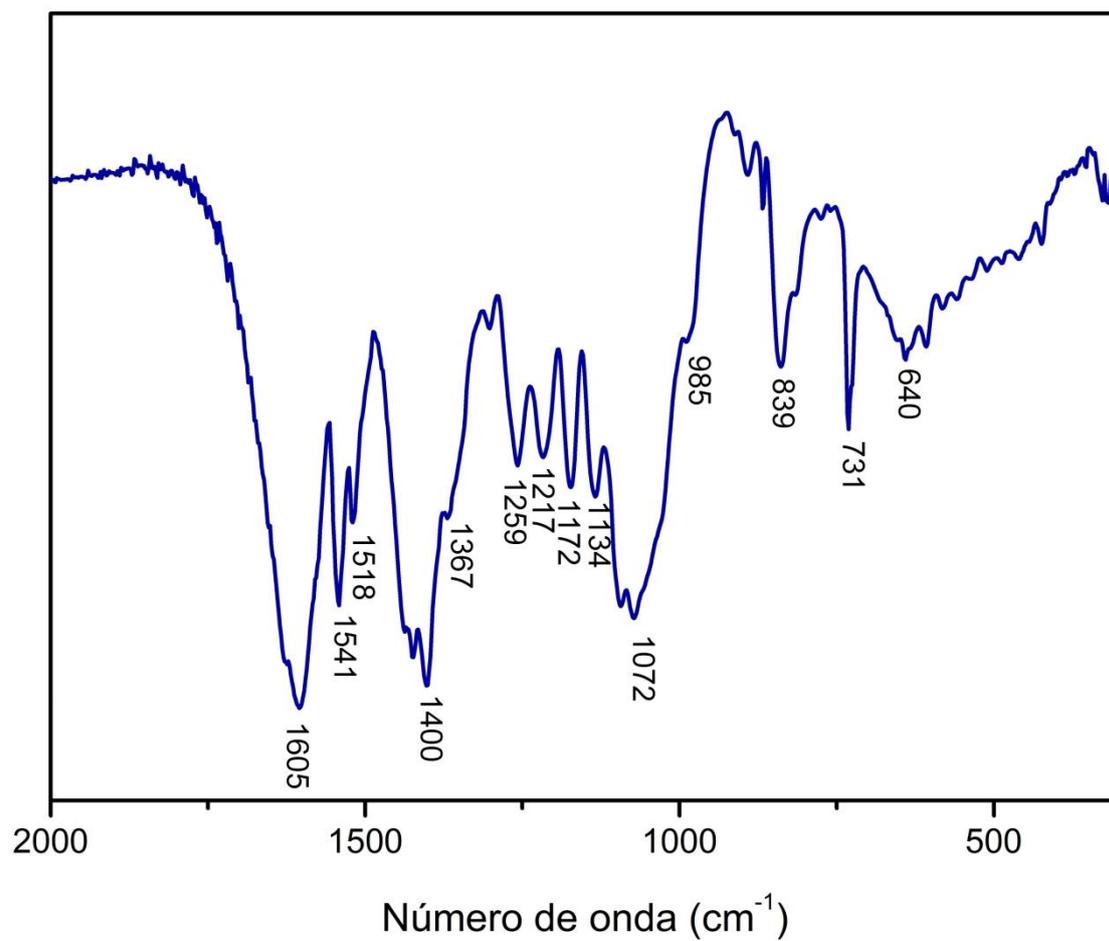


Figura 25: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo 7 em pastilha de Csl na proporção 1:100.

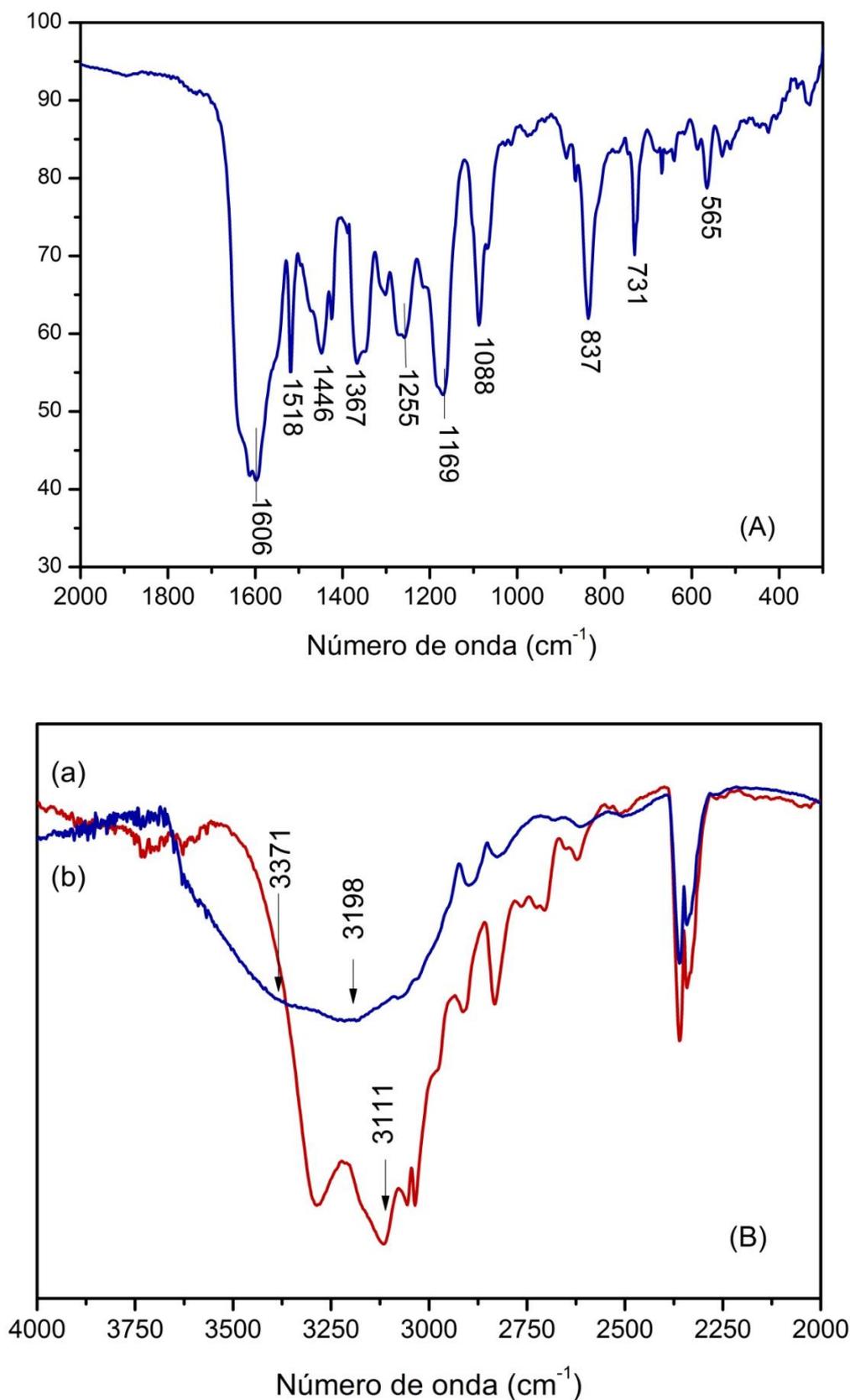


Figura 26: (A) Espectro vibracional na região de 2000-300 cm⁻¹ para o complexo **8**; (B) na região de 4000-2000 para a naringenina livre (a) e o complexo **8** (b), em pastilha de Csl na proporção 1:100.

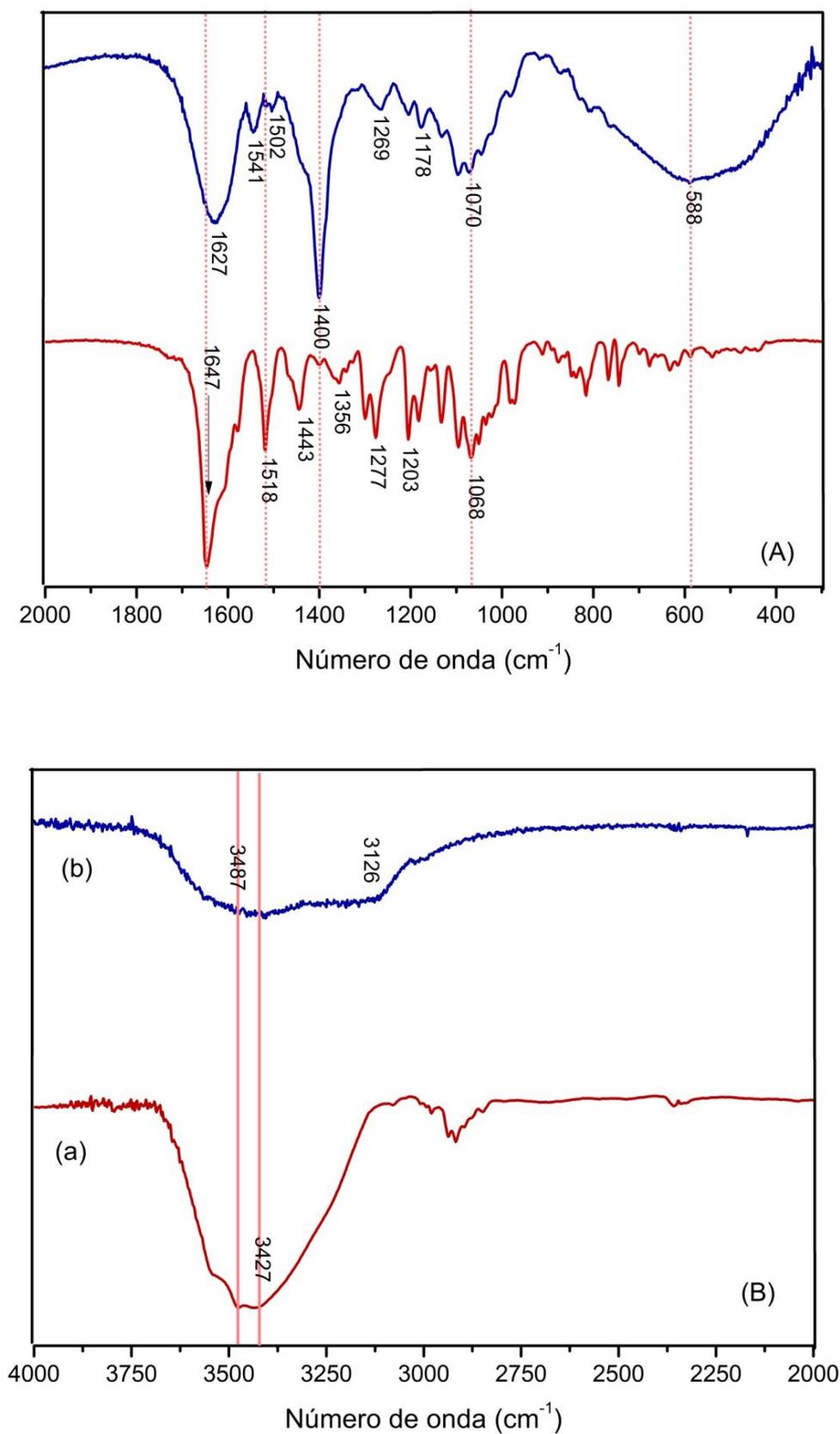


Figura 27: (A) Espectro vibracional na região de 2000-300 cm^{-1} para o complexo **9**; (B) na região de 4000-2000 para a hesperidina livre (a) e o complexo **9** (b), em pastilha de Csl na proporção 1:100.

Tabela 12: Freqüências vibracionais e atribuições para as principais bandas para os complexos 6-8. As atribuições foram de acordo com a literatura^{50, 112-114}

Atribuições	Complexo 6	Complexo 7	Complexo 8
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1595 F	1608 F	1606 F
$\nu(\text{C}=\text{N})$	1518 m	1543 m, 1520 m	1518 m
$\nu(\text{C}=\text{C})$	1443 F	-	1450 m
$\nu(\text{C}-\text{O})$	1423 f	1425 F	1425 f
$\nu(\text{C}-\text{N}, \text{C}-\text{C})$	1367 f	1402 F; 1365 f	1367 m
$\delta(\text{COH}),$ $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1277 F	1257 m	1267 F
$\delta(\text{CH}_2)$	1178 F	1171 m	1174 F
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{Aromático}}$	1088 F	1095 F; 1074 F	1088 F
$\gamma(\text{C}-\text{H})$	842 m; 731 m	834 m; 730 m	837 m, 731 m
$\nu(\text{Mg}-\text{O})$	555 f	607 f	567 f

ν : deformação axial; δ : deformação angular no plano; γ : deformação angular fora do plano; f: fraco; m: médio; F: forte, MF: muito forte

4.2.3 - Espectros eletrônicos no UV-Vis dos complexos 5-9

Os flavonóides apresentam duas bandas de absorção principais na região UV-Vis (Figura 28). As absorções na faixa de 320-385 nm correspondem à porção do anel B (sistema cinamoil, Banda I), e as absorções na faixa de 240-280 nm correspondem à porção do anel A (sistema benzoil, Banda II).⁵⁶

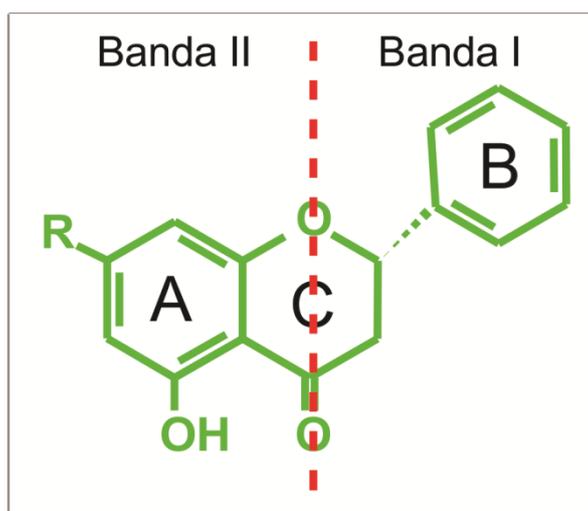


Figura 28: Estrutura geral da subclasse flavanona e a divisão das bandas I e II relatadas nos espectros de absorção.

Os espectros de absorção eletrônica em DMF, a 25 °C, dos ligantes livres hesperidina e fenantrolina e do complexo **5** estão apresentados na Figura 29(A), do ligante livre naringina e seu respectivo complexo **7** são mostrados na Figura 29(B) e do complexo **9** na Figura 29(C). As atribuições das bandas de absorção são mostradas na Tabela 13.

Os espectros estão relacionados com as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático das moléculas dos ligantes. Os espectros eletrônicos da fenantrolina e da hesperidina mostram bandas de absorção em 276 e 287 nm, respectivamente, atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos cromóforos (C=C) dos anéis aromáticos. Também foi observada uma banda de absorção de fraca intensidade no espectro da hesperidina em 333 nm, atribuída à transição menos permitida $\pi \rightarrow \pi^*$ da banda I. O espectro eletrônico do complexo **5** mostra bandas de absorção intensa em 266 e 284 nm, característica de transições intraligante ($\pi \rightarrow \pi^*$) dos ligantes fenantrolina e hesperidina (banda II). Também é observada uma banda de menor intensidade em 370 nm atribuída à transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (da banda I) nos ligantes hesperidina coordenados, a qual foi deslocada para regiões de menor energia em comparação à hesperidina livre.

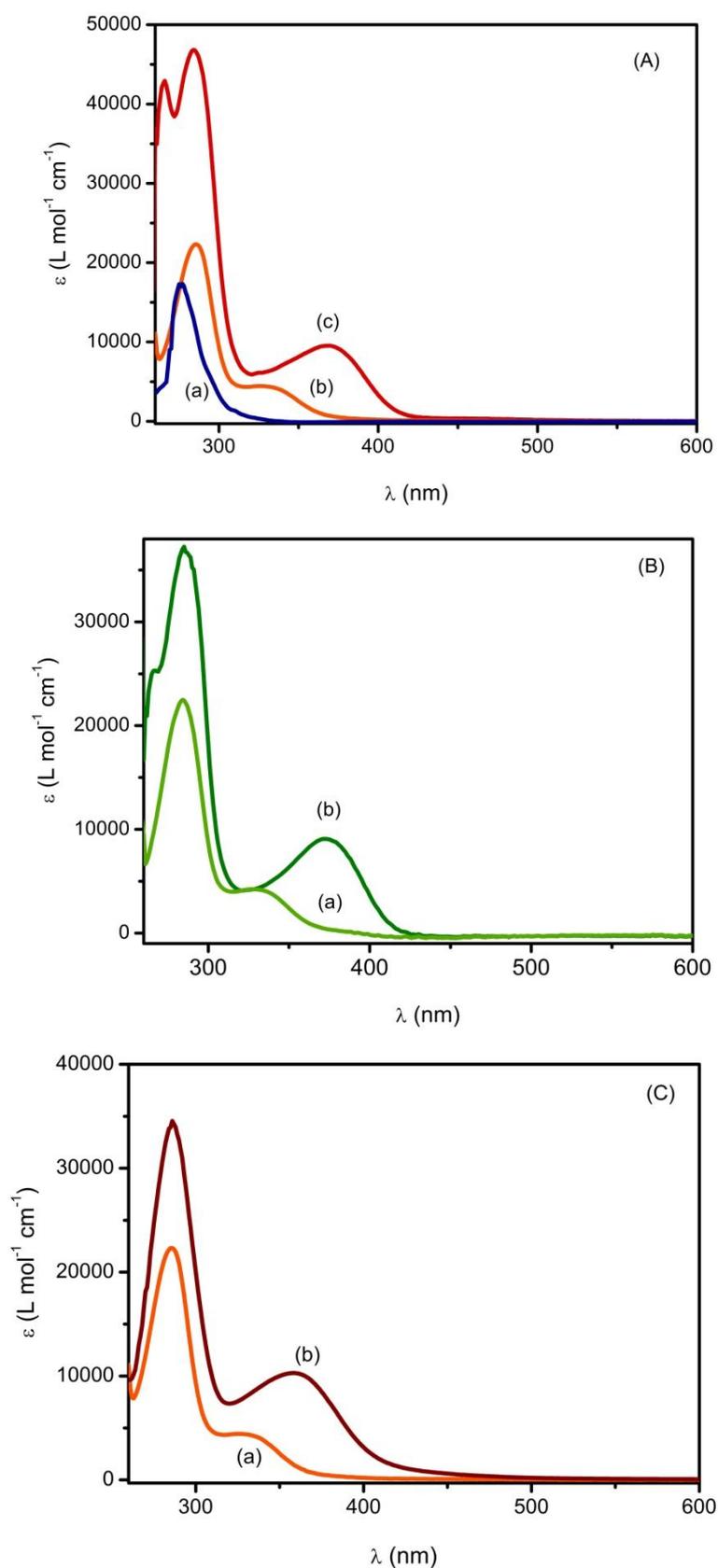


Figura 29: Espectros eletrônicos na região UV-Vis dos compostos: (A) 1,10'-fenantrolina (a), hesperidina (b) e complexo **5** (c); (B) naringina (a) e complexo **7** (b); (C) hesperidina (a) e complexo **9** (b), em DMF, à $25 \pm 0,1$ °C.

Deslocamentos similares aos descritos para o complexo **5** foram observados para os complexos **7** e **9** em relação aos flavonóides naringina e hesperidina livres, respectivamente. Os espectros de UV-vis também nos fornecem informações significativas quanto aos sítios de coordenação dos flavonóides, pois os espectros eletrônicos sugerem que os grupos C4=O e 5-OH dos ligantes hesperidina e naringina podem ser considerados como possíveis sítios de quelação ao íon Mg^{2+} em seus respectivos complexos, já que a interação de metais com o anel condensado de flavonóides nestas posições resulta em deslocamentos batocrômicos, conforme descrito na literatura para muitos compostos metal-flavonóide.¹²¹⁻¹²⁴ Estes deslocamentos batocrômicos podem ser explicados pela extensão do sistema conjugado com a complexação.

Desse modo, os espectros eletrônicos corroboram com a coordenação dos ligantes fenantrolina e os flavonóides hesperidina e naringina em seus respectivos complexos, ao centro metálico Mg^{2+} .

Tabela 13: Atribuições, λ (nm) e ε ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para as bandas de absorção observadas nos espectros na região UV-Vis dos ligantes fenantrolina, hesperidina e naringina livres e dos complexos **5**, **7** e **9**, em DMF

Compostos	Atribuições		
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (phen)	Banda II	Banda I
	λ (ε)	λ (ε)	λ (ε)
fenantrolina	276 (16900)	-	-
hesperidina	-	287 (22300)	333 (4300)
naringina	-	286 (19500)	330 (4200)
Complexo 5	266 (42900)	284 (46800)	370 (9500)
Complexo 7	266 (25300)	285 (37200)	373 (9100)
Complexo 9	-	286 (34500)	360 (10300)

Os espectros de absorção eletrônica em DMF, a 25 °C, do ligante livre hesperetina e do complexo **6** estão apresentados na Figura 30(A) e do ligante livre naringnina e seu respectivo complexo **8** são mostrados na Figura 30(B). As atribuições das bandas de absorção são mostradas na Tabela 14.

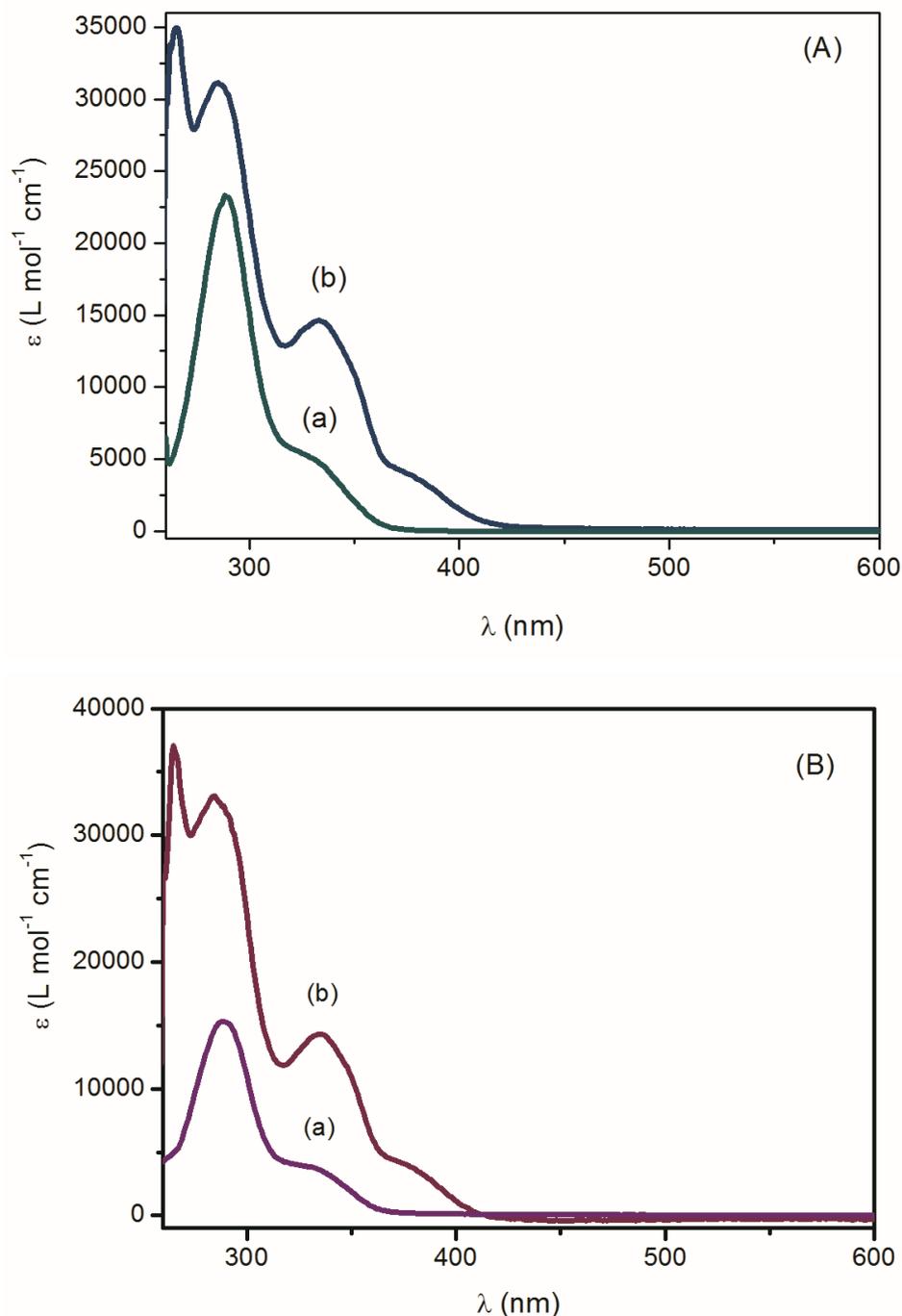


Figura 30: Espectros eletrônicos na região UV-Vis dos compostos: (A) hesperetina (a) e complexo **6** (b); (B) naringenina (a) e complexo **8** (b), em DMF, à $25 \pm 0,1$ °C.

Nos espectros eletrônicos, os máximos de absorção das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante fenantrolina e dos flavonóides hesperetina e naringenina (Banda II) aparecem nos complexos **6** e **8** na região de $265\text{-}285 \text{ cm}^{-1}$. Também, as bandas em aproximadamente 333 nm, atribuídas à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da Banda I, tornam-se mais permitidas nos complexo **6** e **8** do que em seus respectivos flavonóides livres

(hesperetina e naringenina), enquanto uma nova banda surge em aproximadamente 380 nm. Tal fato sugere que a coordenação destes flavonóides ao íon Mg^{2+} ocorre através da hidroxila ligada ao carbono 7 do anel A. Estes dados são coerentes com dados espectrais de RMN de 1H , os quais evidenciam a permanência do grupo 5-OH em sua forma protonada sem nenhuma alteração de acidez significativa. De fato isso já era esperado uma vez que o pKa do grupo 7-OH (pKa = 6,8)¹²⁵ é bem menor que do grupo 5-OH da hesperetina (pKa > 11,5)¹²⁵ e da naringenina (pKa = 12,5)¹²⁶ podendo, portanto, ser mais facilmente desprotonado pela trietilamina (pKa = 10,65).¹²⁷

Tabela 14: Atribuições, λ (nm) e ϵ (L mol⁻¹ cm⁻¹), para as bandas de absorção observadas nos espectros na região UV-Vis dos ligantes hesperetina e naringenina livres e dos complexos **6** e **8**, em DMF

Compostos	Atribuições		
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (phen)	Banda II	Banda I
	λ (ϵ)	λ (ϵ)	λ (ϵ)
hesperetina	-	289 (23200)	333 (4800)
naringenina	-	289 (15300)	333 (3700)
Complexo 6	265 (34900)	285 (31100)	334 (14600) 379 (3740)
Complexo 8	265 (37100)	284 (33100)	335 (14300) 380 (3700)

4.2.4 - Espectros de RMN de 1H dos complexos 5-9

Uma das principais características que podem ser observadas em um espectro de RMN de um composto de coordenação são os deslocamentos na densidade eletrônica (ou blindagem/desblindagem) dos átomos de hidrogênio do ligante após a complexação com o metal.

O espectro de RMN 1H do complexo **5** foi obtido em CD_3OD e $DMSO-d_6$ e os espectros dos complexos **6-9** foram obtidos em $DMSO-d_6$ a 25 °C. Pela integração da área dos sinais de hidrogênio no espectro de RMN 1H dos complexos **5-8**, verificou-se que os sinais correspondentes às porções flavonóide e 1,10'-fenantrolina estão presentes na proporção de 2:1, indicando que a esfera de

coordenação do íon Mg^{2+} é hexacoordenado com sítios quelantes de uma molécula fenantrolina e duas moléculas flavonóide (hesperidina, hesperetina, naringina ou naringenina, em seus respectivos complexos). Também, assim como ocorreu nos complexos de rutênio, descritos anteriormente, nos espectros de RMN 1H dos complexos **5**, **7** e **9** os sinais em 12,1 a 12,4 ppm correspondentes ao próton do grupo 5-OH dos flavonóides livres hesperidina e naringina estão ausentes em consequência de sua desprotonação por Et_3N e subsequente coordenação ao íon metálico Mg^{2+} . Cabe ressaltar que o espectro de RMN do complexo **5** também foi analisado em DMSO para certificação de que o sinal do próton do grupo 5-OH teria desaparecido, já que essa análise em MeOH não é possível.

4.2.4.1 - RMN de 1H do complexo **5**

O espectro do complexo **5** está apresentado na Figura 31 e as atribuições para os principais sinais, utilizando a numeração do Esquema 2, estão resumidas na Tabela 15.

Como mostrado na estrutura numerada no esquema 2 e evidenciado na estrutura otimizada por cálculos teóricos descritos posteriormente, dois tipos diferentes de ambientes químicos são esperados para os dois ligantes hesperidina. Os sinais dos prótons H-2, H-3_{ax} e H-3_{eq} do anel C, o qual está localizado próximo do grupo 7-raminoglicosídeo aparecem em 5,39, 2,78 e 3,13 ppm, respectivamente, enquanto que no anel Cc aparecem em 5,25, 2,75 e 3,03 ppm, respectivamente. Sugere-se que este pequeno deslocamento para campo mais alto observado para o anel C em relação ao Cc é devido á sua proximidade com o do grupo 7-raminoglicosídeo, rico em densidade eletrônica, coerente com a estrutura otimizada por cálculos DFT descrita posteriormente. Também foram observados dois prótons anoméricos da glicose em 4,94 e 4,80, dois prótons anoméricos da ramnose em 4,0 ppm, dois sinais metoxi em 3,86 e 3,85 e um sinais do grupo metila em 1,19 ppm correspondente a 6H (equivalentes a dois grupos metila).

As características do espectro de RMN de 1H do complexo **5** bem como o número total de sinais de hidrogênio é consistente com a formação de um centro metálico Mg^{2+} hexacoordenado via quelação de um ligante fenantrolina e dois ligantes hesperidina, além de sugerir a presença de um plano de simetria que faz com que os sinais de hidrogênio da fenantrolina permaneçam equivalentes mesmo

após a coordenação, Tabela 15, conforme também evidenciado na estrutura otimizada por cálculos DFT descrita posteriormente.

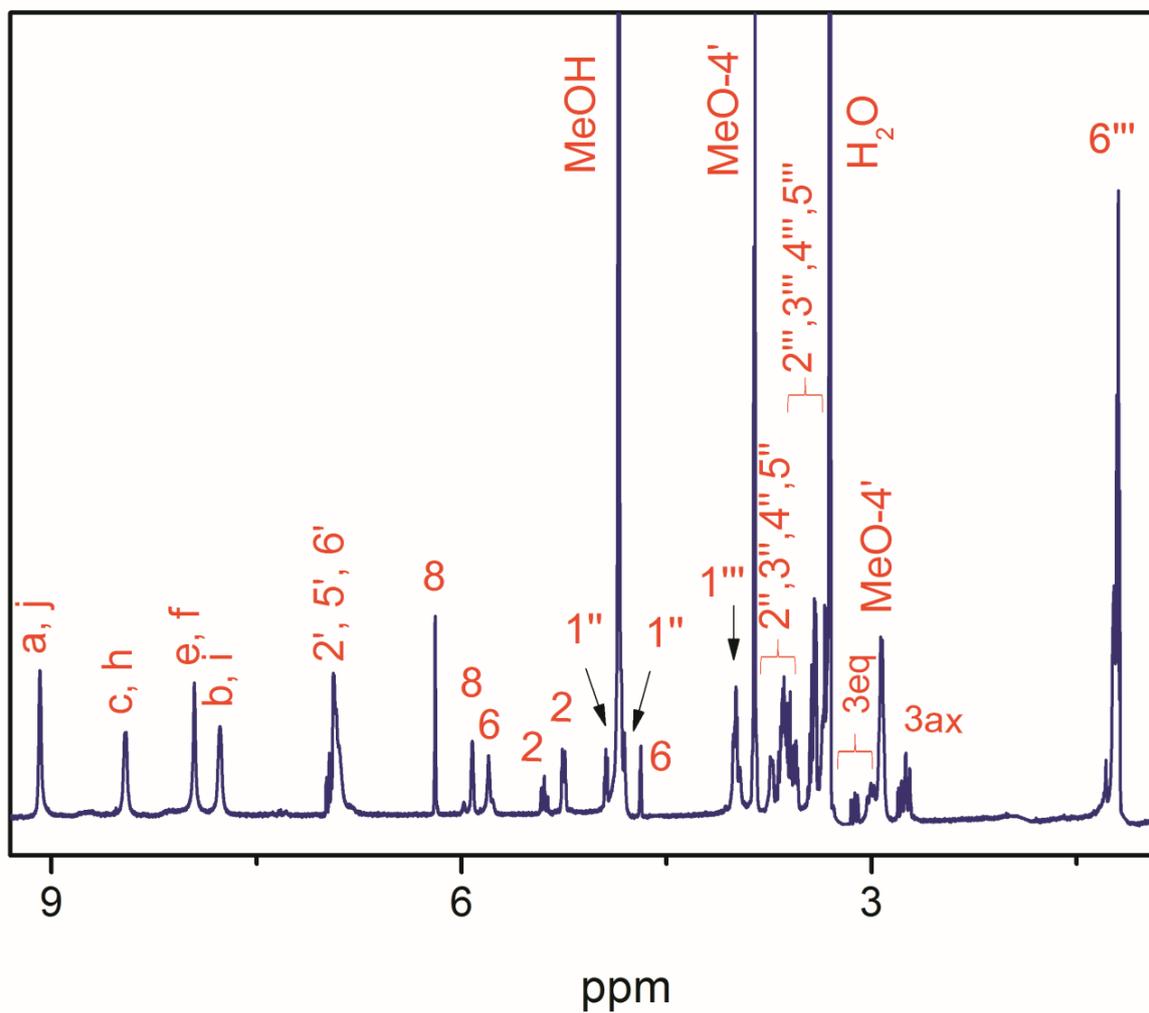


Figura 31: Espectro de RMN ^1H do complexo **5** em CD_3OD à $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 15: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H dos ligantes hesperidina e 1,10'-fenantrolina livres e do complexo **5** em CD_3OD

H	Hesperidina	Complexo 5
2	5,39 (dd, 2,87; 15,56) – 1H	5,39 (dd; 2,88; 15,18) – 1H; 5,25 (d; 11,46) – 1H
6	6,19 (s) - 1H	5,8 (s) – 1H; 4,69 (d, 3,94) – 1H
8	6,19 (s) - 1H	5,9 (s) – 1H; 6,2 (s) – 1H
2'	6,96 (m) -1H	6,9 (m) – 2H
5'	6,96 (m) - 1H	6,9 (m) – 2H
6'	6,96 (m) - 1H	6,9 (m) – 2H
1''	4,94 (dd, 3,56, 3,97) - 1H	4,94 (d; 6,0) – 1 H; 4,8 (s) – 1H
2'', 3'', 4'', 5''	3,44 (m) - 4H	3,40 – 3,64 (m) – 8H
1'''	4,69 (m) - 1H	4,00 (m) – 2H
2''', 3''', 4'''	3,61 (m) - 3H	3,20 – 3,40 (m) – 6H
5'''	4,00 (m) - 1H	3,20 – 3,40 (m) – 2H
3ax	2,75 (dd, 3,0, 17,25) – 1H	2,78 (dd; 3,0) – 1H; 2,75 (dd; 2,9; 16,8) – 1H
3eq	3,12 (m) – 1H	3,13 (dd; 12,4; 17,7) – 1H; 3,03 (m) – 1H
6''	3,89 (m) - 1H	3,64 – 3,66 (m) – 2H
6'''	1,19 (dd, 1,76, 4,42) - 3H	1,19 (t; 7,32) – 6H
MeO-4'	3,86 (s) – 3H	3,85 (d; 5,76) – 3H; 2,92 (d, 6,35) – 3H
	1,10'-fenantrolina	Complexo 5
a, j	9,04 (m) – 2H	9,09 (s) – 2H
b, i	7,70 (m) – 2H	7,76 (s) – 2H
c, h	8,37 (m) – 2H	8,46 (s) – 2H
e, f	7,84 (m) – 2H	7,95 (s) – 2H
s = singleteo; sl = singleteo largo; d= dubleteo; dd =duplo dubleteo; m = multipleteo; t = tripleteo		

4.2.4.2 - RMN de ^1H dos complexos 6-9

Os espectros de RMN ^1H dos complexos **6-9** estão apresentados nas Figuras 32, 33, 34 e 35, respectivamente, e as atribuições dos sinais de hidrogênio para tais complexos, utilizando a numeração do Esquema 2, estão descritas na Tabela 16.

Assim como para o complexo **5**, também foi observado a ausência do sinal do próton do grupo 5-OH no espectro de RMN ^1H dos complexos **7** e **9**, devido à substituição do íon H^+ pelo íon Mg^{2+} .

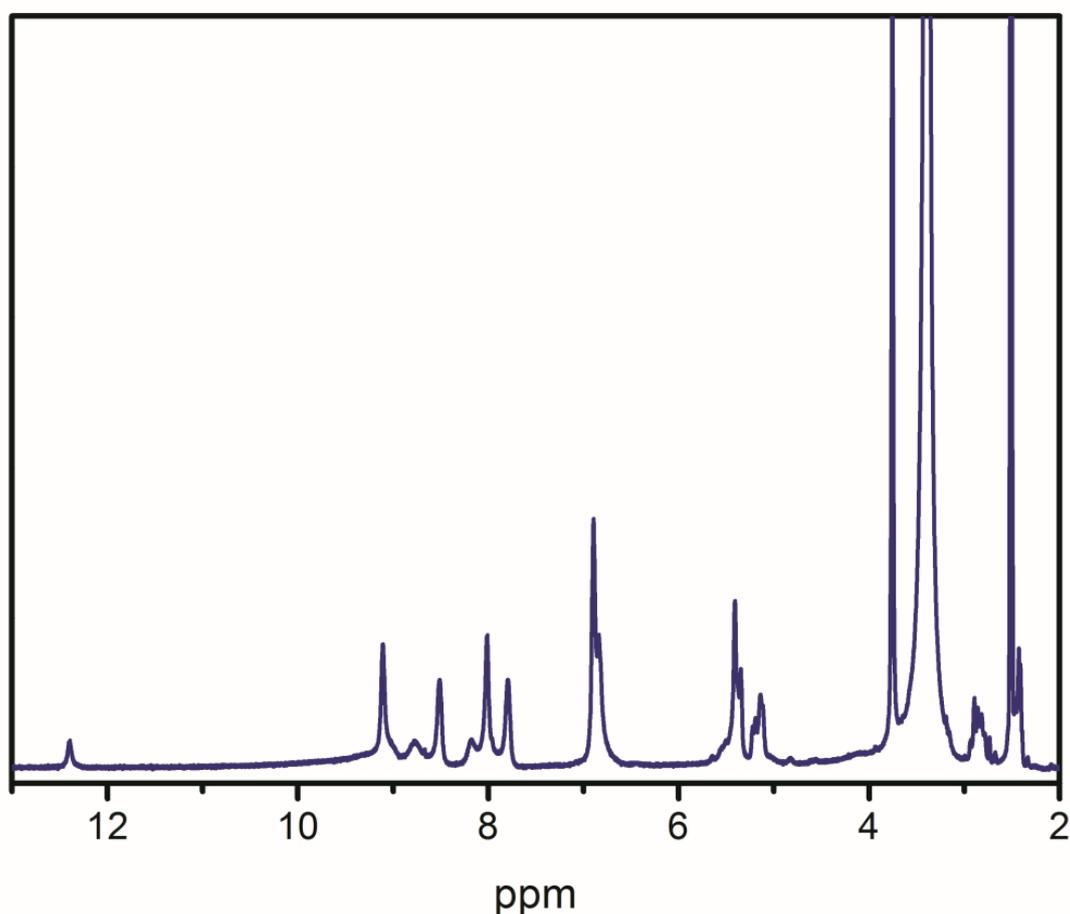


Figura 32: Espectro de RMN ^1H do complexo **6** em $\text{DMSO-}d_6$ à 25 °C.

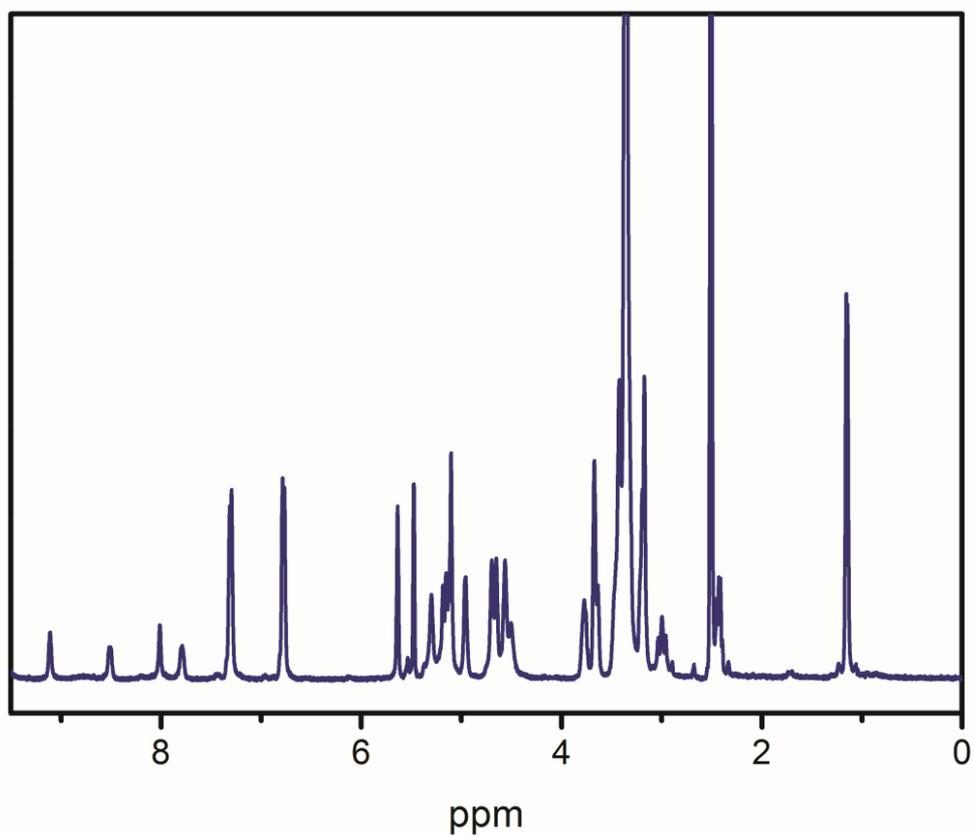


Figura 33: Espectro de RMN ¹H do complexo **7** em DMSO-*d*₆ à 25 °C.

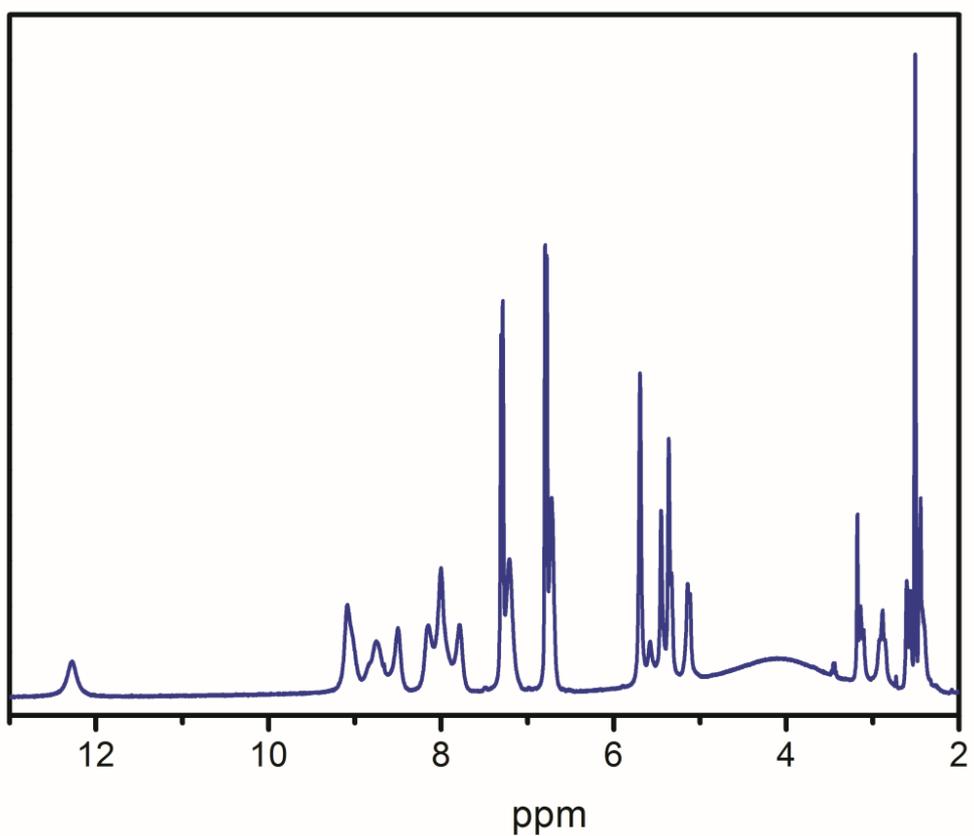


Figura 34: Espectro de RMN ¹H do complexo **8** em DMSO-*d*₆ à 25 °C.

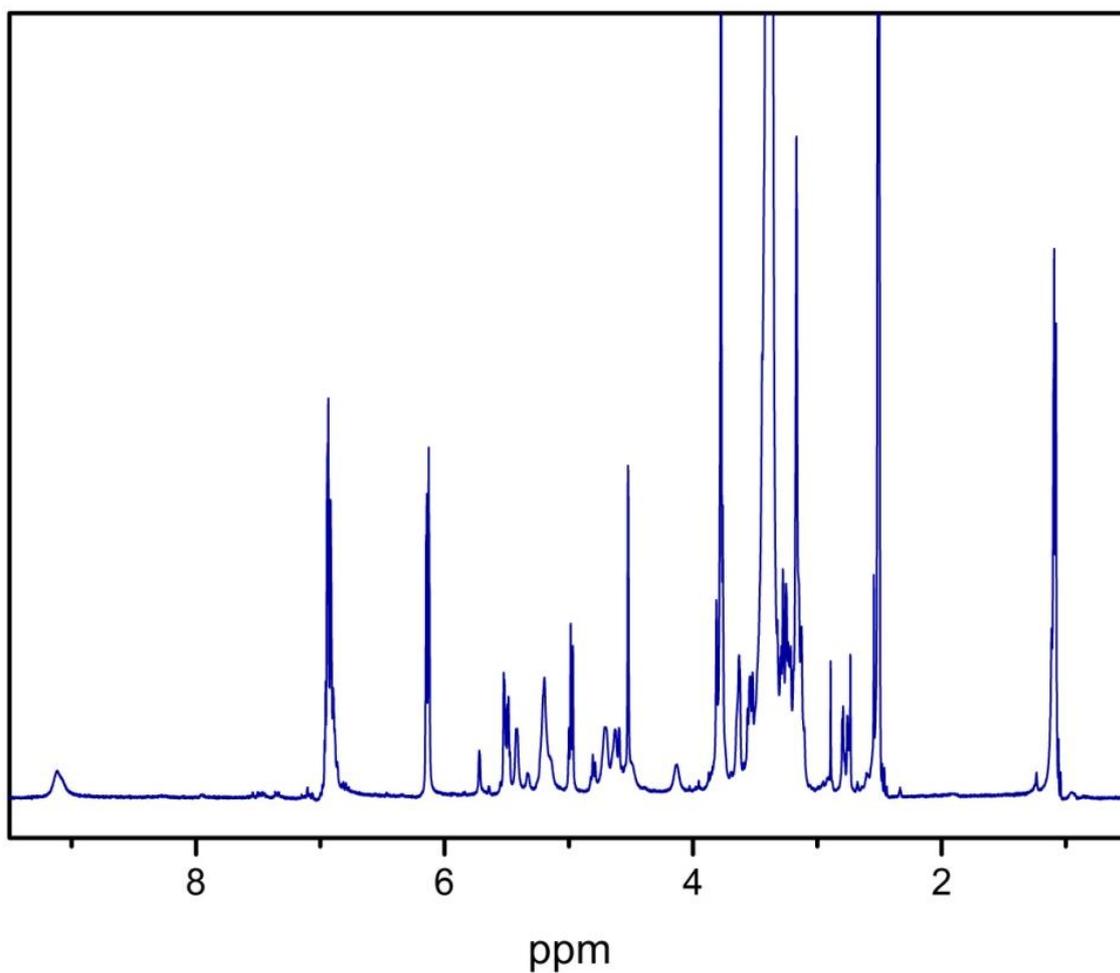


Figura 35: Espectro de RMN ^1H do complexo **9** em $\text{DMSO-}d_6$ à $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 16: Atribuições para os principais sinais (δ ppm (J/Hz)) dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **6-8** em $\text{DMSO-}d_6$

H	Complexo 6	Complexo 7	Complexo 8	Complexo 9
posições	δ (J)	δ (J)	δ (J)	δ (J)
2	5,14, m – 2H	5,30, s – 2H	5,14, d (10,88) – 1H; 5,36, s – 1H	5,50, dd (2,77; 12,65 – 2H)
3ax	2,43, m – 2H	2,4, m – 1H; 3,0, m – 1H	2,6, d (16,67) – 2H	2,74 m – 2H
3eq	2,86, m – 2H	3,0, m – 2H	3,14, m – 1H; 2,88, m – 1H	2,90, s – 1H; 2,80, m – 1H
6	5,41, m – 4H	5,64, s – 1H	5,69, s – 2H	6,13, dd (2,38; 8,22) – 4H
8		5,48, s – 2H	5,45, s – 1H; 5,35, s – 1H	
2'	6,98, sl – 2H	7,27, s – 2H	7,21, sl – 2H	6,93, m – 2H
3'	-	6,75, s – 2H	6,72, sl – 2H	-
5'	6,98, sl – 2H	6,75, s – 2H	6,79, d (7,71) – 2H	6,93, m – 2H
6'	6,98, sl – 2H	7,27, s – 2H	7,30, d (7,12) – 2H	6,93, m – 2H
4'-OCH ₃	3,76, s – 6H	-	-	3,77, s – 6H
Glc-1''	-	5,18, m – 2H	-	4,98, t (6,78) – 2H
Rha-1'''	-	5,13, m – 2H	-	4,70, m – 2H
6'''	-	1,16, d (5,58) – 6H	-	1,09, dd (2,18; 6,24) – 6H
5-OH	12,4 – 2H	-	12,3 – 2H	-
3'-OH	-	-	-	9,11
a, j	9,10, s – 2H	9,09, s – 2H	9,09, s – 2H	-
b, i	7,77, s – 2H	7,80, s – 2H	8,16, s – 1H; 7,79, s – 1H	-
c, h	8,51, s – 2H	8,52, s – 2H	8,75, s – 1H; 8,50, s – 1H	-
e, f,	8,02, s – 2H	8,02, s – 2H	8,00, s – 2H	-

s = singlete; sl = singlete largo; d= dublete; dd =duplo dublete; m = multiplete; t = tripleto

De modo geral, os deslocamentos químicos observados para os sinais de ^1H nos complexos **5-9** são consistentes com a redistribuição de elétrons- π nos flavonóides quando coordenados ao íon Mg^{2+} em seus respectivos complexos.

4.2.5 - Cálculos computacionais

Embora a coordenação de ligantes do tipo fenantrolina a íons Mg^{2+} sejam relativamente bem estudadas, ainda pouco se sabe sobre a coordenação de flavonóides a estes íons. Portanto, a análise teórica de tais estruturas também é importante. Assim, a análise estrutural do complexo **5** também foi feita por cálculos computacionais usando a metodologia do funcional de densidade, DFT. A geometria otimizada na fase gasosa é apresentada na Figura 36 e os comprimentos de ligação e ângulos selecionados estão listados na Tabela 17.

Pela análise dos dados, observa-se que no complexo **5**, o centro metálico Mg^{2+} exibe um ambiente de coordenação octaédrico distorcido definida por dois átomos de N da 1,10'-fenantrolina e quatro átomos de oxigênio de duas moléculas de hesperidina, em uma configuração *cis* e simetria C1. Isto é consistente com a literatura, já que sabe-se que o íon Mg^{2+} , com raio iônico de 0,72 Å, é apropriado para um número de coordenação 6,⁶⁷ e que em soluções aquosas estes cátions são geralmente encontrados com seis ligantes coordenados de maneira octaédrica.^{68, 128} O grau de distorção octaédrica apresentada pelo complexo **5** pode ser observado pelos ângulos de torção de 75,40° para (phen)N163-Mg-N154(phen) e 96,91 para (hesp)O75-Mg-O78(hesp), Tabela 17.

Também foi verificado que as distâncias Mg-N154(phen), 2,20 Å, e Mg-N163(phen), 2,23 Å, são comparáveis às distâncias encontradas em complexos do tipo Mg(II)-phen, como por exemplo no complexo $[\text{Mg}(\text{SO}_4)(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3]$.¹²⁹ Além disso, foi observado uma deslocalização de carga na parte hesperidina da molécula do complexo **5**, o que já era esperado já que cada ligante hesperidina está coordenada ao íon Mg^{2+} através de dois átomos de oxigênio diferentes (C5-O⁻ e C4=O). Assim, a distância de ligação observada para ambos Mg-O2 e Mg-O78 foi de 1,99 Å, enquanto que para Mg-O75 e Mg-O151 foi de 2,07. No entanto, os comprimentos das ligações Mg-O2 e Mg-O78 são mais curtos devido à interação mais forte entre os grupos C5-O⁻ da hesperidina desprotonada (ricos em densidade

de eletrônica) e o cátion "duro" Mg^{2+} não-polarizável, o qual possui alta densidade de carga e forte afinidade por ligantes contendo átomos de oxigênio "duros".¹³⁰

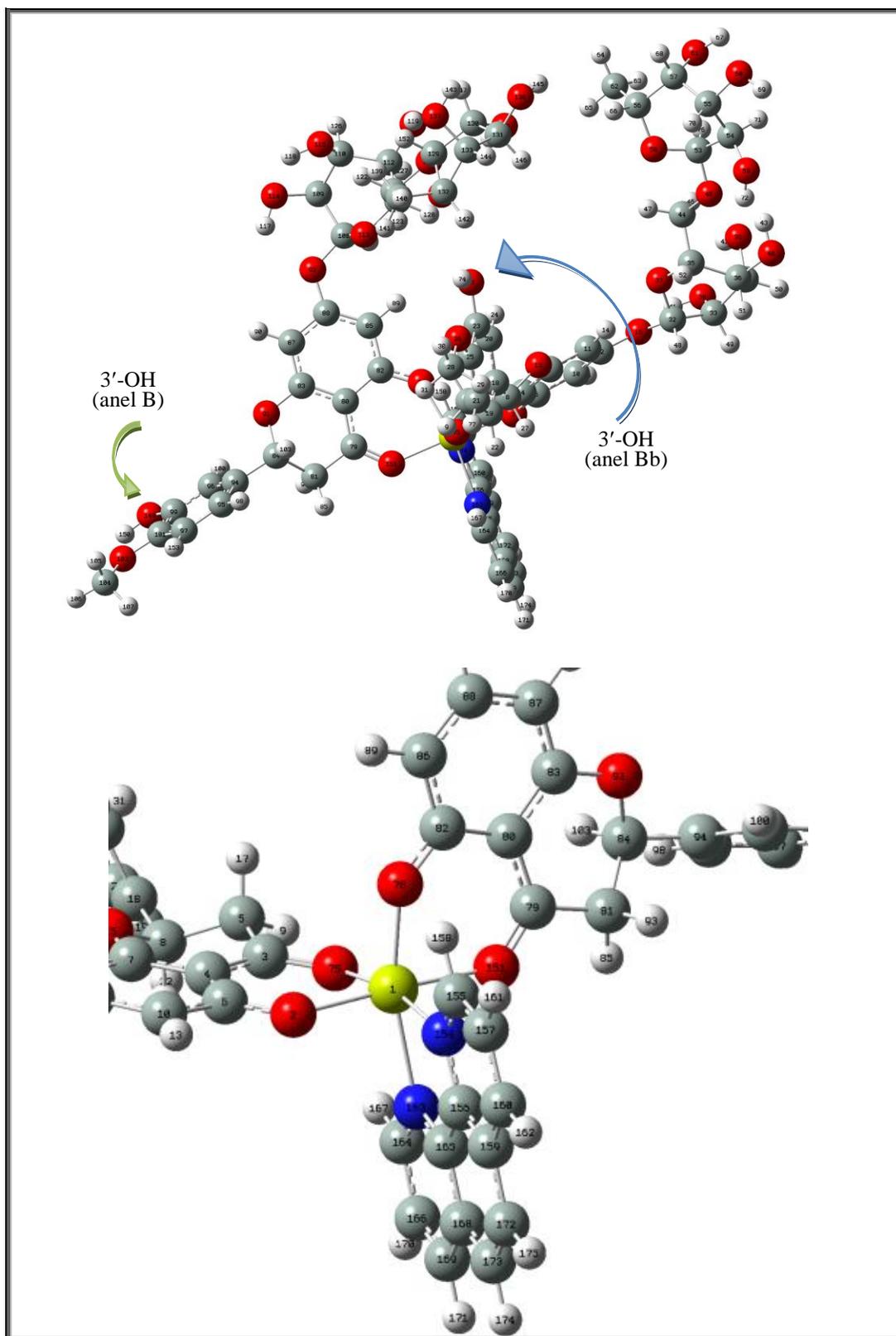


Figura 36: Geometria otimizada por cálculos computacionais para o complexo **5**, a estrutura mais estável, observada por diferentes ângulos.

Tabela 17: Comprimentos de ligação e alguns ângulos de ligação selecionados da estrutura otimizada do complexo **5**

Comprimentos de ligação (Å)		Ângulos de ligação (°)	
Mg-O2(hesp)	1,99	(hesp)O151-Mg-O78(hesp)	83,80
Mg-O75(hesp)	2,06	(hesp)O2-Mg-O75(hesp)	84,30
Mg-O78(hesp)	1,99	(hesp)O75-Mg-O78(hesp)	96,91
Mg-O151(hesp)	2,07	(hesp)O151-Mg-N154(phen)	92,18
Mg-N154(phen)	2,20	(phen)N163-Mg-O2(hesp)	91,00
Mg-N163(phen)	2,23	(phen)N163-Mg-N154(phen)	75,40

O elevado efeito estérico imposto por três ligantes quelantes (uma phen e duas hesp) na esfera de coordenação do íon Mg^{2+} faz com que ocorra uma distorção acentuada no grupo 7-raminoglicosídeo terminal, favorecendo as ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila adjacentes e o grupo 3'-OH do anel B. Adicionalmente, a análise de carga de Mullikan para o complexo **5** mostra que a carga negativa no grupo -OH da posição 3' do anel B da hesperidina livre é reduzida para -0,08 quando o complexo é formado. Isto indica um aumento na acidez do grupo 3'-OH, o que facilita a desprotonação desta hidroxila no complexo. Os dados de RMN de 1H descritos acima são consistentes com estas observações. Estas características também são importantes para a análise das propriedades fotofísicas e biológica, como anti-oxidante por exemplo, conforme será descrito posteriormente.

Assim, com base nas caracterizações feitas por IV, UV-Vis e RMN 1H a possíveis estruturas sugeridas para os complexos **5-9** são apresentados na Figura 37.

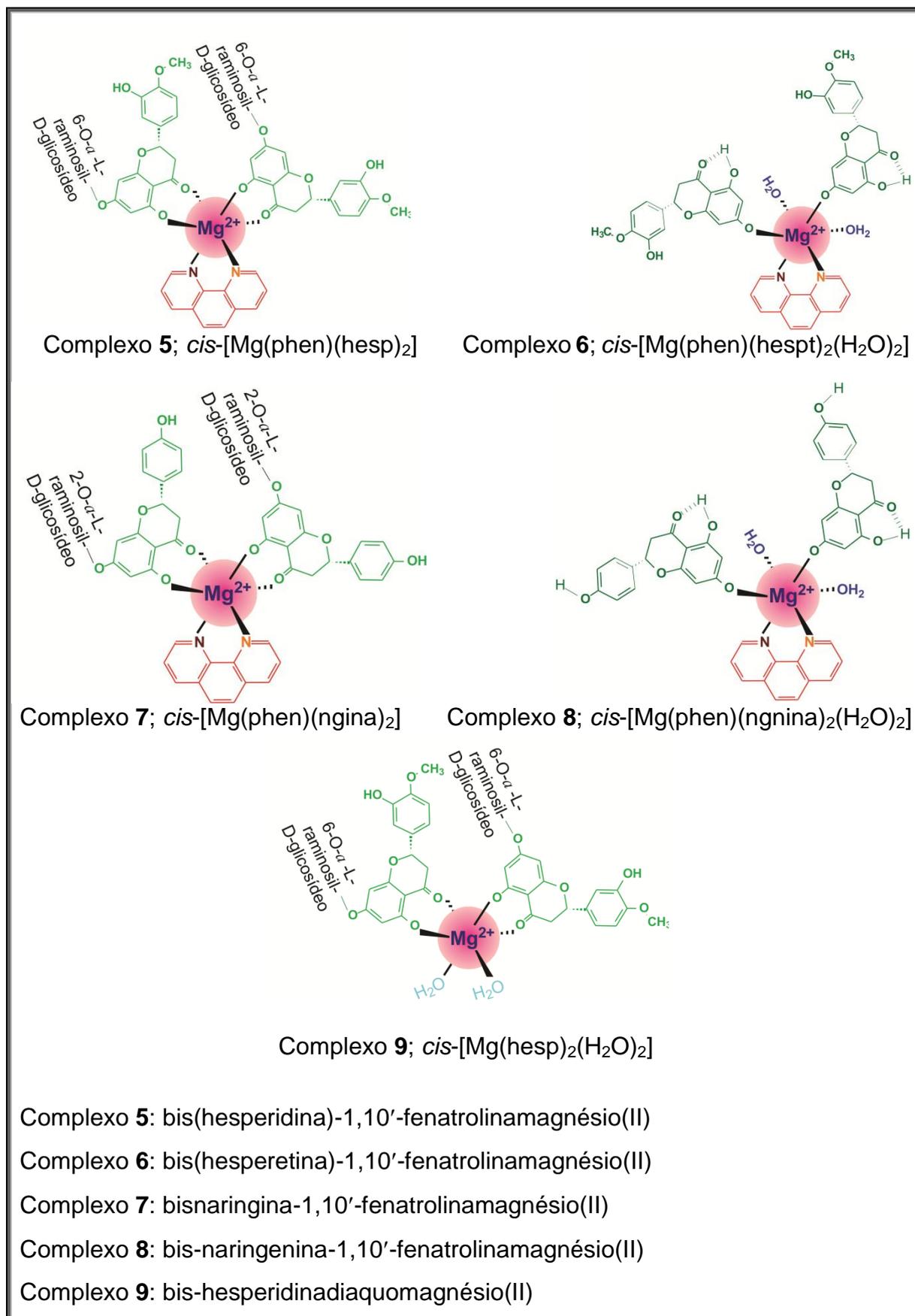


Figura 37: Estruturas sugeridas para os complexos 5-9.

4.2.6 - Propriedades emissivas

Os espectros de emissão e excitação do complexo **5** em MeOH são apresentados na Figura 38. Sob excitação em 370 nm, o complexo apresenta emissão intensa em 490 nm. O espectro de excitação ($\lambda_{em} = 490$ nm) assemelha-se ao espectro de absorção, porém, a banda em 370 (atribuída às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da Banda I, em coerência com os dados de absorção para este complexo) possui maior intensidade em comparação à banda em 282 nm, sugerindo que esta transição é a principal responsável pela emissão. O deslocamento de Stokes medido em metanol foi 5780 cm^{-1} e a partir das medidas feitas por TCSPC (método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo - em inglês, *Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC) o melhor ajuste do decaimento de emissão foram obtidos com uma curva tri-exponencial com tempos de vida de 5,749 ns ($A=2007,3$); 1,433 ns ($A=37217,17$) and 0,307 ns ($A=7162,32$).

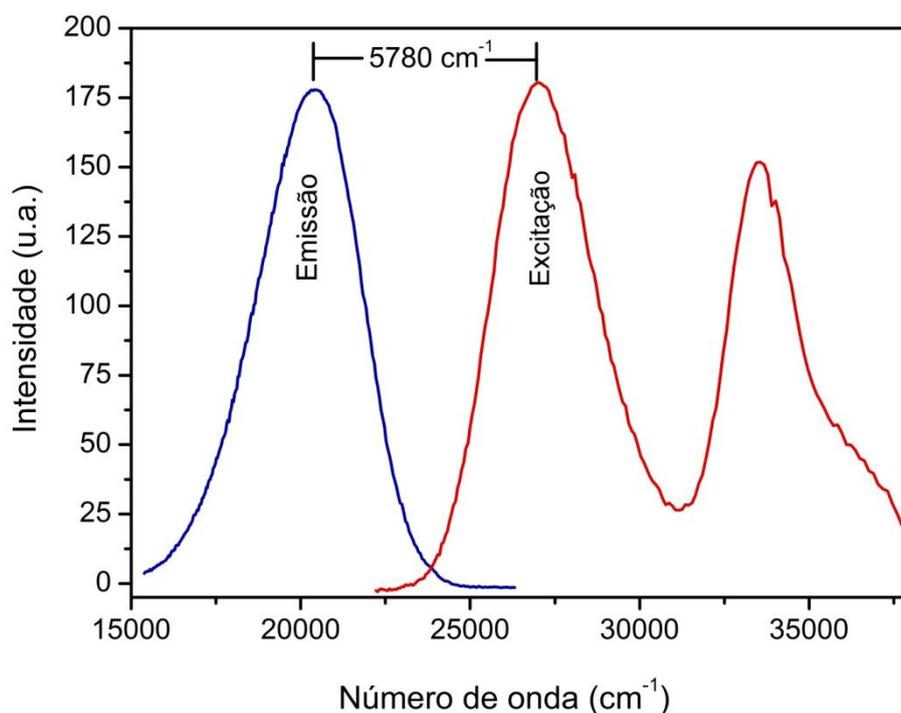


Figura 38: Espectros de emissão e excitação do complexo **5** (2×10^{-5} M) obtidos em metanol, à 25 °C.

4.2.6.1 - Luminescência em diferentes solventes

As propriedades emissivas do complexo **5** são também dependentes do solvente, conforme mostra a Figura 39. Em solventes doadores como DMSO e DMF, por exemplo, estes complexos exibem emissão intensa em 467 nm, e nos respectivos espectros de excitação é observado que a intensidade da banda em 298 nm é aproximadamente $\frac{1}{2}$ da intensidade da banda em 370 nm, sugerindo que a transição, $\pi \rightarrow \pi^*$ é a principal responsável pela emissão em solventes doadores. Já em solventes aceitadores como acetonitrila, por exemplo, o complexo **5** apresenta fraca luminescência, em que as intensidades das bandas em 298 e 370 no espectro de excitação ($\lambda_{em} = 490$ nm) são similares, indicando que ambas transições ($\pi \rightarrow \pi^*$ das Bandas I e II) são responsáveis pelas propriedades emissivas do complexo **5** neste solvente. Também foi verificado que a luminescência do complexo **5** foi completamente suprimida em ciclohexano (solvente apolar e essencialmente não solvatante) e em água pura (solvente polar e fortemente solvatante). Estes resultados fornecem evidência de dois estados excitados emissivos em solução, sugerindo-se a presença de dois confômeros em solução, os quais podem ser produzidos em função de ligação de hidrogênio intramolecular envolvendo os grupos 3'-OH e 4'-OCH₃, ambos no anel B, (3'-O---H---OCH₃) e/ou entre o grupo 3'-OH e as hidroxilas das raminaes adjacentes (3'-O---H---OH(raminose)). Cabe ressaltar que a hesperidina livre não é luminescente em solventes orgânicos. Assim, sugere-se que a parte [Mg(phen)²⁺] tem um efeito estabilizador na emissão do ligante hesperidina coordenado.

Também foi observado que o complexo **5** é altamente luminescente quando solubilizado em n-octanol, Figura 39. Este dado é bastante relevante para sistema biológicos, já que a biodistribuição de um composto em octanol é similar à distribuição nas membranas lipídicas de sistemas vivos. Assim, sugere-se que o complexo **5** também pode funcionar como um biomarcador luminescente em meio celular.

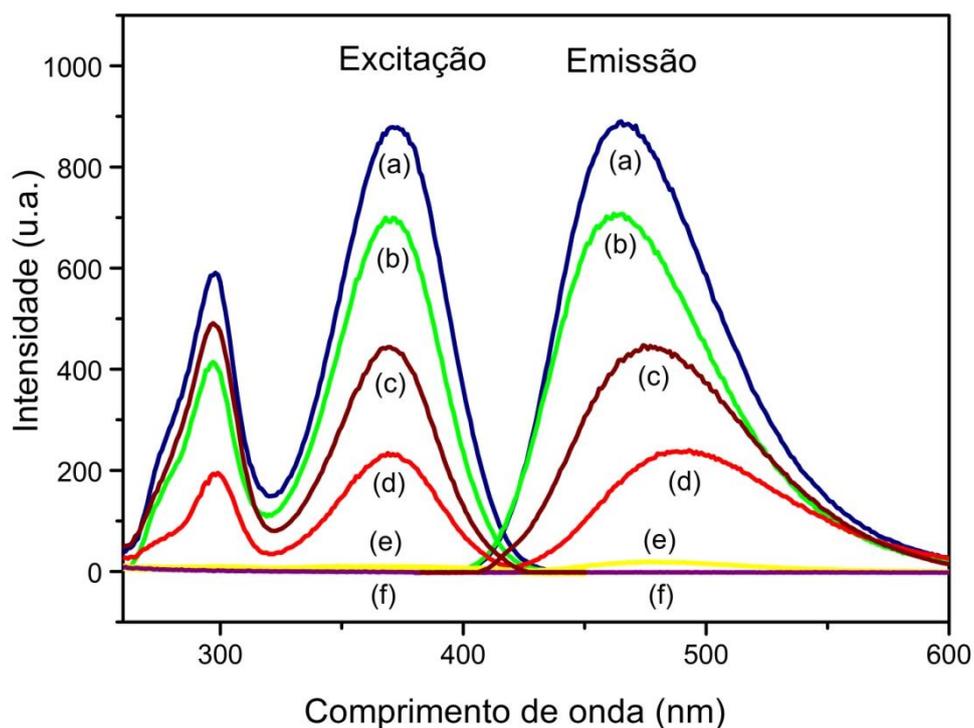


Figura 39: Espectros de emissão e excitação do complexo **5** (20 μ M) nos solventes: DMSO (a), DMF (b), 1-octanol (c), CH₃CN (d), ciclohexano (e) e H₂O (f) à 25 °C.

Além disso, foi observado que a adição de água nas soluções do complexo **5** em DMSO resulta na perda da luminescência. A Figura 40 mostra as alterações nos espectros de emissão em DMSO e nas misturas DMSO/H₂O com 0,5, 10 e 15% de H₂O. Verifica-se que ao aumentar a quantidade de água a emissão característica do complexo **5** em 467 nm diminui de intensidade e desaparece quando a mistura contém 15% de água. Este resultado sugere que a supressão da emissão pode ocorrer devido a formação de ligação de hidrogênio de moléculas de água vizinhas com o grupo 3'-OH (3'-O---H---OH₂), ocasionando a ruptura da estrutura rígida do complexo. A água pode competir eficazmente pela ligação de hidrogênio intramolecular e alternar a luminescência do complexo, resultando em um complexo não luminescente. Esta observação é coerente com a estrutura otimizada por cálculos DFT para o complexo **5** no solvente água. Os dados mostram que a presença da água leva a um rearranjo da estrutura rígida da molécula, favorecendo a ligação de hidrogênio entre o grupo 3'-OH e as moléculas de água mais próximas. Portanto, isto pode explicar a falta de emissão do complexo **5** em solução aquosa.

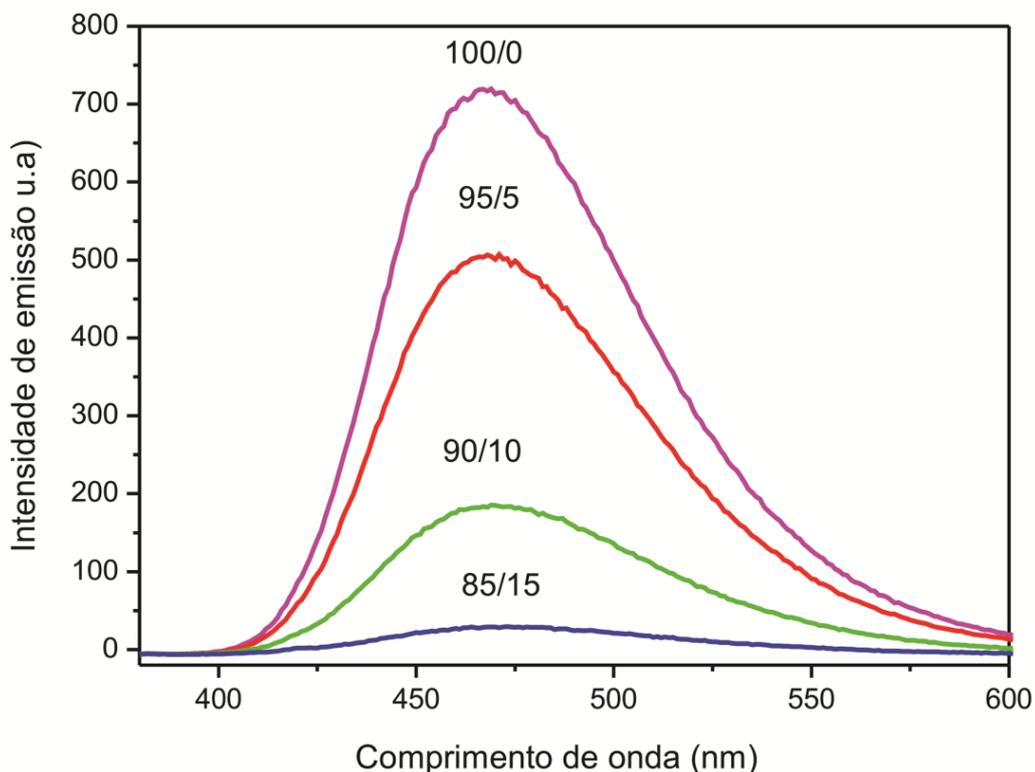


Figura 40: Espectros de emissão do complexo **5** em DMSO/H₂O nas proporções 100/0, 95/5, 90/10 and 85/15 à 25 °C.

4.2.6.2 - Luminescência em diferentes valores de pH

As propriedades emissivas do complexo **5** foram analisadas em diferentes valores de pH. Eles exibem um aumento na intensidade de emissão em direção à desprotonação, acompanhado de um ligeiro deslocamento para regiões de maiores comprimentos de onda do máxima emissão em meio básico, conforme mostra a Figura 41(a) para o complexo **5**. Também, no gráfico de intensidade relativa de emissão, do complexo **5**, vs. pH, Figura 41(b), foi observado um ponto de inflexão em pH cerca de 9,2, próximo do valor de pKa (9,4) do grupo 3'-OH do anel B, conforme descrito posteriormente. Assim, sugere-se que a emissão é proveniente da forma aniônica do ligante hesperidina, uma vez que comportamento emissivo similar é observado em 490 nm para a hesperidina livre quando excitada em 360 nm sob condições básicas, Figura 42.

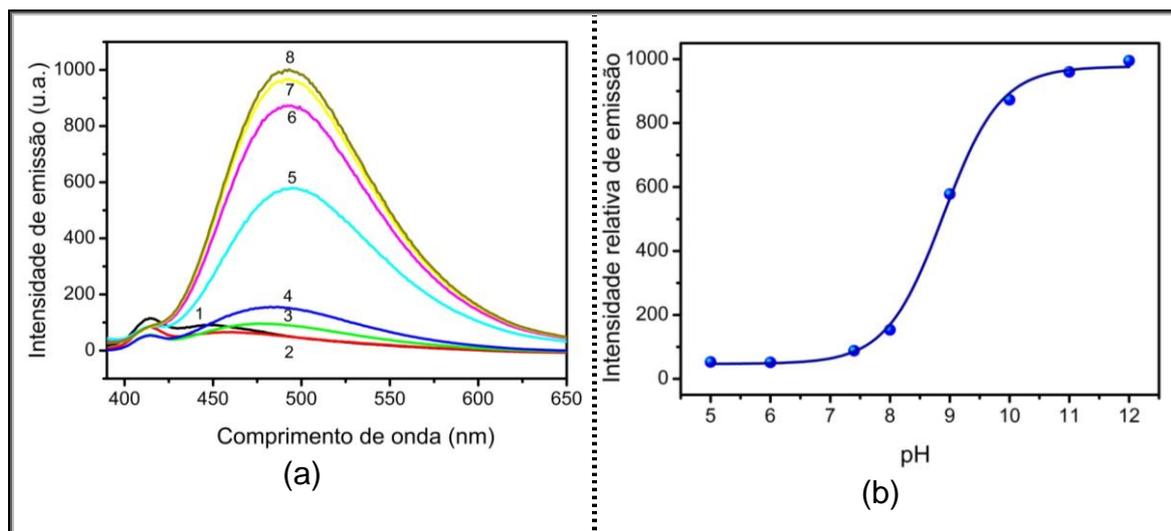


Figure 41: (a) Espectros de emissão do complexo **5** em diferentes pH's com $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm. As curvas 1–8 são correspondentes aos pH's 5,0, 6,0, 7,4, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0, respectivamente, à 25 °C. (b) Gráfico de intensidade de emissão vs. pH para o complexo **5** em solução tampão.

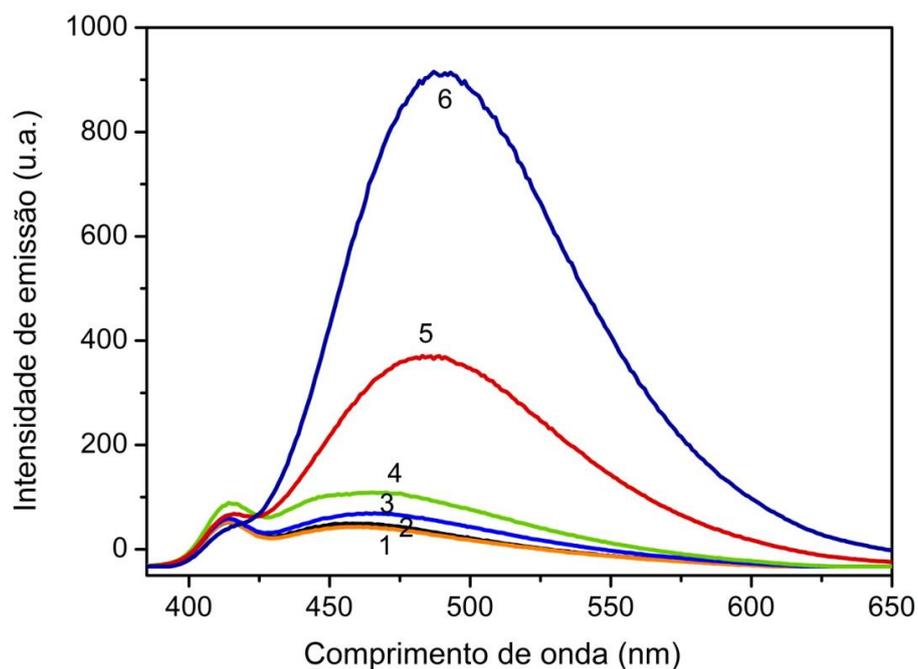


Figure 42: (a) Espectros de emissão da hesperidina livre em diferentes pH's com $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm. As curvas 1–6 são correspondentes aos pH's 5,0, 6,0, 7,4, 8,0, 9,0 e 10,0, respectivamente, à 25 °C.

Neste contexto, sugere-se que as propriedades emissivas são provenientes do ligante hesperidina, atribuído à transição intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$ (hesp) no estado excitado, a qual é fortemente influenciada pelo grupo 3'-OH da hesperidina em meio básico.

De modo geral, sugere-se que a luminescência do complexo **5** pode está associada a uma combinação de vários fatores, incluindo a polaridade do solvente, estereoquímica e acoplamento spin-órbita. No entanto, acredita-se que as propriedades emissivas destes complexos em solventes não aquosos também seja em consequência da perturbação das transições responsáveis pela emissão na presença do metal, em que o íon metálico Mg^{2+} estaria diminuindo a diferença entre os níveis de energia dos orbitais moleculares dos flavonóides, o mais alto (ocupado) e o mais baixo (vazio). Assim, a coordenação do ligante ao pequeno e carregado íon Mg^{2+} , que efetivamente aumenta a rigidez da estrutura do ligante, pode está aumentando o rendimento quântico de fluorescência pela redução da probabilidade de dissipação de energia de processos não-radiativos⁵⁷ e, dessa forma, aumenta a intensidade de fluorescência no complexo. Além disso, também sugere-se que o aumento da intensidade de fluorescência após a quelação de flavonóides com o íon diamagnético Mg^{2+} está relacionada com a inibição do processo de transferência de próton intramolecular no estado excitado entre os grupos 3'-OH e 4'-OCH₃ do anel B. Estas observações são bastante relevantes quando se leva em consideração o fato de que o ligante hesperidina livre não emite sob as mesmas condições nos solventes não aquosos, ao contrário do complexo **5**.

4.2.7 - Eletroquímica

Os voltamogramas cíclicos do complexo **5** foram avaliados em água e em tampão fosfato (0,065 M em pH 7,8 e 10) na faixa de -1 a +1 V (vs. Ag/Ag⁺). As varreduras foram iniciadas em -0,45 V na direção positiva. Em água, Figura 43, na primeira varredura no sentido anódico são observados dois processos oxidativos, um em +0,56 V (processo I) e outro em +0,86 V (processo II). Na varredura reversa são observadas as seguintes reduções: em +0,14 V (processo III), -0,11 V (processo IV) e em -0,63 V (processo V). Na segunda varredura oxidativa um novo pico aparece em +0,48 V (processo VI) e o processo I desaparece, sugerindo que a transferência de elétrons nessa etapa foi seguida por uma reação química. Além

disso, o processo II permanece e as respostas redutivas ocorrem em potenciais iguais aos observados no primeiro ciclo, porém a intensidade da corrente é aumentada para os processos III e IV.

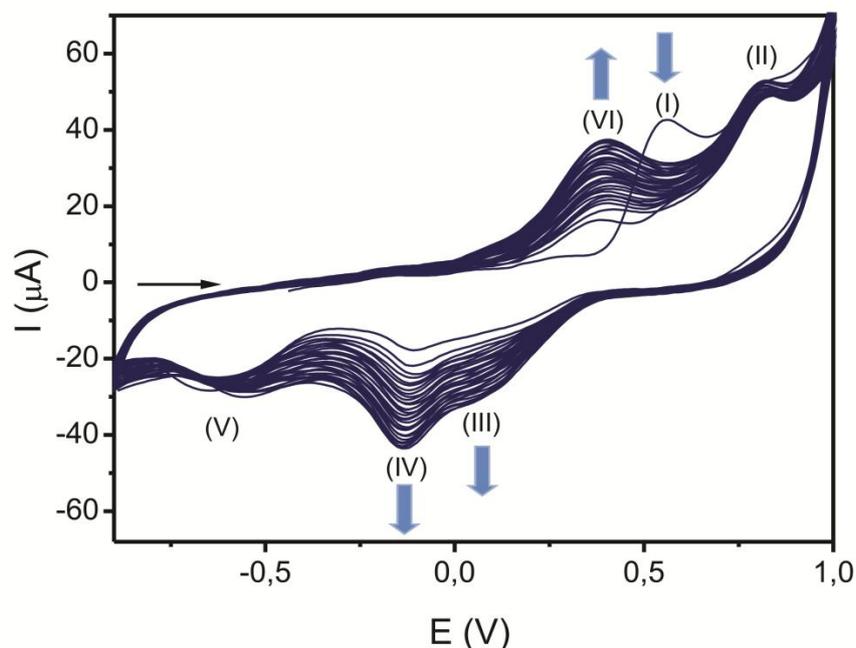


Figura 43: Voltamogramas cíclicos do complexo **5** em água, com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. As setas verticais indicam o prosseguimento da intensidade de corrente com os ciclos de varredura. A seta horizontal indica o sentido da varredura.

Em pH 7,8 o primeiro voltamograma cíclico mostra os processos I e V bastante evidentes, enquanto os processos III, IV e VI também aparecem, mas com pequena resposta de intensidade de corrente, Figura 44(a). Já em pH 10,0, em que a hesperidina coordenada está na forma aniônica, são observados os processos I e V em maior intensidade de corrente, e os processos IV e VI também aparecem, porém, com resposta muito pequena, Figura 44(b).

As considerações sobre o comportamento eletroquímico do composto em água são consistentes com as observações em soluções tamponadas em pH básico. Por exemplo, em pH 10, o primeiro potencial de oxidação do composto é o mesmo que em água, sugerindo que é de fato a oxidação das espécies desprotonadas no grupo 3'-OH do anel B.

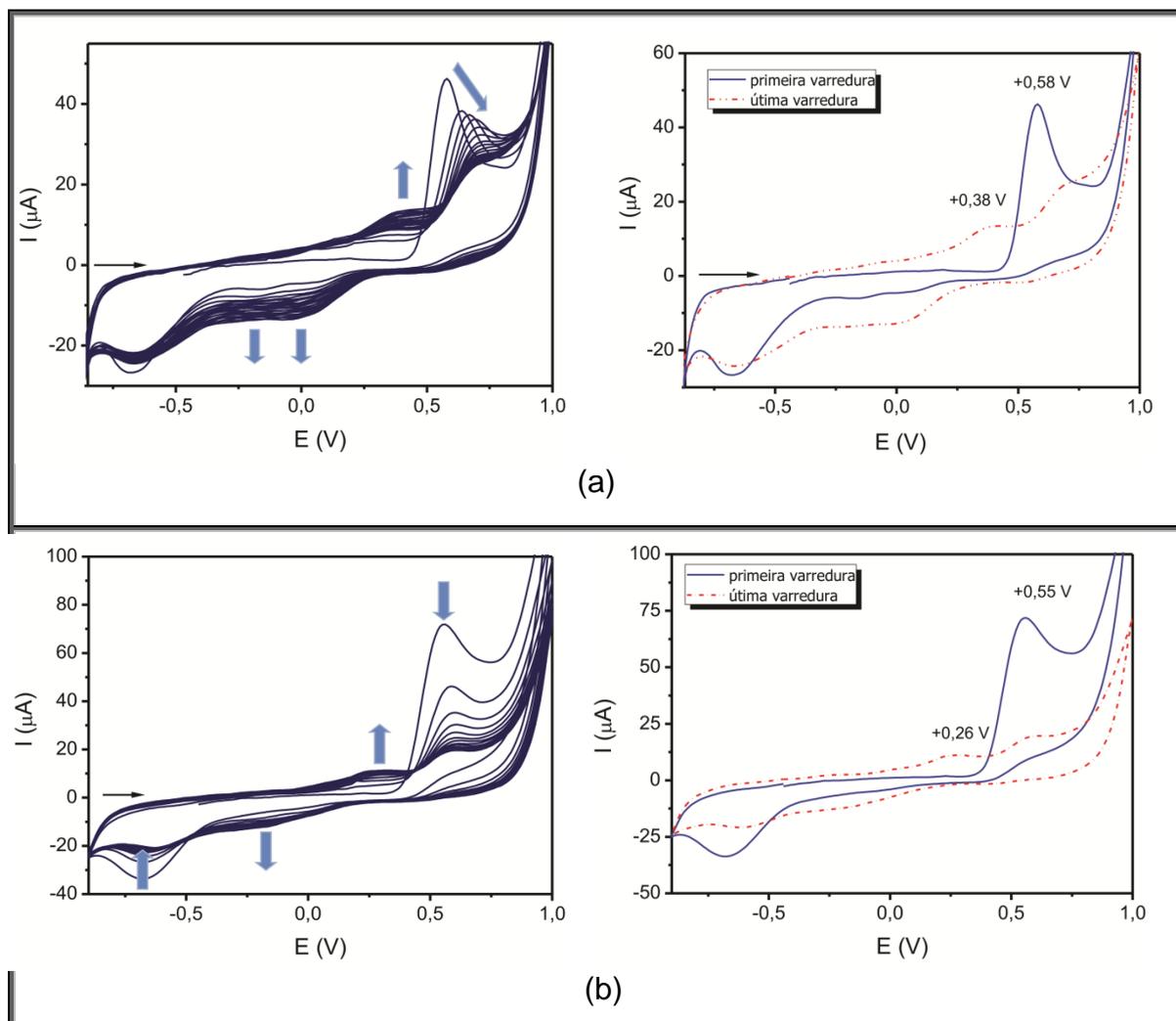


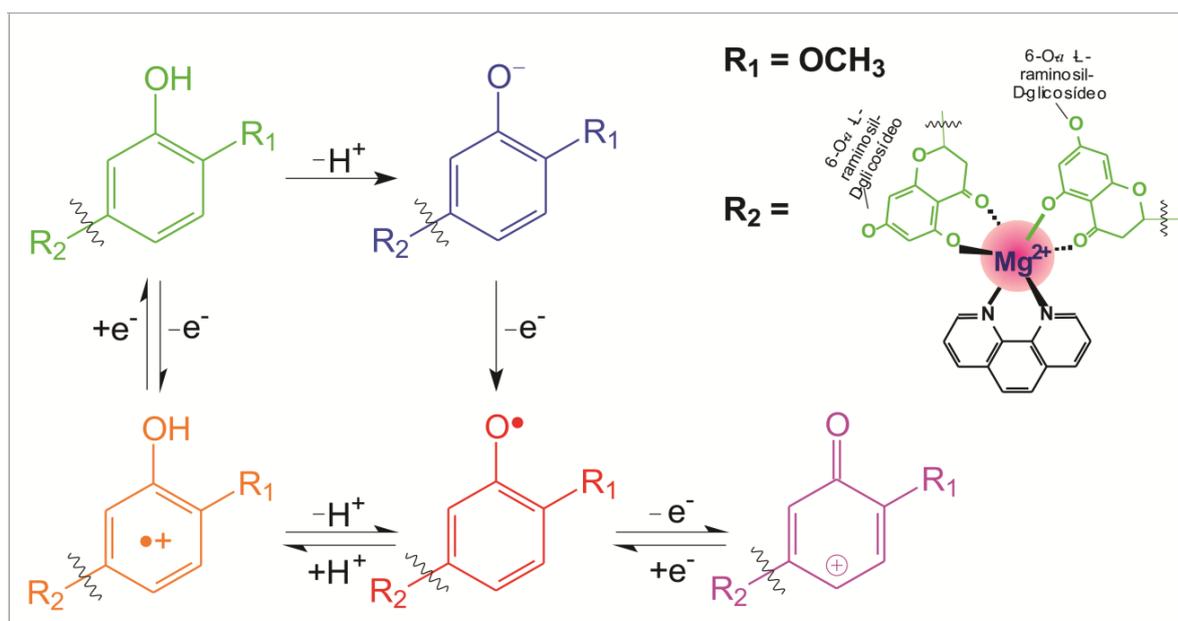
Figura 44: Voltamogramas cíclicos do complexo **5** em tampão fosfato (0,065 mM) em pH 7,8 (a) e 10 (b), com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. As setas verticais indicam o prosseguimento da intensidade de corrente com os ciclos de varredura. A seta horizontal indica o sentido da varredura.

Além disso, comparando os voltamogramas em soluções tamponadas, observamos que os processos IV/VI são menos evidentes do que na água, e indo de pH 7,8 a 10,0, estes processos são cada vez menos evidentes. Isto sugere que as reações de transferência de prótons para a formação do cátion radical fenoxil são cada vez menos favorecidas à medida que aumenta o pH do meio. Também, com base no valor de pH medido (8,9) para a solução aquosa do complexo **5**, sugere-se que o primeiro processo oxidativo na superfície do eletrodo está associado à oxidação do grupo $3'\text{-O}^-$ do anel B da hesperidina coordenada, rico em densidade eletrônica, formando o radical fenoxil (equação 13). Parte destes radicais podem se estabilizar formando, provavelmente, um dímero no processo V (equação 14),^{101, 126}

enquanto uma outra fração destas espécies radicalares participam do sistema cíclico II/III, equação 15. Além disso, os processos redox também são possibilitados pelas reações de transferência de prótons (equação 16) durante os vários ciclos de varredura, viabilizando a ocorrência do sistema cíclico VI/IV, equação 17. As reações gerais propostas para o sistema eletroquímico são descritas no Esquema 3 e ilustradas no Esquema 4.



Esquema 3: Reações sugeridas para os processos eletroquímicos do complexo **5**.



Esquema 4: Ilustração das reações sugeridas no Esquema 3 para os processos eletroquímicos do complexo **5** em água.

Os voltamogramas cíclicos referentes à primeira varredura no sentido anódico, dos ligantes hesperidina, hesperitina, naringina e naringenina em tampão fosfato (pH 7,8) são mostrados na Figura 45 e dos complexo **6-9** são mostrados na Figura 46. Para todos estes ligantes livres são observados dois processos oxidativos (exceto a naringina que aparentemente apresenta somente um pico de redução na varredura reversa. Em todos estes casos, sugere-se que o primeiro potencial de oxidação é atribuído aos grupos 3'-OH ou 4'-OH destes flavonóides.

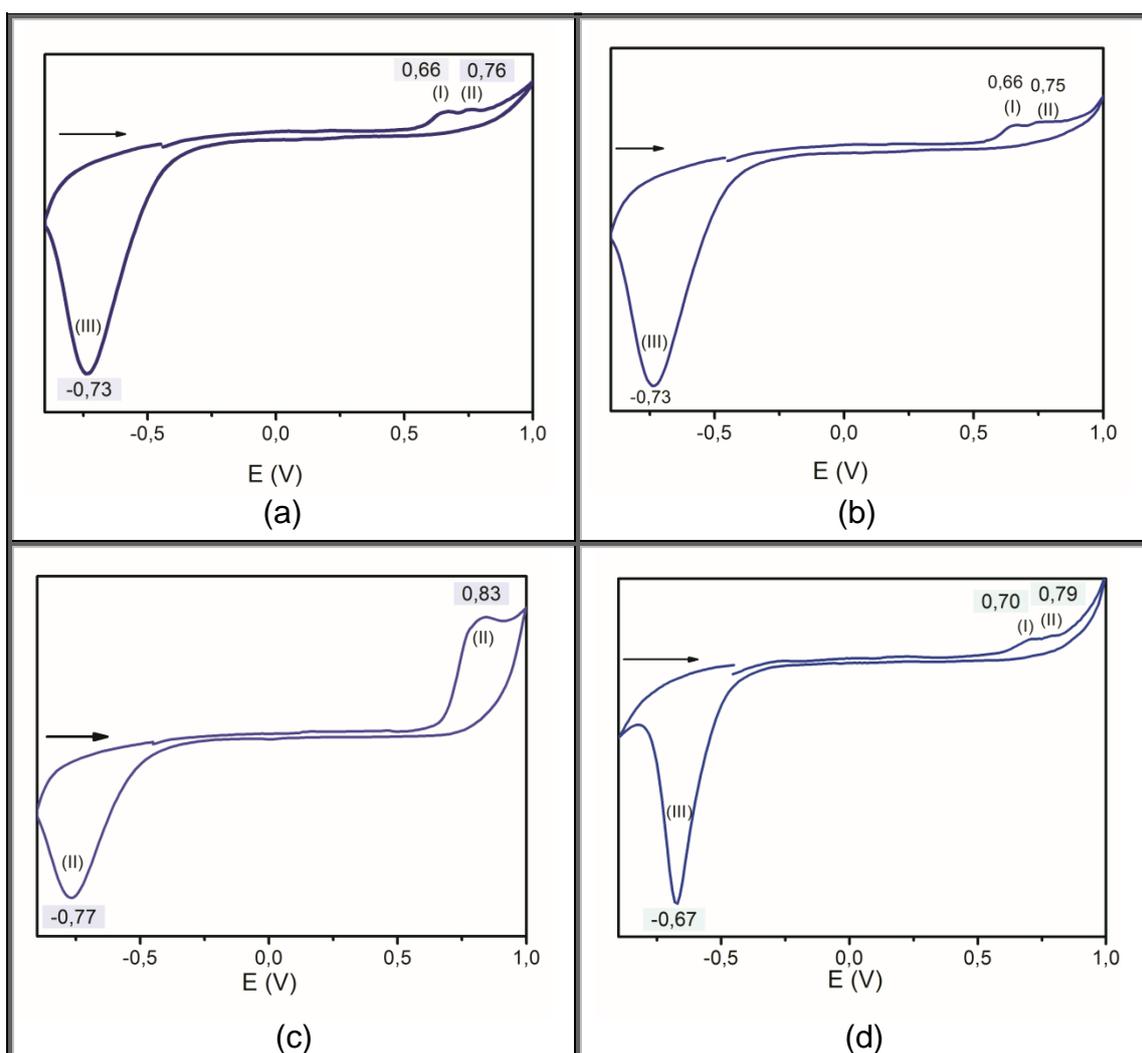


Figura 45: Voltamograma cíclico dos flavonóides livres hesperidina (a), hesperitina (b), naringina (c) e naringenina (d) em tampão fosfato (0,065 mM, pH 7,8), com 0,1 mol L⁻¹ de KCl e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Quanto aos complexos **6-9** são observados somente um processo oxidativo e um processo redutivo. Os dados dos voltamogramas cíclicos referentes à

primeira varredura não mostram mudanças significativas nos potenciais de oxidação e redução dos complexos **6-9** em relação aos seus respectivos flavonóides livres. Mas, como mostrado nos voltamogramas cíclicos após várias varreduras para o complexo **5**, também pode ser que nos sistemas eletroquímicos dos complexos **6-9** radicais fenoxil possam ser gerados subseqüentemente em detrimento do primeiro processo de oxidação na superfície do eletrodo.

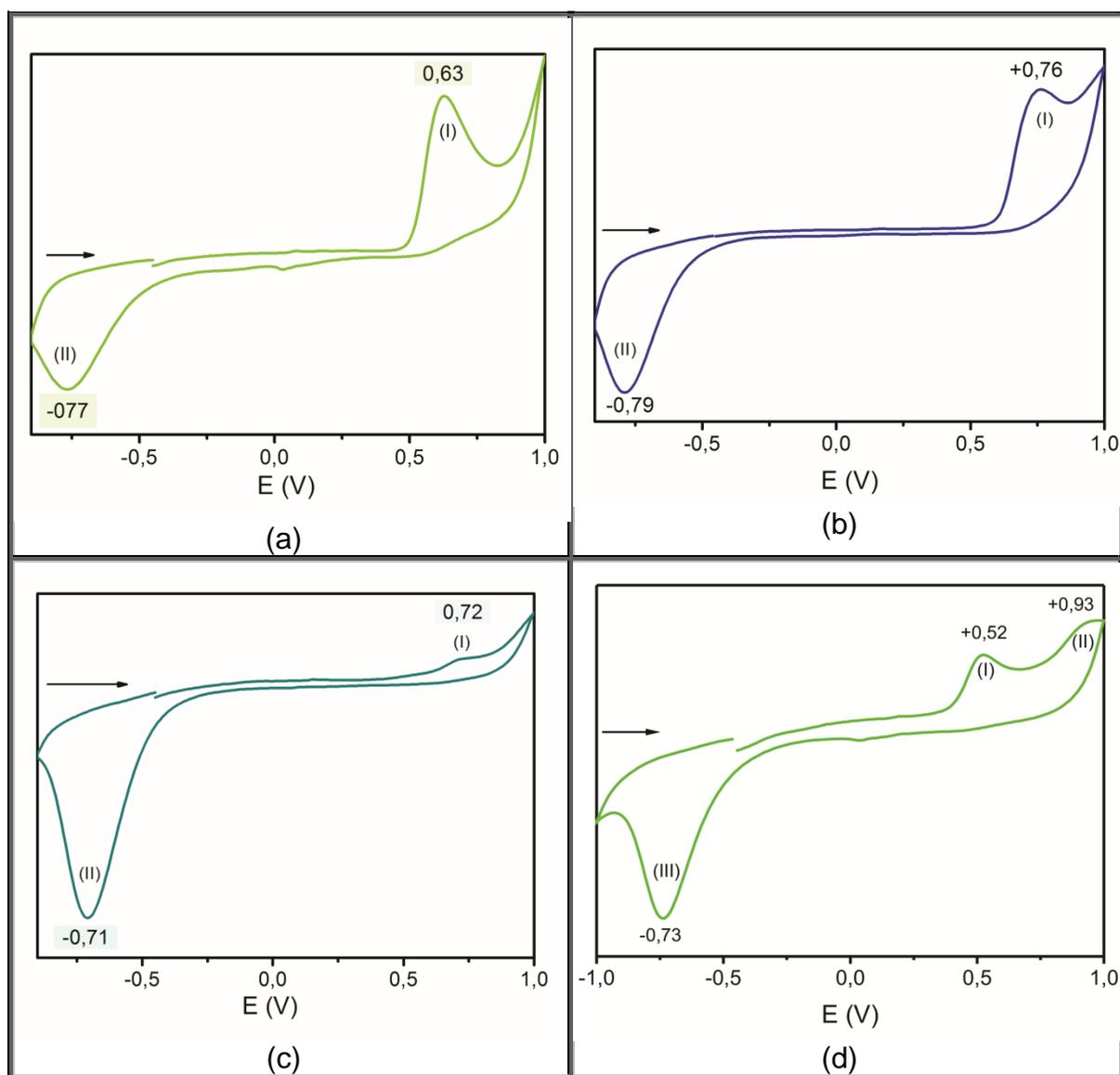


Figura 46: Voltamogramas cíclicos dos complexos **6** (a), **7** (b) e **8** (c) em tampão fosfato (0,065 mM, pH 7,8 e do complexo **9** (d) em água, com 0,1 mol L⁻¹ de KCl e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 - Propriedades Físico-químicas

4.3.1 - Avaliação da estabilidade química e fotoquímica

A viabilidade de uso de muitos inseticidas, além de argumentos toxicológicos, também depende da estabilidade destes compostos quanto às intempéries do meio, como fotodegradação, por exemplo, onde os produtos desta reação podem ou não ser ainda mais tóxicos.

A estabilidade fotoquímica (efeito da luz) dos complexos **1** e **5** em solução aquosa, foram analisados por mudanças em seus espectros de absorção. Nenhuma alteração significativa foi observada nos espectros eletrônicos destes complexos, nem sob irradiação fotoquímica (com lâmpada de 350 nm ou 420 nm e $I_0 = 1 \times 10^{-7}$ por um período de 1 hora), nem sob irradiação solar durante 30 dias, Figura 47, o que sugere a boa estabilidade destes compostos no que se refere à formação de possíveis intermediários da fotodegradação sob estas condições. Sob este aspecto, a aplicação inseticida destes compostos é bastante relevante.

A estabilidade química (efeito do pH), dos complexos **1** e **5** em diferentes pH's também foram avaliadas por mudanças em seus espectros de absorção na região UV-Vis. Foi verificado que o complexo **1** não sofreu nenhuma alteração em seus espectros eletrônicos, Figura 48, sugerindo boa estabilidade do mesmo na faixa de pH estudada, 3 a 9.

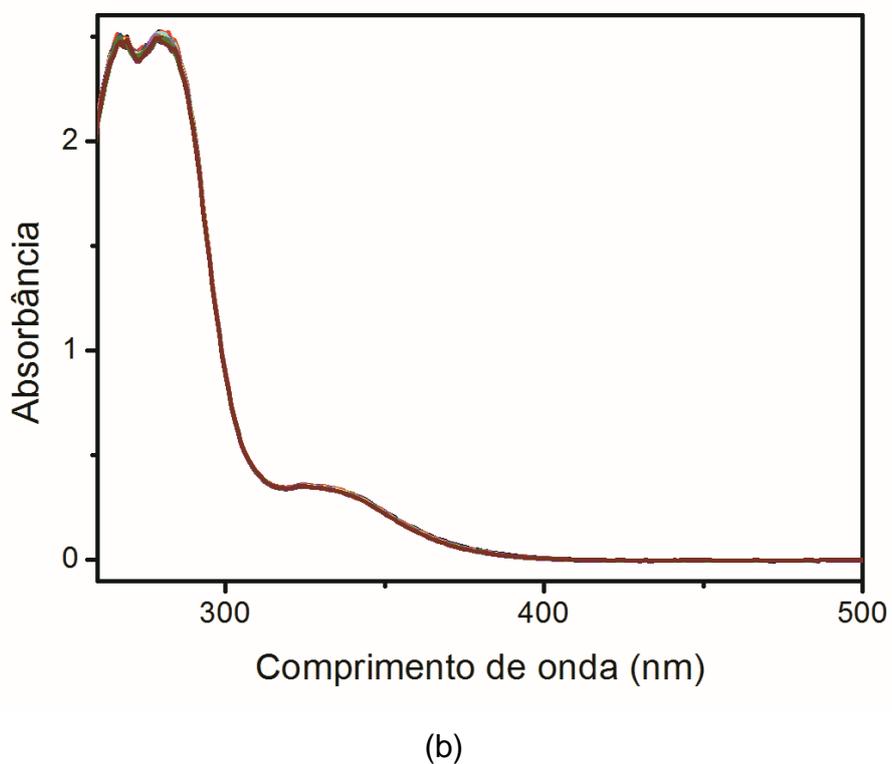
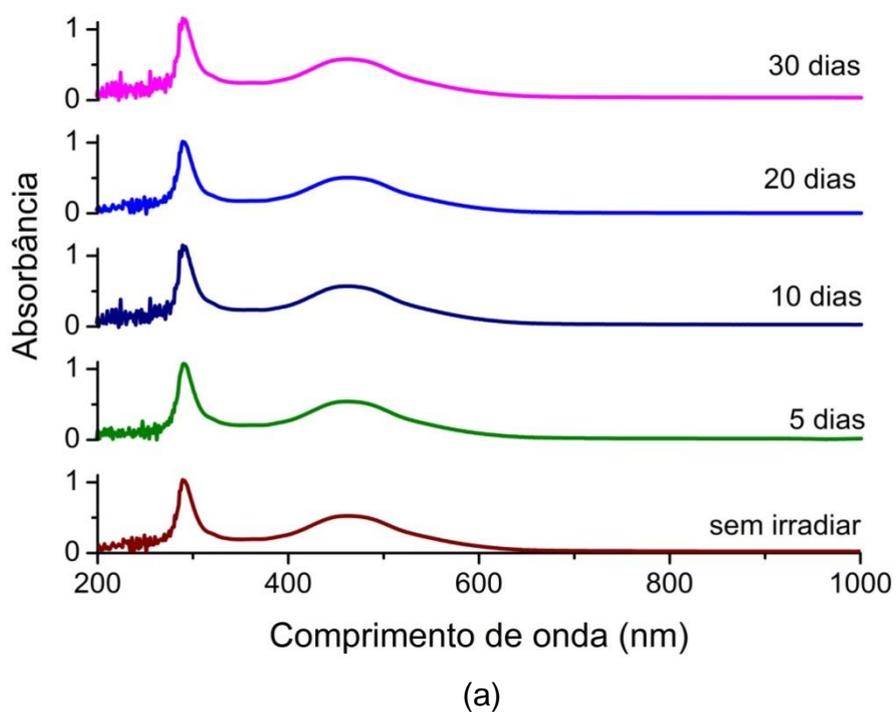


Figura 47: Espectros eletrônicos no UV-Vis do complexo 1 (a) e do complexo 5 (b) em solução aquosa depois de cada período de exposição à luz do dia, por 30 dias.

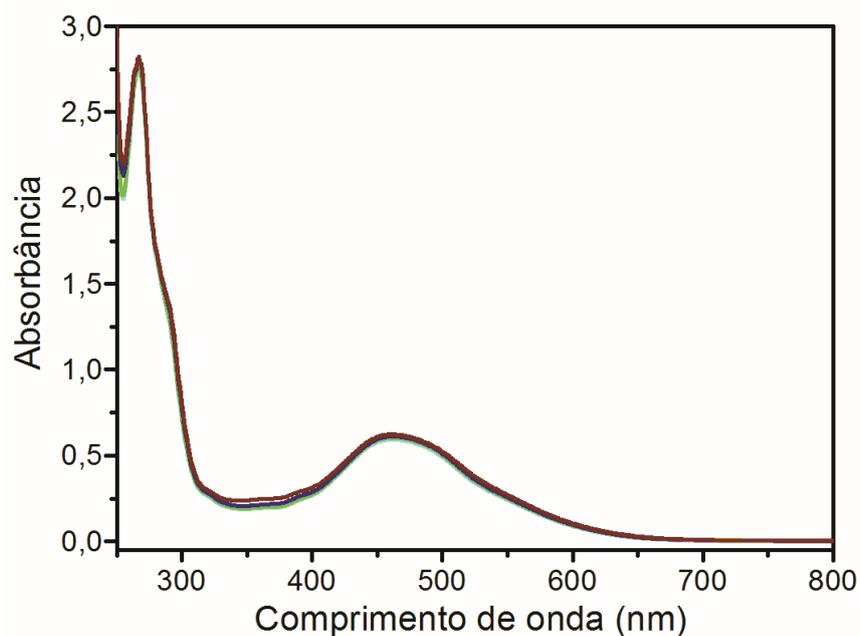
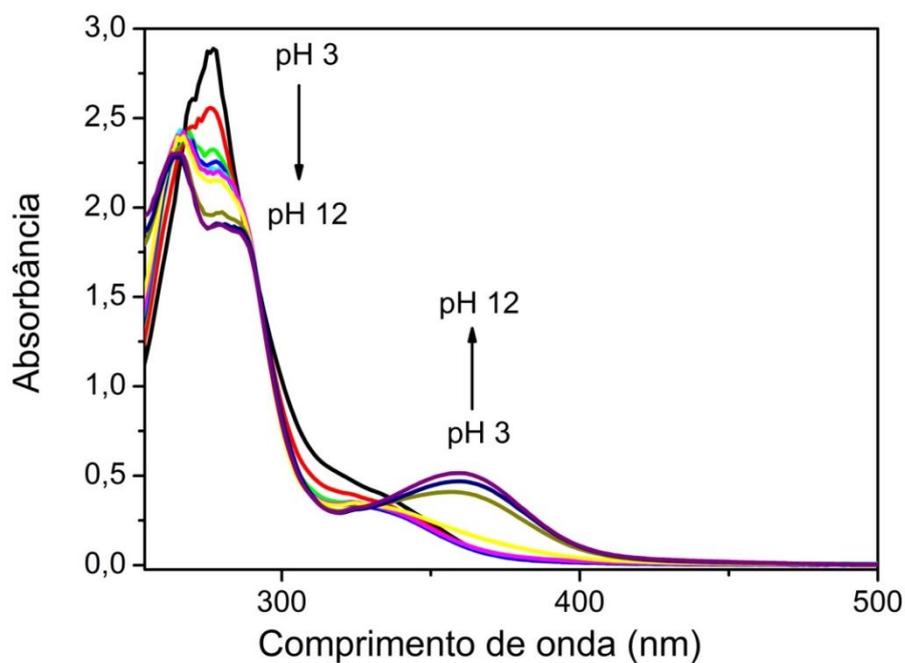
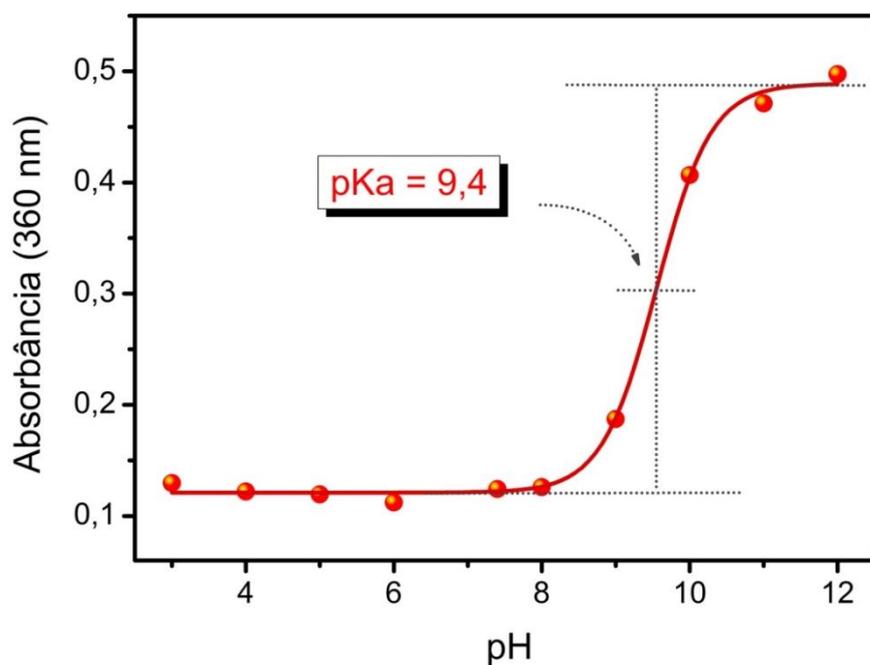


Figura 48: Espectros eletrônicos no UV-Vis do complexo **1** em solução tampão na faixa de pH 3,09 - 9,11, mantidas no escuro e registadas após 30 dias.

O complexo **5** também não sofre degradação na faixa de pH 3 a 9. Vale ressaltar que o complexo **5** sofre desprotonação em meio básico, sendo o equilíbrio ácido-base das espécies reversível, o que compromete a integridade do composto. Este ponto é bastante relevante, uma vez que a versatilidade deste composto favorece sua aplicação em diferentes meios. Em vista deste comportamento, os espectros eletrônicos na região UV-Vis foram monitorados em solução tampão em uma faixa de pH mais ampla 3,0 a 12,0, Figura 49(a). A partir dos dados de absorvância em 360 nm em função do pH da solução foi construído o gráfico mostrado na Figura 49(b), e através do ponto de inflexão desta curva foi determinado o valor de pKa do complexo **5** como sendo 9,4.



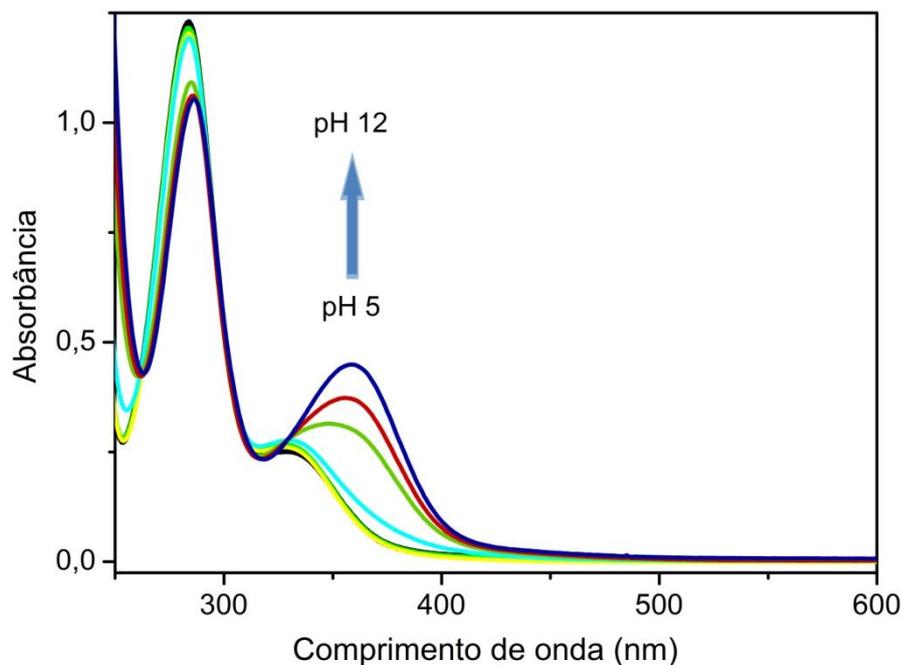
(a)



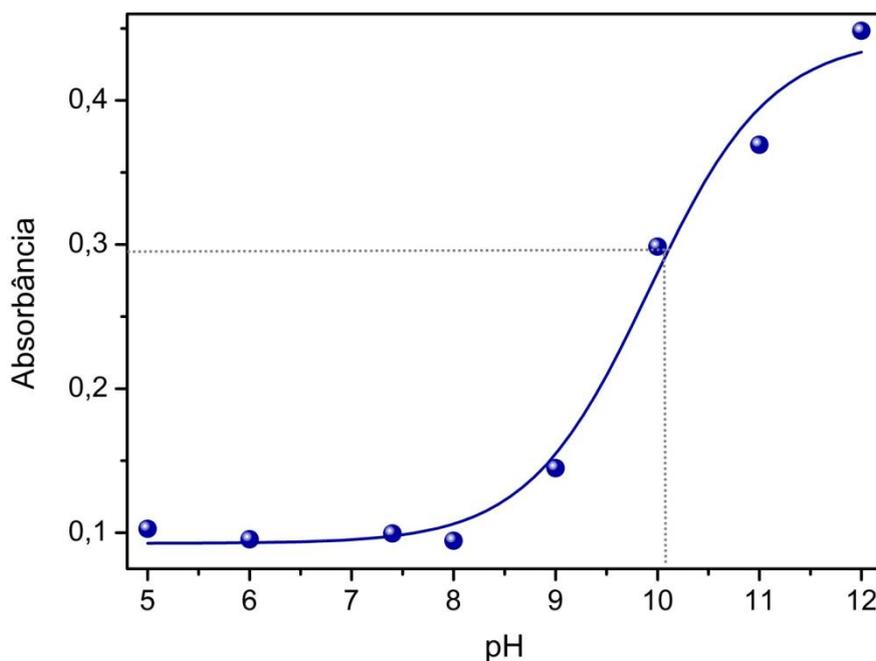
(b)

Figura 49: (a) Espectros de absorção eletrônica do complexo 5 em diferentes pH's (3 a 12) à 25 °C; (b) Gráfico de absorbância (em 360 nm) vs. pH.

Com o intuito de verificar se o equilíbrio ácido-base era proveniente ou não do ligante hesperidina coordenado, os espectros eletrônicos na região UV-Vis da hesperidina livre também foram avaliados em solução tampão na faixa de pH 5,0 a 12,0, Figura 50(a).



(a)



(b)

Figura 50: Espectros de absorção eletrônica da hesperidina livre em diferentes pH's (5 a 12) à 25 °C; (b) Gráfico de absorbância (em 360 nm) vs. pH.

A hesperidina livre mostra banda intensa de absorção na região do UV devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da Banda II deste flavonóide. Outra banda aparece em $\lambda = 330$ nm, que corresponde a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da Banda I em valores de pH < 7,4. A desprotonação do grupo fenólico 3'-OH resulta em alteração espectral característica do ligante hesperidina. Um ligeiro deslocamento para maiores comprimentos de onda e o desenvolvimento de uma banda em 360 nm é observada em pH acima de 7,4. Isto é consistente com o fato de que a desprotonação deste grupo conduz a um deslocamento batocrômico devido à extensão da conjugação π . Assim, a desprotonação [3'-OH] \rightarrow [3'-O⁻] foi acompanhado por um aumento na absorção em 360 nm, assim como observado também para o complexo **5**.

Portanto, a coordenação da hesperidina ao íon Mg²⁺ no complexo **5** afetou a constante de dissociação do próton do grupo fenólico 3'-OH resultando em menor valor de pKa (9,4) comparado à hesperidina livre, cujo valor de pKa determinado neste trabalho foi de aproximadamente 10,1, Figura 50(b), similar ao descrito na literatura (10,2),³⁸ indicando que o grupo fenólico 3'-OH da hesperidina coordenada tornou-se mais ácido do que na sua forma livre, estando coerente com o cálculo DFT.

4.3.2 - Avaliação da Solubilidade e Lipofilicidade

A lipofilicidade e solubilidade de uma molécula com potencial aplicação biológica são fatores essenciais a serem levados em consideração na fase de desenvolvimento de sua formulação, já que ambos são os principais parâmetros que influenciam em sua absorção, distribuição, metabolismo, excreção e propriedades toxicológicas. Assim, torna-se importante a avaliação de tais propriedades.

Os flavonóides hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina são amplamente reconhecidos por suas propriedades em sistemas biológicos. No entanto, o fator limitante do uso desses compostos é a baixa solubilidade em solução aquosa.

A solubilidade dos complexos **1**, **5-9** em água pura são maiores do que seus respectivos ligantes flavonóides livres, Tabela 18, assim como em solução tampão com diferentes pH's observado para o complexo **5**, Tabela 19. Neste sentido, vale ressaltar que a alta solubilidade em água apresentada pelos complexos, em comparação aos flavonóides livres, sugere que os complexos podem

ser de uso potencial para melhorar a biodisponibilidade destes flavonóides em meio fisiológico.

Em corroboração, os valores de $\log P$ (coeficiente de partição água/octanol) dos complexos **1**, e **5-9** sugerem que a coordenação dos ligantes hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina ao íon Mg^{2+} e Ru^{2+} aumenta a distribuição dos seus respectivos complexos nos sistemas hidrofílicos, uma vez que a natureza lipofílica destes flavonóides livres resulta em perda de solubilidade em água levando à baixa biodisponibilidade. Nota-se também que os valores de solubilidade em água dos complexos **1** e **8** são próximos, ao contrário dos seus valores de $\log P$. Esta diferenciação se deve porque o cálculo do coeficiente de partição leva em consideração não só a solubilidade em água, mas também a solubilidade de cada composto em octanol.

Em geral, na administração por via oral os flavonóides são geralmente dissolvidos em veículos, tais como carboximetil celulose de sódio e propileno glicol para elevar a sua absorção no corpo. Isto significa que a extensão da absorção de flavonóides depende da solubilidade no veículo utilizado para a administração, ou seja, sugere-se que a elevação da solubilidade aumenta a biodisponibilidade do suplemento. Da mesma forma, acredita-se que o aumento da solubilidade dos flavonóides complexados aumenta sua biodisponibilidade.

Tabela 18: Solubilidade em água e coeficiente de partição ($\log P$) dos compostos hesperidina, hesperetina, naringina, naringenina, complexo **1**, e **5-9**

COMPOSTOS	SOLUBILIDADE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Log P
hesperidina	$5,92 \pm 0,49$ ($4,93 \pm 0,99^{131}$)	$0,30$ ($0,32^{132}$)
hesperetina	-	$1,50^{133}$
naringina	-	$0,11^{132}$
naringenina	$43,83 \pm 0,039^{134}$	$1,60^{132}$
Complexo 1	$518,80 \pm 0,91$	$-1,280 \pm 0,340$
Complexo 5	$472,00 \pm 3,05$	$-0,150 \pm 0,010$
Complexo 6	$1029,00 \pm 2,75$	$0,0290 \pm 0,002$
Complexo 7	$1713,70 \pm 5,24$	$-0,200 \pm 0,040$
Complexo 8	$528,90 \pm 1,03$	$0,285 \pm 0,013$
Complexo 9	$580,00 \pm 4,60$	$0,100 \pm 0,022$

Os Valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Tabela 19: Solubilidade em solução tamponada em vários pH's para o complexo **5**

pH	Solubilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
3,6	353,0 \pm 2,6
6,0	435,0 \pm 1,2
7,4	552,0 \pm 5,4
9,4	701,8 \pm 3,2
11,0	769,5 \pm 4,2

Os Valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3)

Cabe ressaltar que os flavonóides livres, hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina, também são pouco solúveis na maioria dos solventes orgânicos testados, ao contrário dos complexos **1-9** que são solúveis nos solventes: metanol, etanol, DMSO, DMF, acetona e acetonitrila.

4.4 - Propriedades Biológicas

4.4.1 - Atividade inseticida: ensaios *in vivo* com as formigas cortadeiras

Para avaliar a viabilidade dos complexos **1-9** em atuarem como agentes tóxicos a serem adicionados às dietas, iscas, emulsões para pulverização ou termonebulização e encapsulamento, para o controle e/ou combate de insetos pragas da agricultura e silvicultura, como modelo, utilizaram-se formigas cortadeiras sendo realizados ensaios *in vivo* com *Atta sexdens rubropilosa*.

A Tabela 20 mostra a mortalidade acumulada por 25 dias e a sobrevivência média (S_{50}) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* pela ingestão da dieta pura e também da dieta artificial incorporada a 0,2% dos seguintes compostos: hesperidina, hesperetina, naringina e seus respectivos complexos **1-9** e o inseticida comercial sulfluramida.

Os dados mostram que os flavonóides livres e os complexos **2-4** não possuem atividade inseticida significativa comparados ao controle frente às formigas testadas. Já o complexo **1** apresenta ação inseticida maior que a apresentada pelo complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂], sugerindo que a interação Ru²⁺-hesperidina favorece este efeito tóxico. Nota-se também que a sulfluramida, na concentração

testada, é altamente tóxica para as formigas e exibe um modo de ação lento, com $S_{50} = 5$ dias (tempo em que 50% das formigas permaneceram vivas). Por comparação, o complexo **1** reduziu a população de formigas em 86 % após duas semanas de tratamento, com $S_{50} = 4$ dias e, assim como a sulfluramida, também exibiu um modo de ação lento. Este resultado é relevante quando se considera que o objetivo é obter um tempo de ação inseticida retardado para o controle e/ou combate das formigas cortadeiras.

Tabela 20: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (S_{50}) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os compostos hesperidina, hesperetina, naringina e seus respectivos complexos **1-9** e o inseticida sulfluramida

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										S_{50}^*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	0	0	2	2	6	10	32	>25 a
Hesperidina	0	0	6	12	18	24	28	32	40	44	>25 a
Hesperitina	0	6	8	10	10	14	14	16	22	30	>25 a
Naringina	0	2	2	2	6	12	18	18	26	34	>25 a
Naringenina	0	0	0	2	2	8	8	12	20	26	>25 a
1,10-fenantrolina	0	18	64	96	100	100	100	100	100	100	3b
[RuCl₂(phen)₂]	2	8	32	48	52	58	64	68	68	68	7b
(1)	0	22	36	68	72	76	84	86	86	86	4b
(2)	0	0	2	14	22	28	46	50	62	70	17,5 a
(3)	0	0	0	8	12	16	28	34	44	66	22 a
(4)	0	2	4	10	10	12	14	20	26	36	>25 b
Mg(OAc)₂.4H₂O	0	0	2	2	6	6	12	20	34	66	23 b
(5)	2	10	32	72	88	92	98	98	100	100	5b
(6)	2	4	28	88	96	100	100	100	100	100	5 b
(7)	0	4	10	54	82	88	98	98	100	100	6 b
(8)	0	2	18	70	80	90	100	100	100	100	5 b
(9)	0	0	0	14	32	56	80	94	98	100	10b
Sulfluramida	0	8	20	70	98	100	100	100	100	100	5b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

Os compostos de magnésio **5-8** apresentaram ação inseticida significativa com valores de S_{50} de aproximadamente 5 dias, o mesmo apresentado pelo inseticida comercial sulfluramida. Este dado sugere que este composto possui modo de ação lento, conforme requerido para o combate e/ou controle dos insetos em questão. Além disso, estes compostos apresentam também as características esperadas para um inseticida formulado em isca tóxica para combater e/ou controlar insetos sociais, como as formigas cortadeiras por exemplo. Portanto, estes compostos atuam por ingestão, apresentam modo de ação tóxica retardada com mortalidade menor que 15% após o primeiro dia e maior que 85% após o décimo quarto dia a partir do oferecimento das dietas, são letais em baixas concentrações e são inodoros e não repelentes.

Analisando-se a porcentagem de mortalidade de formigas por dia, sugere-se que, dentre outros parâmetros, a maior lipofilicidade apresentada pelos complexos **6** e **8** também pode estar associada com a ação inseticida ligeiramente mais eficiente em comparação aos complexos **5** e **7**.

Quanto ao complexo **9**, este não se mostrou tão eficiente em comparação aos demais complexos de magnésio, mas aos 25 dias de tratamento levou a 100% de mortalidade dos insetos, ao contrário do ligante livre hesperidina, indicando que sua coordenação ao íon Mg^{2+} foi importante para modificação de suas propriedades físico-químicas e consequente ação inseticida. Por analogia dos dados obtidos para os complexos **5** e **9**, acredita-se que a coordenação do ligante ancilar fenantrolina ao íon Mg^{2+} foi de fundamental importância na modificação estrutural da molécula **5**, atribuindo-lhe propriedades biológicas ainda mais interessantes.

Cabe ressaltar que, apesar do ligante fenantrolina por si só apresentar ação inseticida elevada, o seu uso na forma livre não é interessante do ponto de vista ecotoxicológico já que estudos revelam que este composto é altamente tóxico ($EC_{50} < 6 \mu M$ após 48 h de exposição) para o microcrustáceo dáfnia (*Daphnia magna*),¹³⁵ um bioindicador ecotóxico de moléculas altamente lipofílicas como é o caso da fenantrolina ($\log P = 1,78$).¹³⁶

Além dessas características existem outras muito importantes que uma molécula inseticida deve apresentar: não causar danos ambientais e não pôr em risco a saúde humana. Portanto, diante de moléculas inseticidas tão potentes, faz-se necessário a realização de estudos investigativos no que se refere à ecotoxicidade (para se conhecer os efeitos que tais compostos podem ter sobre indivíduos e/ou

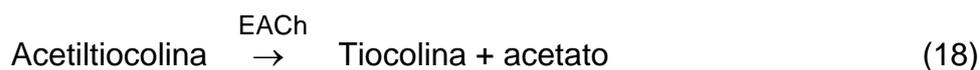
comunidades de organismos ao serem lançados no meio ambiente) e à citotoxicidade (para se conhecer os efeitos nocivos que tais compostos podem ter em relação às células), além de se conhecer qual o modo de ação apresentado por estes compostos. Para responder a estas questões, ensaios de ecotoxicidade, citotoxicidade e inibição enzimática foram realizados, conforme descrito a seguir.

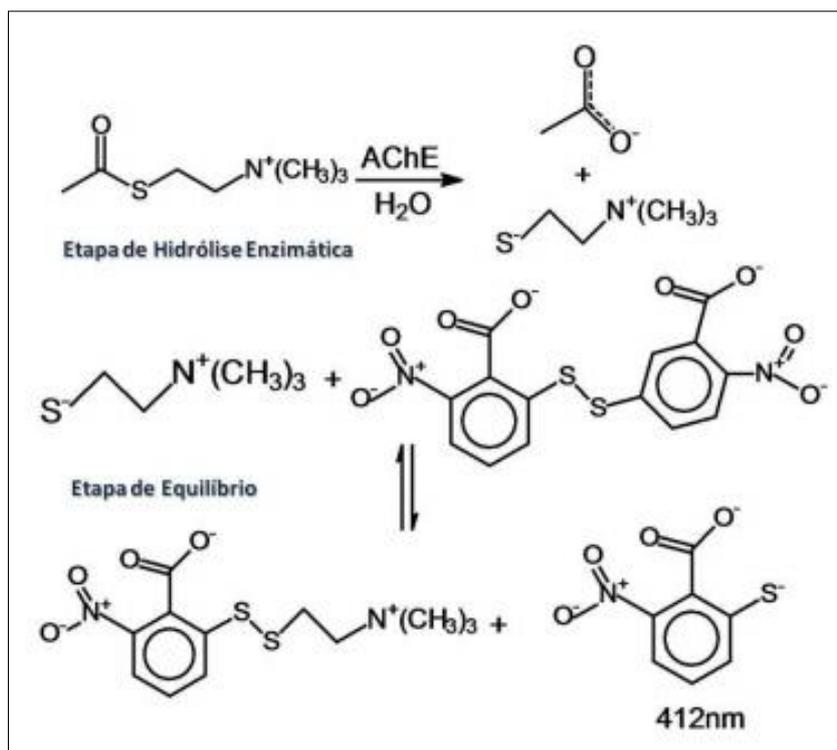
4.4.2 - Modo de ação: estudo de inibição da enzima acetilcolinesterase

Um dos mecanismos de ação dos principais grupos de inseticidas está relacionado à inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase inativando-a e impedindo que ocorra a quebra do neurotransmissor acetilcolina. Com isso os receptores pós-sinápticos ficam sobrecarregados e não receberão novos estímulos. Isso faz com que não chegue estímulos aos músculos, o que paralisará a respiração muscular, causando a morte do inseto.¹³⁷

4.4.2.1 - Ensaios com a enzima Acetilcolinesterase ECh(E.e.)

A avaliação do modo de ação dos complexos **1** e **5-9** e de seus respectivos ligantes livres foi realizada pelos estudos de interação com a enzima acetilcolinesterase do peixe elétrico (*Electrophorus electricus*), ECh(E.e). Os experimentos foram realizados seguindo o método proposto por Ellman,¹⁰² em que a atividade da enzima é medida pelo aumento da absorção em 412 nm produzida pela formação do íon TNB no curso da reação quando a tiocolina (produzida a partir da hidrólise do substrato acetiltiocolina, Equação 18) presente no meio reacional reage com o DTNB (reagente de Ellman), Equação 19. As equações 18 e 19 também estão ilustradas no Esquema 5.





Esquema 5: Modelo das reações envolvidas no método de inibição enzimática (método de Ellman) utilizado neste trabalho.

A Figura 51(a) mostra os espectros eletrônicos na região UV-Vis e as curvas cinéticas de Absorbância (em 412 nm) vs. tempo, obtidos durante o acompanhamento cinético de formação do íon TNB no sistema controle (na ausência do composto teste) e na presença do complexo **1** (50 μM), Figura 51(b). A concentração inicial do substrato no sistema reacional foi de 0,100 mM. A Figura 51(c) apresenta a respectiva curva relacionada à cinética de formação do íon TNB com absorvância em 412 nm em função do tempo, para ambos os casos.

Os espectros e curvas, Figuras A1 e A2 do APÊNDICE A, também foram obtidos para os sistemas na presença dos compostos: os ligantes livres fenantrolina, hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina, o complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ e os complexos **5-9**. Assim, a porcentagem de inibição da atividade da enzima foi calculada a partir da expressão:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\% \quad (20)$$

onde A_i é a absorvância na presença do composto testado, A_0 é a absorvância na ausência do composto testado.

O gráfico para a atividade da enzima na presença dos compostos testes, em comparação ao controle, é apresentado na Figura 52.

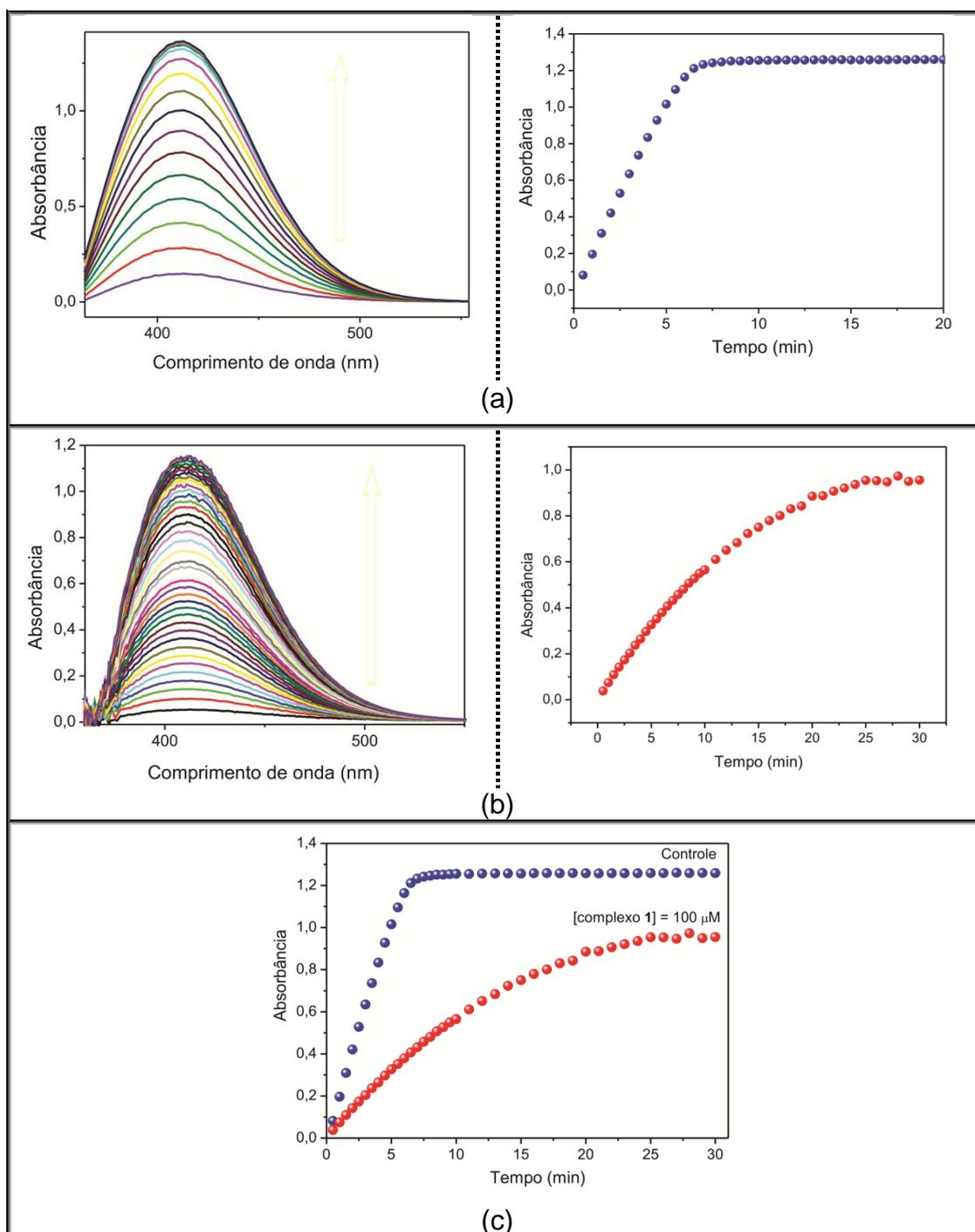


Figura 51: Espectros eletrônicos na região UV-Vis e curva cinética de Absorbância (em 412 nm) vs. Tempo (min) para o acompanhamento reacional da formação do íon TNB, no sistema controle (a) e na presença do complexo 1 (b). O perfil cinético de ambos é apresentado em (c). Condições: [enzima] = 0,025 U mL⁻¹; [S] = 0,100 mM; [complexo 1] = 100 μM, à 25 °C.

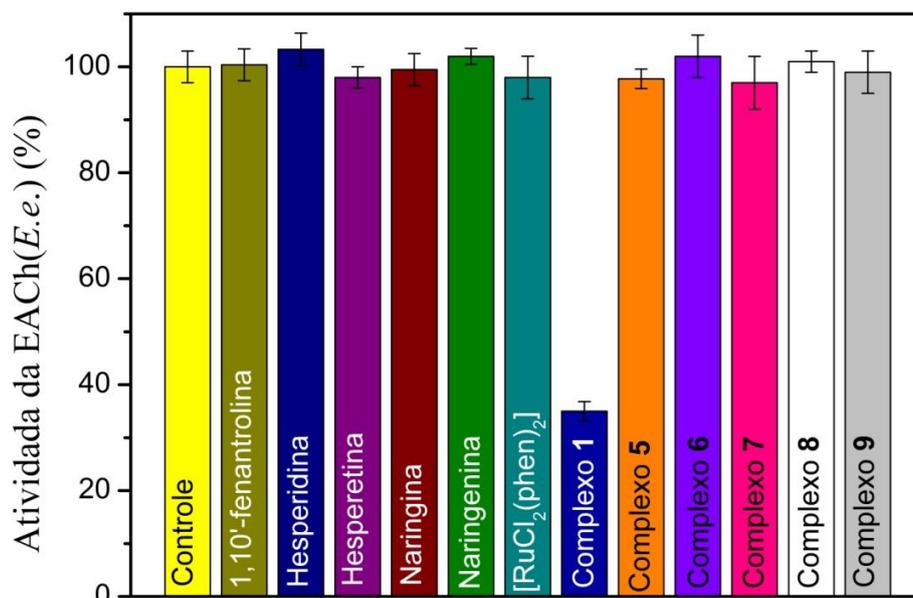


Figura 52: Gráfico de barras representativo para a atividade enzimática no sistema controle, e na presença dos compostos: ligantes livres fenantrolina, hesperidina, hesperetina, naringina e naringenina, do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] e dos complexos **1** e **5-9**, todos em concentração de 100 μM. Condições: [enzima] = 0,025 U mL⁻¹; [S] = 0,100 mM, à 25 °C.

Em comparação com a atividade enzimática do controle, foi verificado que todos os ligantes livres, o complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] e os complexos de magnésio, todos em concentração de 100 μM, não inibiram a atividade da enzima. No entanto, foi observado que o complexo **1** em concentração de 100 μM inibiu moderadamente a atividade da enzima acetilcolinesterase.

Realizou-se o estudo para determinar o tipo de mecanismo associado à inibição da enzima pelo complexo **1**. A partir dos dados foi construído o gráfico de Lineweaver-Burke (a representação gráfica da recíproca da velocidade inicial, 1/V₀, vs. a recíproca da concentração do substrato acetiltiocolina (ACh), 1/[ACh], Figura 53.

A partir do ponto de intersecção na abscissa (igual a -1/K_m), determinou-se o valor da constante de Michaelis-Menten, K_m, a qual é definida como a concentração do substrato na qual a velocidade inicial da reação corresponde à metade da velocidade máxima (V_{max}). O valor de K_m observado foi de 0,4 mM, sendo pouco influenciado com o aumento da concentração do complexo **1**, sugerindo que este composto inibe a atividade da enzima acetilcolinesterase via mecanismo de inibição não-competitivo,¹³⁸ cuja ilustração é mostrada no Esquema 6.

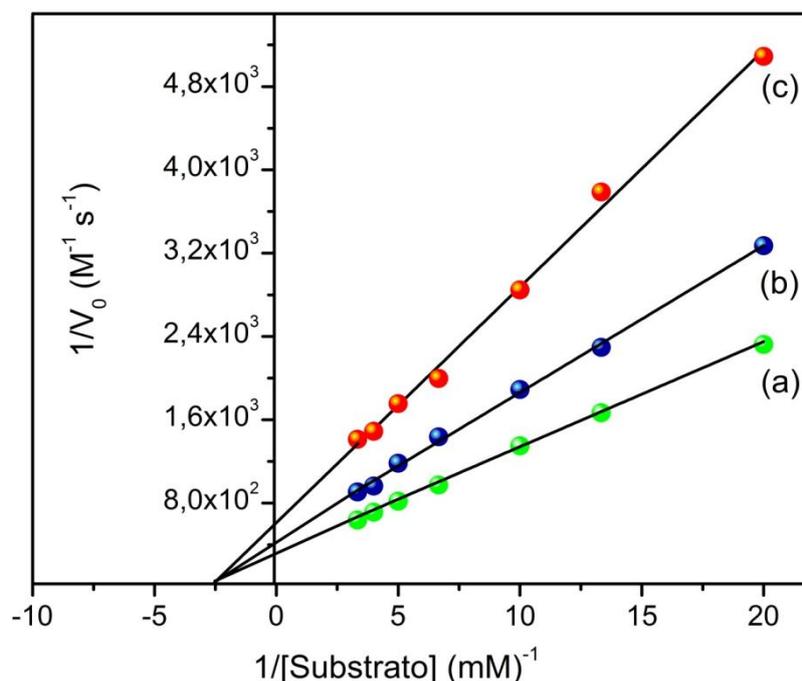
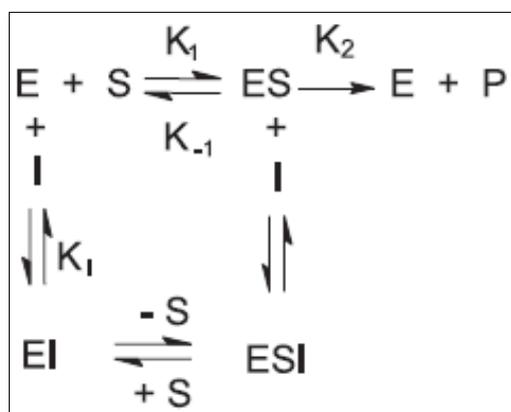


Figura 53: Gráficos de Lineweaver-Burke de $1/V_0$ vs. a recíproca da concentração do substrato acetilcolina, para diferentes concentrações do complexo 1: (a) 0,0; (b) 50,0 e (c) 100,0 μM .



Esquema 6: Ilustração do mecanismo de inibição não-competitivo.¹³⁴

Nesse tipo de mecanismo observa-se que em qualquer concentração de inibidor, neste caso o complexo 1, mesmo uma alta concentração de substrato acetilcolina não há formação total do complexo ENZIMA–SUBSTRATO (ES), que é a forma produtiva. Logo, em qualquer concentração do complexo 1 uma parte da enzima permanece improdutivo sob a forma ENZIMA–SUBSTRATO–complexo 1, em que o valor de $V_{\text{máx}}$ observado na presença do complexo foi menor que a $V_{\text{máx}}$ na ausência do inibidor, o que é típico para esse tipo de mecanismo. Portanto, isto

sugere que o complexo **1** e o substrato acetilcolina possuem afinidade por sítios diferentes da enzima EAcH.

A intersecção do gráfico linear de $1/V$ vs. concentração do complexo **1**, mostrado na Figura 54 foi utilizada para estimar a constante de equilíbrio para a ligação de inibidor, K_i .¹³⁹ Os dados sugerem que o complexo **1** é um inibidor da atividade da EAcH, com $K_i = 78,0 \mu\text{M}$.

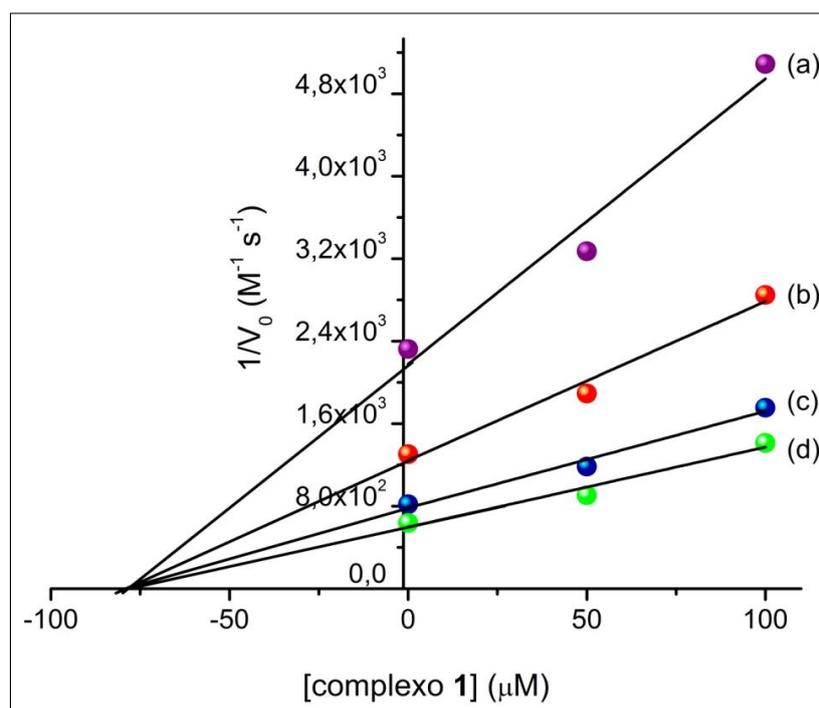


Figura 54: Gráficos de $1/V_0$ vs. concentração do complexo **1** em diferentes concentrações do substrato acetilcolina: (a) 50, (b) 100, (c) 200 e (d) 300 μM .

Cabe ressaltar que, com o intuito de validar estes experimentos, também foram realizados ensaios com um inibidor padrão da enzima acetilcolinesterase, a Tacrina, cujo valor de K_i foi determinado como sendo 36 nM, Figura A3 do APÊNDICE A, em coerência com os dados apresentados na literatura para este inibidor ($K_i = 31 \text{ nM}$).¹⁴⁰

O valor de IC_{50} (concentração do complexo que inibe em 50% a atividade da enzima EAcH) foi calculado a partir da curva de regressão em que o eixo x corresponde à concentração do complexo **1** em μM e o eixo y corresponde à porcentagem de inibição do complexo **1**. O valor de IC_{50} foi determinado como sendo

63,60 μM a partir do gráfico de atividade da enzima (%) vs. a concentração do complexo, apresentado na Figura 55.

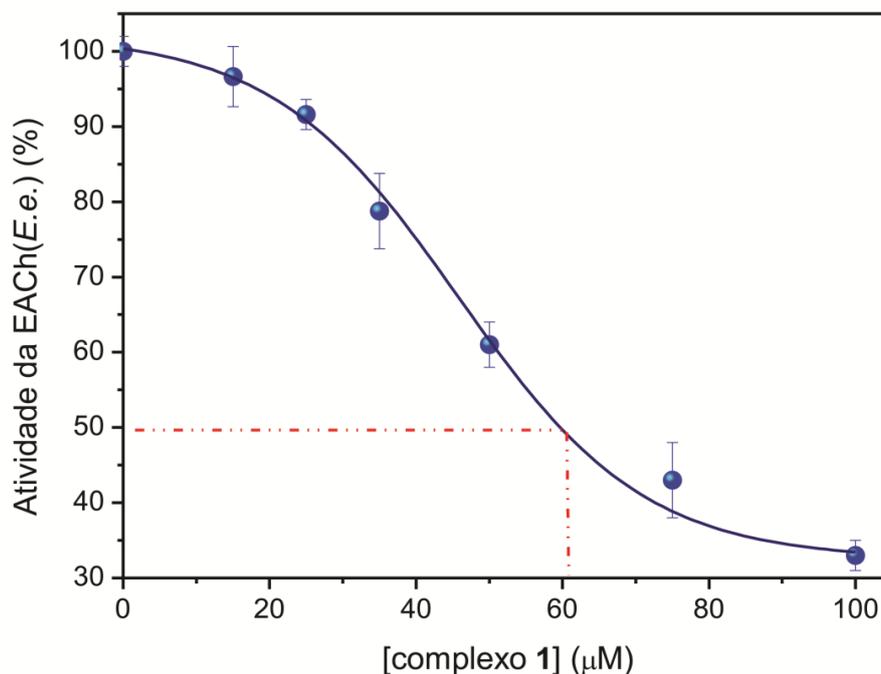


Figura 55: Gráfico da porcentagem da atividade da enzima ECh(E.e.) vs. concentração do complexo 1. O valor de IC_{50} foi determinado pela leitura da concentração que conduz a inibição em 50% da atividade da enzima (linha pontilhada).

O complexo 1 não é inibidor tão potente como o aldicarb ($\text{IC}_{50} = 10,47 \mu\text{M}$), um pesticida do tipo carbamato que atua na enzima ECh,¹⁴¹ mas o seu efeito inibidor não-competitivo frente à enzima ECh, combinada com a sua forte hidrofiliabilidade, baixa ecotoxicidade em sistemas aquáticos e o modo de ação inseticida lento exibido para as formigas cortadeiras, conforme requerido para controle e/ou destes insetos praga, merecem ser reconhecidos.

Conforme dito anteriormante, os complexos 5-9 em concentração de 100 μM não apresentam atividade inibitória frente à enzima ECh(E.e.). Este é um ponto interessante, pois apesar dos complexos de magnésio apresentarem atividade inibitória frente à enzima acetilcolinesterase de vertebrados, eles foram mais efetivos no combate às formigas cortadeiras. Em um primeiro momento, isto nos leva a pensar que o modo de ação é outro ou talvez a enzima acetilcolinesterase não é a mais adequada para estes ensaios, já que vários estudos tem relatada algumas diferenciações específicas entre enzimas de vertebrados e invertebrados. Assim,

considerando este último ponto, foram realizados experimentos de inibição de enzimas colinesterases de extratos de formigas cortadeiras frente aos complexos **5-9**.

4.4.2.2 - Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase ECh(A.s.r.)

Com o intuito de verificar o modo de ação e a seletividade dos complexos **5-9**, ensaios de inibição com a enzima ECh(A.s.r.) foram realizados seguindo o método proposto por Ellman.¹⁰²

Os dados cinéticos para a formação do íon TNB, obtidos da absorbância (412 nm) vs. tempo, foram tratados em termos de porcentagem da atividade enzimática e estão demonstrados na Figura 56. Foi verificado que os complexos **5-8** em concentração de 15 μ M inibiram 100% da atividade da enzima ECh(A.s.r.) e o complexo **9** (15 μ M) inibiu 89% da atividade desta enzima.

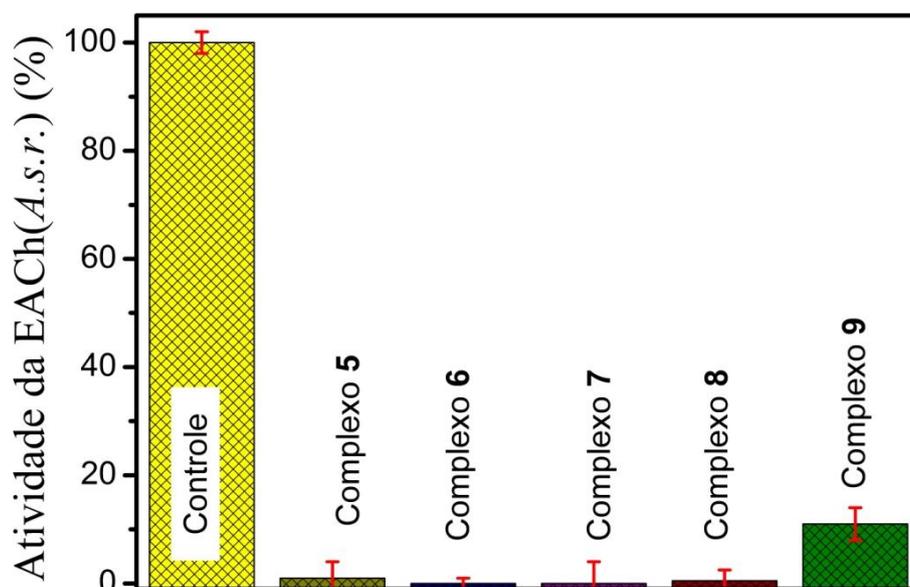


Figura 56: Atividade das enzimas colinesterases do extrato de formigas *Atta sexdens rubropilosa* no sistema controle e na presença dos complexos **5-9**.

Com base nestes ensaios enzimáticos sugere-se que as propriedades da ECh(E.e) diferem da ECh(A.s.r.), principalmente no que diz respeito à sensibilidade a inibidores. Além disso, estes estudos revelam que os complexos **5-9** são potenciais candidatos para o desenvolvimento de pesticidas seletivos, inclusive para a espécie *Atta sexdens rubropilosa*.

Estes dados são muito relevantes para o mecanismo de ação dos complexos de magnésio sob investigação, pois mostram que estes complexos atuam principalmente no sistema nervoso central das formigas, inibindo a enzima colinesterase. Vale ressaltar que o método de Ellman usado neste estudo não distingue o tipo de colinesterase (acetilcolinesterase, butirilcolinesterase) mas é específico para esta classe de enzimas.

Cabe ressaltar a interessante seletividade apresentada pelos complexos de magnésio para a enzima colinesterase de invertebrados, neste caso as formigas cortadeiras, e não especificidade para vertebrados, como observado para o peixe elétrico *E. electricus*, indicando a baixa toxicidade desses compostos ao ecossistema local (pássaros, animais e homens) em ambientes em que forem usados como inseticida.

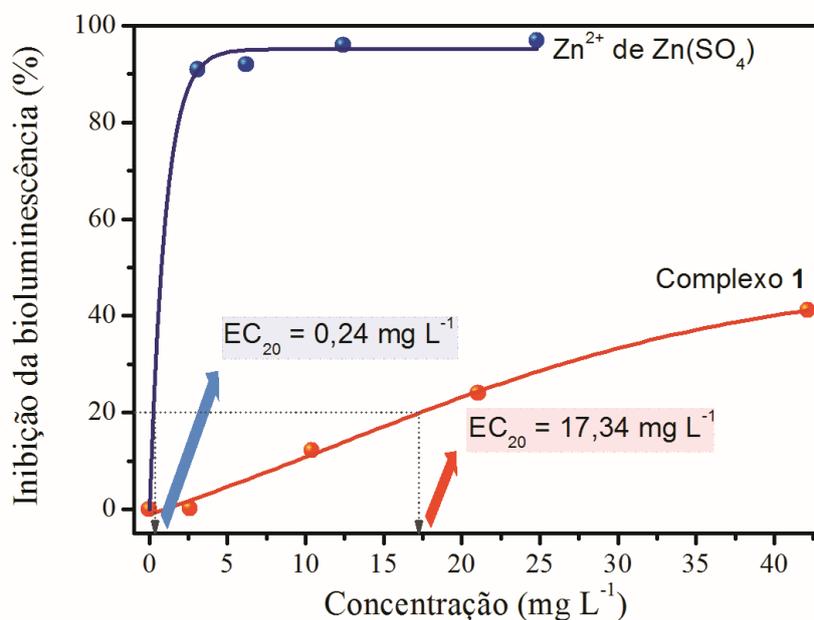
4.4.3 - Avaliação da Ecotoxicidade (testes de toxicidade aguda)

Em geral, o ecossistema aquático é adaptado a inúmeros mecanismos físicos, químicos e biológicos, pelos quais as substâncias ou contaminantes podem ser assimilados sem implicações sérias para o bioma. No entanto, quando os níveis de contaminação assimilados são elevados, a sobrevivência, o desenvolvimento, o crescimento e a reprodução ou bem-estar dos organismos podem ser gravemente afetados.¹⁴² Contudo, a causa da proibição de muitos inseticidas se dá devido à alta toxicidade em vários ecossistemas, inclusive o aquático. Logo, na busca de um novo inseticida faz-se necessário também avaliar o risco ecotoxicológico de um candidato em potencial à inseticida. Neste sentido, a alta solubilidade em água apresentada pelos complexos gera preocupações sobre possíveis riscos em ambientes aquáticos. Por esta razão, investigou-se a toxicidade aguda dos complexos **1** e **5** com a bactéria *Vibrio fischeri*.

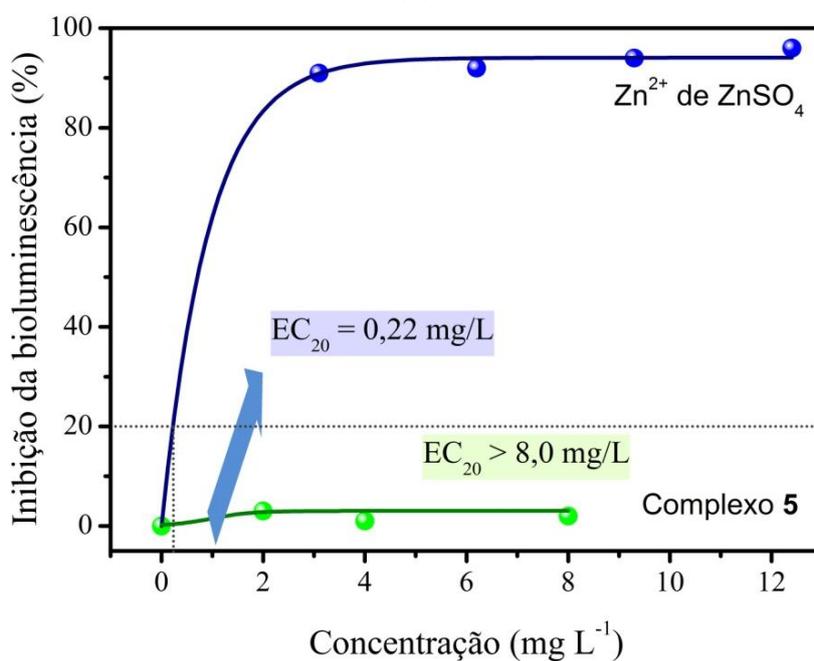
O ensaio de toxicidade com *V. fischeri* é padronizado pela Norma Técnica CETESB L5.227, elaborada em 1987 e revisada em 2001 e credenciado junto ao INMETRO de acordo com a norma NBR/ISSO 17025 (ABNT, 2001). Órgãos ambientais do Estado de São Paulo e Santa Catarina utilizam tais ensaios como parâmetro de controle de lançamentos de efluentes.¹⁴³

As Figuras 57(a) e 57(b) apresentam a porcentagem de inibição da bioluminescência da bactéria *Vibrio fischeri* vs. a concentração do complexo **1** e **5**,

respectivamente, e para fins de comparação o bioensaio Microtox também foi realizado com a substância tóxica padrão de zinco (ZnSO_4).



(a)



(b)

Figura 57: Gráficos de porcentagem de inibição da bioluminescência da bactéria *Vibrio fischeri* vs. a concentração do complexo 1 (a) e do complexo 5 (b), ambos com o padrão ZnSO_4 .

Os valores de EC_{20} (concentração que causa a inibição de 20% da luminescência da bactéria) dos complexos **1** ($EC_{20} = 17,34$ mg/L) e **5** ($EC_{20} >> 8,0$ mg/L) foram muito mais altos em comparação ao padrão de Zn ($EC_{20} = 0,24$ mg/L). Os dados sugerem que os complexo **1** e **5** não apresentam risco aparente a sistemas aquáticos, uma vez que quanto maior é a concentração de um composto capaz de causar efeito deletério menor é sua toxicidade.

4.4.4 - Ensaios de citotoxicidade com células humanas

A avaliação da toxicidade de pesticidas usando células humanas é muito importante devido ao efeito nocivo que muitos pesticidas apresentam para organismos humanos.¹⁴⁴ Assim, a elucidação de efeitos tóxicos de pesticidas em células humanas, juntamente com outros parâmetros, como os mecanismos de ação por exemplo, pode ajudar na compreensão dos possíveis efeitos a longo prazo de produtos químicos agrícolas em seres humanos.

As células HeLa, uma linhagem celular estabelecida, foi originalmente isolada de um carcinoma cervical uterino humano pelo Dr. George Gey em 1951. Elas foram selecionadas para utilização neste estudo devido ao conhecimento disponível sobre o ciclo de eventos que levam ao seu crescimento e proliferação (duplicação em cerca de 24 h e sua capacidade de se multiplicar indefinidamente quando mantidas em condições apropriadas. Além disso, células HeLa representam prototicamente células de epitélio humano, já que sua sensibilidade a várias classes de pesticidas é comparável aos dos queratinócitos humanos.¹⁴⁵ O epitélio é geralmente o lugar de contato primário de um organismo com compostos tóxicos. Por isso, as células HeLa têm sido utilizadas para estudar os efeitos de adversos inseticidas organofosforados e organoclorados.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

A citotoxicidade dos complexos **1**, **5** e **7** foi avaliada usando-se a linhagem celular do cancro humano, HeLa. Na faixa de concentração testada observa-se que estes complexos não apresentam efeito inibitório significativa no crescimento das células HeLa,. Os valores de IC_{50} (concentração dos complexos **1**, **5** e **7** que inibe em 50% o crescimento celular) foram calculados a partir da análise das curvas de regressão, Figura 58.

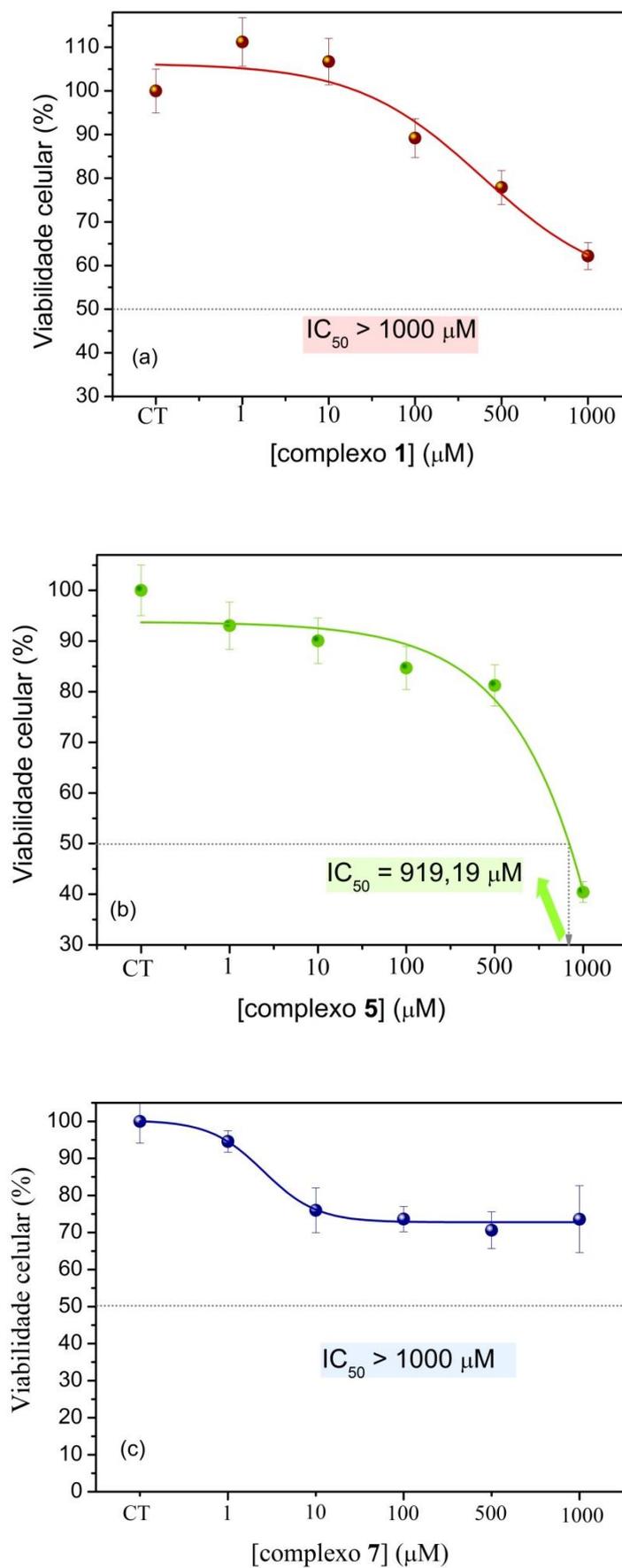


Figura 58: Ensaios MTT para estimar a citotoxicidade dos complexos 1 (a), 5 (b) e 7 (c) em células HeLa.

Os valores altos de IC_{50} obtidos, $> 1000 \mu\text{M}$ para o complexo **1**, $919,2 \mu\text{M}$ para o complexo **5** e $> 1000 \mu\text{M}$ para o complexo **7**, sugerem que estes compostos apresentam toxicidade irrelevante para as células HeLa.

Contudo, este método não pode servir como o único modelo para avaliação da toxicidade desses compostos em células humanas, devido à grande complexidade do sistema biológico dos organismos vivos, merecendo, portanto, maiores investigações.

4.5 - Considerações Relevantes

Nesta etapa do trabalho, alguns pontos merecem ser destacados. A solubilidade, estabilidade, baixa citotoxicidade, características espectroscópicas como absorção e emissão (que são dependentes do meio) e propriedades redox mostram que os complexos de magnésio podem apresentar aplicabilidade em várias áreas das ciências. Em particular, isto nos motivou a iniciar outras investigações direcionadas para o meio biológico. Assim, investigou-se a habilidade dos complexos **5** e **7** em atuar como sondas fluorescente em meio celular utilizando células HeLa e avaliou-se a habilidade dos complexos **5** e **7** em sequestrar radicais superóxido (gerado pelo sistema MET/Vit.B2/NBT).

4.5.1 - Sondas Luminescentes

Marcadores luminescentes para biomoléculas e estruturas celulares são importantes para uma variedade de aplicações terapêuticas, diagnósticos e mecânicos.^{148, 149} Eles conferem características de luminescência úteis para biomoléculas para fins de detecção e quantificação.¹⁵⁰ Além disso, os métodos de microscopia confocal e espectrofluométricos podem ser usados para investigar a absorção celular de biomoléculas marcadas e as suas interações com componentes celulares. Assim, os reagentes de rotulagem luminescentes desempenham um papel crucial em muitos ensaios biológicos. Além disso, imagem fluorescente é um sistema não-invasivo e é uma das técnicas disponíveis mais poderosas para a determinação de comportamentos dinâmicos e para observar no interior de um única célula viva.¹⁵¹

Mg^{2+} é um dos cátions bivalentes mais importantes na célula, atuando em várias centenas de reações enzimáticas. Para quantificar a concentração de

Mg²⁺ e sua distribuição intracelular para compreender o importante papel que desempenha no corpo, sondas fluorescentes de magnésio como Mag-Fura, Magnesium Green e Magnésium Orange, por exemplo, foram planejados e sintetizados.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Usando Mag-Fura-2, a concentração intracelular de Mg²⁺ já foi estudado em células do fígado,¹⁵⁵ coração,¹⁵⁶ músculos,¹⁵⁷ e sistema nervoso.¹⁵⁸ Também, complexos do tipo Mg-cumarinas (KMG-20-AM e KMG-27-AM) têm sido sintetizados e os resultados experimentais mostraram claramente que tais compostos são excelentes sondas fluorescentes.¹⁵⁹

4.5.1.1 - Microscopia confocal

Absorção celular e distribuição intracelular dos complexos **5** e **7** foram investigadas utilizando-se microscopia confocal. As imagens das células HeLa incubadas com estes complexos luminescentes a 37 ° C durante 30 minutos são apresentados nas Figuras 59 e 60, respectivamente. Após excitação em 370 nm, as células incubadas com os complexos exibiram intensa intensidade de emissão, indicando eficiente absorção celular das moléculas dos complexos **5** e **7**. Estes foram localizados na região perinuclear, formando anéis luminescentes em torno dos núcleos das células, e no interior dos núcleos as emissões foram pouco ou nada perceptíveis, indicativo de uma desprezável absorção do complexo na região nuclear. Isto sugere que tal composto não interage com o núcleo das células, evitando possíveis mutações por parte deste composto. Além disso, a internalização altamente eficiente dos complexos em baixa concentração (5 µM) em um tempo de incubação relativamente curto (30 min) associado à irrelevante toxicidade apresentada frente à célula HeLa sugere que os complexos **5** e **7** são candidatos atraentes para o potencial uso como reagentes biomarcador.

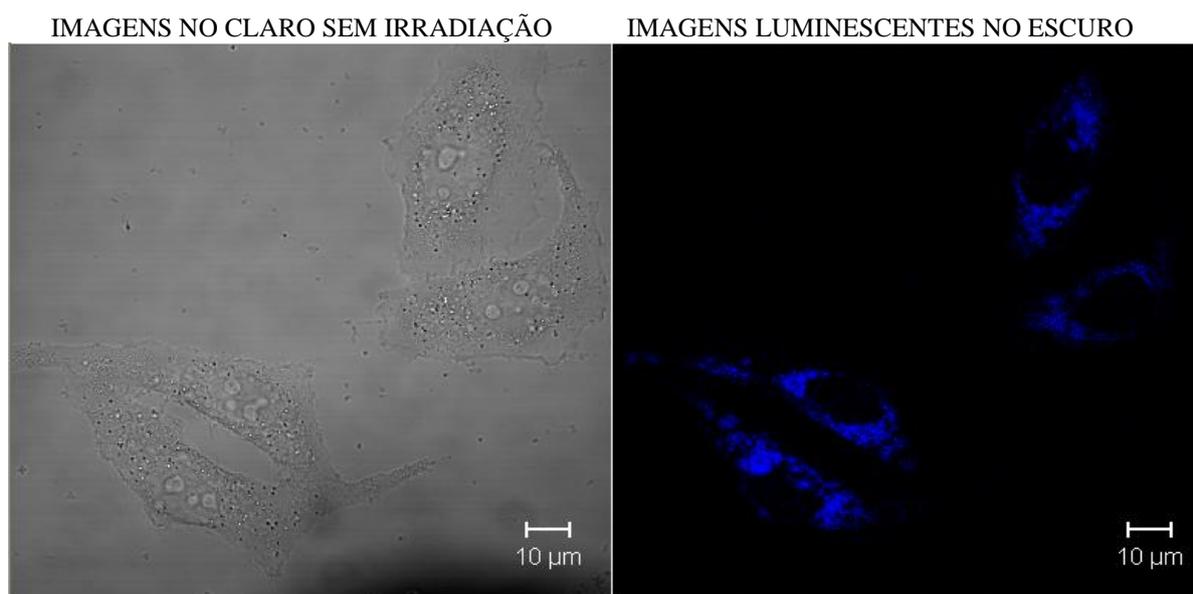


Figura 59: Imagens confocal de células HeLa incubadas com o complexo **5** (5 µM) à 37 °C por 30 min.

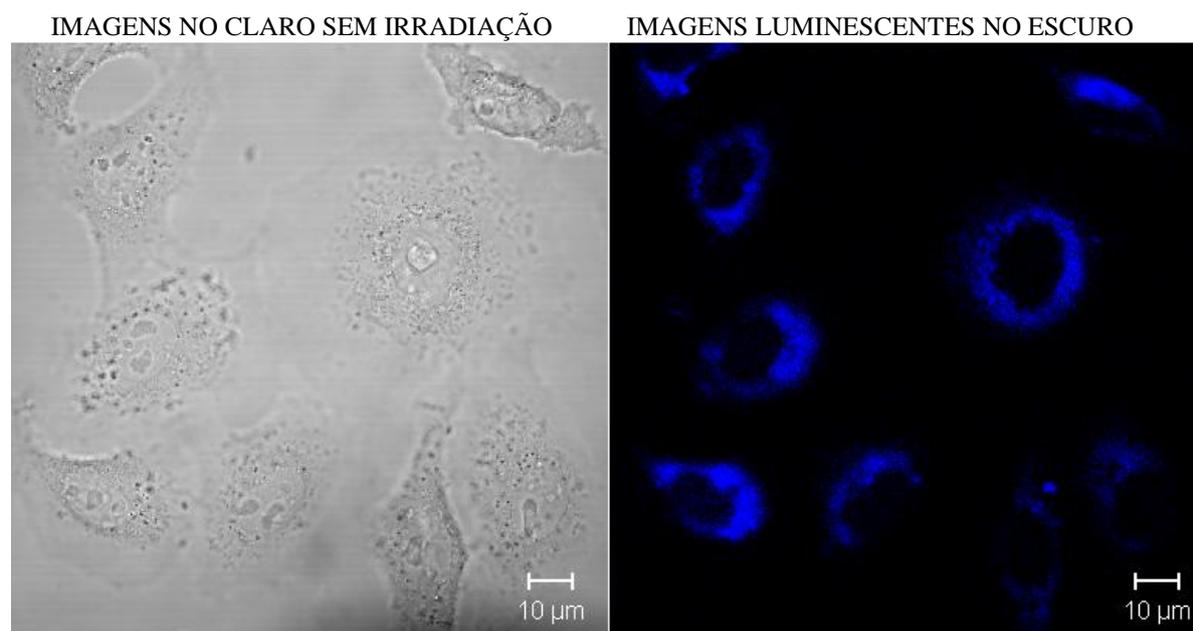


Figura 60: Imagens confocal de células HeLa incubadas com o complexo **7** (5 µM) à 37 °C por 30 min.

4.5.2 - Radical Superóxido

A maior parte do oxigênio consumido pelos sistemas biológicos é reduzido a água por meio do ciclo catalítico do citocromo-P450, mas cerca de 5% é convertido em ânions superóxido.¹⁶⁰ O ânion radical superóxido, $O_2^{\bullet-}$, é formado pela redução de um elétron do oxigênio molecular (O_2).¹⁶¹ É o radical mais perigoso entre todos os radicais de oxigênio porque um tem um tempo de meia-vida longo e possui alta mobilidade no meio celular.¹⁶² Além disso, atua como um iniciador de outros radicais como o radical hidroxila por exemplo e, devido à suas propriedades redox e sua natureza paramagnética¹⁶³ provoca efeitos deletérios da sua reação com diferentes compostos orgânicos no meio celular. Contudo, vários estudos têm mostrado que deficiência de Mg em animais provoca o aumento da produção de radicais livres¹⁶⁴, já que que a presença de íons Mg^{2+} evita a produção de radicais livres de oxigênio no cérebro¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ e inibe os efeitos catastróficos do superóxido em células do âmnio de humanos.¹⁶⁵ Lembrando que *âmnio* é o nome dado à bolsa que alguns vertebrados possuem durante o seu desenvolvimento embrionário. O líquido amniótico tem função protetora, permitindo que o embrião se desenvolva num ambiente úmido, além de amortecer os choques térmicos e mecânicos.

Além do mais, estudos mostram que vários complexos do tipo metal-flavonóide são muito mais potentes como eliminadores de radicais superóxido do que os seus correspondentes flavonóides não complexados.^{37, 53, 168, 169, 170}

4.5.2.1 - Investigações da atividade sequestradora de radicais $O_2^{\bullet-}$

Com base nos potenciais redox obtidos através da voltametria cíclica, em pH 7,8, sugere-se que o menor potencial de oxidação da hesperidina complexada ao íon Mg^{2+} no complexo **5** (+0,58 V vs. Ag/Ag⁺), em comparação à sua forma livre (+0,66 V vs. Ag/Ag⁺), além da formação de cátion radical fenoxil de potencial de oxidação ainda menor (+0,38 V vs. Ag/Ag⁺), podem estar associados à mais alta atividade antioxidante do complexo **5** em relação à hesperidina livre.

Por isso, buscou-se investigar a capacidade sequestradora de radicais superóxido pelos complexos **5** e **7** e pelos flavonóides livres hesperidina e naringenina para fins de comparação. Para isso, usou-se o sistema MET/Vit.B₂/NBT para gerar o radical superóxido em tampão fosfato pH 7,8. A diminuição da produção

do radical superóxido foi medida por espectroscopia UV-Vis, monitorando-se a absorbância em 560 nm referente à formação do formazano a partir da redução quantitativa de NBT por $O_2^{\bullet-}$.

Na faixa de concentração testada observa-se que o efeito inibitório em $O_2^{\bullet-}$ aumenta com o aumento da concentração do complexo **5** e hesperidina livre, Figura 61, e do complexo **7** e naringina livre, Figura 62.

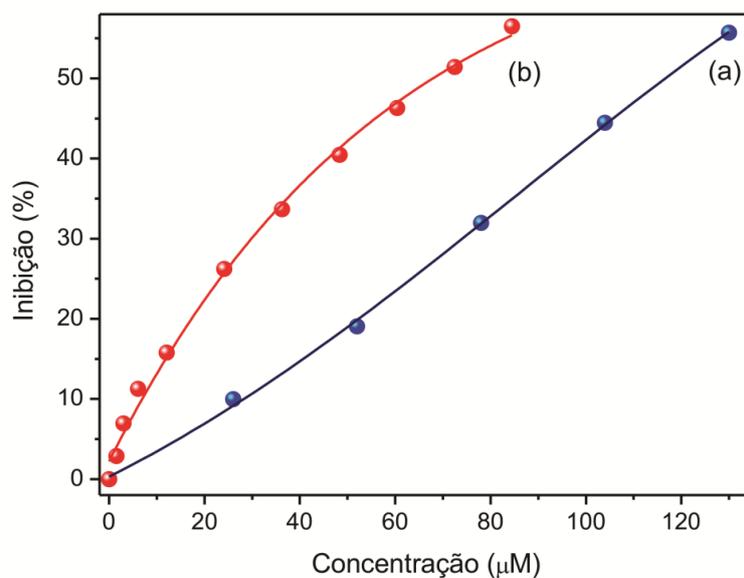


Figura 61: Efeito da hesperidina (a) e do complexo **5** (b) na inibição de $O_2^{\bullet-}$. Os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 2$).

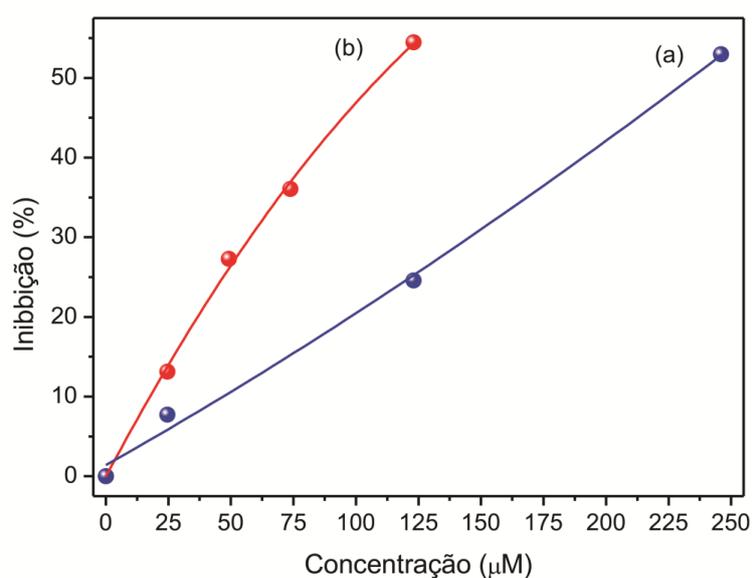


Figura 62: Efeito da naringina (a) e do complexo **7** (b) na inibição de $O_2^{\bullet-}$. Os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 2$).

Os valores de IC_{50} (concentração do composto que inibe em 50% a formação de $O_2^{\bullet-}$) foram calculados a partir da análise dos gráficos de log da concentração do composto teste (μM) vs. a porcentagem de inibição de $O_2^{\bullet-}$ apresentados nas Figuras 63 e 64 para os complexos **5** e **7**, respectivamente.

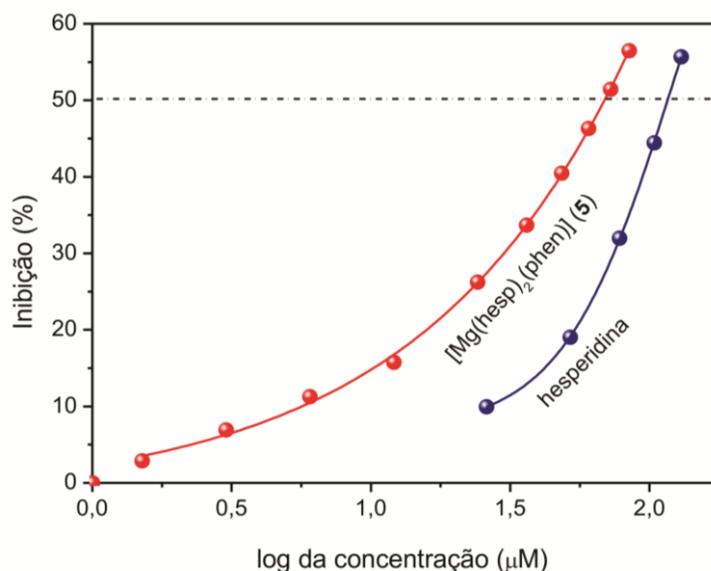


Figura 63: Gráfico de log da concentração do composto teste (μM) vs. a porcentagem de inibição de $O_2^{\bullet-}$, onde a concentração correspondente à inibição de 50% equivale ao valor de IC_{50} .

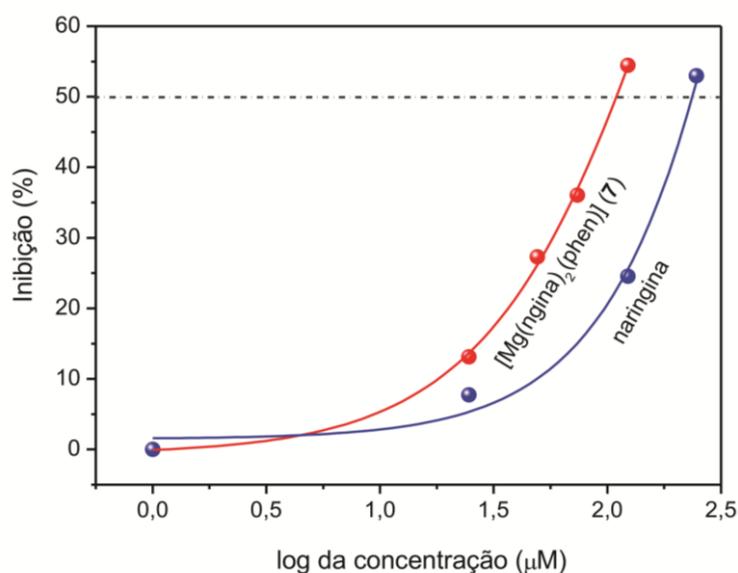


Figura 64: Gráfico de log da concentração do composto teste (μM) vs. a porcentagem de inibição de $O_2^{\bullet-}$, onde a concentração correspondente à inibição de 50% equivale ao valor de IC_{50} .

Os valores de IC₅₀ dos complexos **5** (68,8 μM) e **7** (126 μM) foram bem menores do que dos seus respectivos flavonóides livres hesperidina (116,7 μM) e naringina (230 μM). Portanto, estes complexos apresentam também atividade antioxidante mais elevada para O₂^{•-} em comparação com a observada para o padrão de antioxidantes, a vitamina C (CI₅₀ = 852 μM).¹⁷¹

Sugere-se que a capacidade sequestradora de radicais superóxido apresentada pelos complexos **5** e **7** pode ocorrer, em pH 7,8, pelas seguintes reações:



Portanto, a maior capacidade sequestradora de O₂^{•-} apresentada pelos complexos **5** e **7** pode está associado com o menor potencial de oxidação apresentado por estes em comparação aos seus respectivos flavonóides livres hesperidina e naringina, coerente com vários estudos apresentados na literatura para complexos metal-flavonóides.^{54, 56} Conforme comentado anteriormente, o efeito estabilizador da fração {Mg(phen)}²⁺ na forma aniônica destes flavonóides também pode está favorecendo o processo de transferência do elétron.

Capítulo 5

Conclusões

5 - CONCLUSÕES

Os compostos obtidos neste trabalho, *cis*-[Ru(phen)₂(hesp)](PF₆) (**1**), *cis*-[Ru(phen)₂(hespt)](PF₆) (**2**), *cis*-[Ru(phen)₂(ngina)](PF₆) (**3**), *cis*-[Ru(phen)₂(ngnina)](PF₆) (**4**), *cis*-[Mg(phen)(hesp)₂] (**5**), *cis*-[Mg(phen)(hespt)₂(H₂O)₂] (**6**), *cis*-[Mg(phen)(ngina)₂] (**7**), *cis*-[Mg(phen)(ngnina)₂(H₂O)₂] (**8**), *cis*-[Mg(hesp)₂(H₂O)₂] (**9**), são inéditos na literatura de acordo com o levantamento bibliográfico realizado.

Os compostos **1-9** apresentaram rendimentos satisfatórios na faixa de 65-80% e são estáveis ao ar tanto na forma sólida como em solução.

A composição dos compostos **1-9** foram evidenciadas através das análises elementar (H,C,N), ESI-MS e absorção atômica (para alguns casos), e a caracterização pelas técnicas IV, UV-Vis, RMN de ¹H e ¹³C foram importantes na elucidação estrutural dos mesmos.

Os resultados obtidos mostram a viabilidade de uso dos complexos obtidos no meio biológico:

- Os ensaios realizados com os compostos **1-9** e seus respectivos ligantes livres frente às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* mostraram que os flavonóides livres não apresentaram diferença significativa comparada ao controle de acordo com o teste log-rank (p<0,05) e por isso foram considerados não ativos, assim como os complexos **2-4**. Contrariamente, o complexo **1** se mostrou mais eficiente que os seus análogos da mesma série (**2-4**), com S₅₀ de 4 dias e 86% de mortalidade no 25° dia de experimento. Entretanto, os compostos **5-8** foram os que apresentaram atividade inseticida mais significativa, com 100% de mortalidade no 25° dia de experimento e S₅₀ de aproximadamente 5 dias, cujas eficiências foram similares à apresentada pelo inseticida comercial sulfluramida.

- Os ensaios de inibição com a enzima acetilcolinestetase(*E.e*) sugerem que o complexo **1** e o substrato ASCh possuem afinidade por sítios diferentes da enzima AchE, cuja interação ocorre através de um mecanismo não-competitivo. Contrariamente, os complexos de Mg(II) se mostraram inativos para esta enzima nas condições estudadas. Porém, estes últimos foram bastante

eficientes frente à enzima(A.s.r.), sugerindo maior seletividade de interação com as enzimas do inseto.

- Os ensaios de ecotoxicidade com a bactéria aquática *Vibrio Fisheri* (indicando baixa toxicidade para invertebrados aquáticos) e de citotoxicidade com as células humanas HeLa (a qual possui resposta similar às células do epitélio humano, indicando toxicidade irrelevante), revelam o potencial uso destes complexos como uma nova alternativa para o combate de insetos praga.

- As propriedades físico-químicas, a luminescência intensa dependente do solvente e do pH e os estudos de atividade antioxidante, apesar de preliminares, abrem uma nova fronteira de aplicações para os complexos de Mg que podem abranger desde aplicações farmacológicas e diagnóstico aos dispositivos óptico eletrônicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERRER, E. G.; SALINAS, M. V.; CORREA, M. J.; NASO, L.; BARRIO, D. A.; ETCHEVERRY, S. B.; LEZAMA, L.; ROJO, T.; WILLIAMS, P. A. M. "Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes". *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**: 791, 2006.
2. NETO, S. P. D. S. A evolução da produtividade da soja no Brasil. [http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/335/\(23/08\)](http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/335/(23/08)),
3. LANDIM, R. Brasil já é o terceiro maior exportador agrícola do mundo. <http://www.estadao.com.br/noticias/economia,brasil-ja-e-o-terceiro-maior-exportador-agricola-do-mundo,520500,0.htm> (06/03),
4. CARVALHO, A. R. "Relações da atividade agropecuária com parâmetros físicos químicos da água". *Quím. Nova*, **23**: 618, 2000.
5. ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; ABREU, L. G. "Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)". *Revista Árvore*, **27**: 407, 2003.
6. HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O., *The ants*. Harvard University Press: Cambridge, 1990; p 732.
7. FORTI, L. C. "Se o produtor vacilar, o exército das formigas invade a lavoura". *A Granja*, **5**: 12, 2000.
8. AUGUSTIN, E.; LOECK, A. E.; STORCH, G.; GRÜTZMACHER, D. D.; AFONSO, A. P. S.; GUSMÃO, L. G. "Identificação de formigas cortadeiras do gênero *acromyrmex* (hymenoptera:formicidae) através de isoenzimas". *Rev. Bras. Agroc.*, **5**: 217, 1999.
9. ZANUNCIO, J. C., Lepidópteros desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle. In IPEF/SIF: Viçosa, 1993; p 140.
10. URBAS, P.; ARAUJO, M. V.; LEAL, I. R.; WIRTH, R. "Cutting more from cut forests: Edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in Brazil". *Biotropica*, **39**: 489, 2007.
11. ORTIZ, G.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. "Morpho-physiological Differences of the Spermatheca of Attini Ants (Hymenoptera: Myrmicinae) ". *A. J. Agricul. Biology. Science.*, **1**: 58, 2006.

12. PEREIRA, L. G. B., *Estratégias de controle de formigas cortadeiras*. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC/MG: Minas Gerais, 2007; p 21p.
13. LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K., *Fire leaf-cutting ants: biology and management*. Westview Press: London, 1986.
14. GUEDES, R. N. C.; ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J. C.; MEDEIROS, A. G. B. " Species richness and fluctuation of defoliator Lepidoptera populations in brazilian plantations of *Eucalyptus grandis* as affected by plant age and weather factors". *Forest Ecol. Manag.* , **137**: 179, 2000.
15. GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S., *Manual de Entomologia Agrícola*. Agronômica CERES: São Paulo, 1988; p 649.
16. MARICONI, F. A. M., *As saúvas*. Agronômica Ceres: São Paulo, 1970; p 179.
17. BRASIL, *Agrotóxicos e afim*. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal - Ministério da Agricultura: Brasília, 1998.
18. BRASIL, *Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos*. Secretaria de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde Brasília, 1997; p 69.
19. SINDAG <http://www.sindag.com.br/html/banco.php3> (22/09),
20. ANVISA Agência Nacional de Vigilância sanitária:Toxicologia. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/para> (Acesso em: 30 de agosto de 2005),
21. ANVISA Agência Nacional de Vigilância sanitária: Agrotóxicos. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm> (Acesso em: 01 de maio de 2006),
22. MAPA Agrofit. Disponível em: <http://www.mapa.gov.br/agrofit> (Acesso em: 01 de maio de 2006),
23. VALÉRIO, J. R., Insetos-praga em pastagens tropicais 2005, pp 98.
24. SANTOS, G. P.; GOMES, J. M.; ZANUNCIO, J. C.; BRANDI, R. M. "Controle de saúvas pelo sistema de termonebulização na região de Timóteo, MG". *Brasil florestal*, **9**: 18, 1979.
25. SILVA, E. D., *Formigas cortadeiras: problemas e soluções - Dossiê Técnico*. S. Paulo/SP, 1993; p 28p.

26. MUIR, D. C. G.; DE WIT, C. A. "Trends of legacy and new persistent organic pollutants in the circumpolar arctic: Overview, conclusions, and recommendations". *Sci. Total Environ.*, **408**: 3044, 2010.
27. EPA "Environmental Protection Agency". *Federal Register* **67**: 72854, 2002.
28. NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; JR., C. R. "Pesticidas". *r. ecotoxicol. e meio ambiente*, **16**: 93, 2006.
29. SANTOS, S. P. A *Química dos inseticidas (parte I)*. Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa Lisboa/Portugal, 1999; pp 43.
30. RAMOS, L. S.; MARINHO, C. G. S.; ZANETTI, R.; DELABIE, J. H. C.; SCHLINDEWEIN, M. N. " Impacto de iscas formicidas granuladas sobre a mirmecofauna não-alvo em eucalipitais segundo duas formas de aplicação". **32**: 231, 2003.
31. FORTI, L. C.; PRETTO, D. R.; NAGAMOTO, N. S.; PADOVANI, C. R.; CAMARGO, R. S.; ANDRADE, A. P. P. "Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)". *Sociobiology* **50**: 1149, 2007.
32. VICTOR, S. R.; CRISOSTOMA, F. R.; BUENO, F. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; CORREA, A. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. "Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus". *Pest Manag. Sci.*, **57**: 603, 2001.
33. ZANETTI, R.; DIAS, N.; REIS, M.; SOUZA-SILVA, A.; MOURA, M. A. "Efficiency of granulated baits (sulfluramid 0.3%) in the control of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)". *Ciencia e Agrotecnologia*, **28** 878, 2004.
34. BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L.; DE GROOTE, S. T.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. "Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera : Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*". *Pest Manag. Sci.*, **60**: 933, 2004.
35. SANTOS, S. P. A *Química dos inseticidas (parte II)*. ; Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa: Lisboa/Portugal 1999 pp 37.

36. FUKR, U.; KLITTICH, K.; STAIB, A. H. " Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man". *J. Clin. Pharmacol.* , **33**: 431, 1993.
37. BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. "Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies". *Meth. Enzymol.*, **186**: 343, 1990.
38. LAMBEV, I.; KRUSHKOV, I.; ZHELIAZKOV, D.; NIKOLOV, N. "Antiexudative effect of naringin in experimental pulmonary edema and peritonitis". *Eksperim. Med. Morfol.*, **19**: 207, 1980.
39. TANG, B. Y.; ADAMS, N. R. "Effect of equol on estrogen-receptors and on synthesis of dna and protein in the immature rat uterus". *J. Endocrinol.*, **85**: 291, 1980.
40. ROSS, J. A.; KASUM, C. M. "Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety". *Annu. Rev. Nutr.*, **22**: 19, 2002.
41. SAWALHA, S. M. S.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. "Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS". *Food Chem.*, **116**: 567, 2009.
42. EMIM, J. A. D. S.; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. "Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the Isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice". *J. Pharm. Pharmacol.* , **46**: 118, 1994.
43. BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. "Uses and properties of Citrus flavonoids". *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 4505, 1997.
44. YEH, C. C.; KAO, S. J.; LIN, C. C.; WANG, S. D.; LIU, C. J.; KAO, S. T. "The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and *in vitro*". *Life Sci.*, **80** 1821, 2007.
45. KIM, J. Y.; JUNG, K. J.; CHOI, J. S.; CHUNG, H. Y. "Hesperetin: a potent antioxidant against peroxynitrite". *Free Radical Res.*, **38** 761, 2004.
46. WILCOX, L. J.; BORRADAILE, N. M.; DE DREU, L. E.; HUFF, M. W. "Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP". *J. Lipid Res.*, **42** 725, 2001.

47. KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V. P. "Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane". *Mol. Cell. Biochem.*, **323**: 21, 2009.
48. SCHAL, C. "Sulfluramid resistance and vapor toxicity in field-collected German cockroaches". *J. Med. Entomol.*, **29**: 207, 1992.
49. GROHMANN, K.; MANTHEY, J. A.; CAMERON, R. G. "Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures". *Carbohydr. Res.*, **328**: 141, 2000.
50. PURI, M.; KAUR, A.; SCHWARZ, W. H.; SINGH, S.; KENNEDY, J. F. "Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste". *Int. J. Biol. Macromol.*, **48**: 58, 2011.
51. KUMAR, S.; DHAR, D. N.; SHAXENA, P. N. "Applications of metal complexes of schiff bases-A review". *J. Sci. Ind. Res.*, **68**: 181, 2009.
52. GRAZUL, M.; BUDZISZ, E. "Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones". *Coord. Chem. Rev.*, **253**: 2588, 2009.
53. DE SOUZA, R. F. V.; DE GIOVANI, W. F. "Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions". *Redox Rep.*, **9**: 97, 2004.
54. SHARVELLE, E. G., *The nature and uses of modern fungicides*. Minneapolis: Burgess, 1961; p 308.
55. HARRISA, R. J.; ETHERIDGE, N. D. "Comparison of baits containing fipronil and sulfluramid for the control of *Vespula* wasps". *New Zeal. J. Zool.*, **28**: 39, 2001.
56. LTDA, A. E., *Compêndio de defensivos agrícolas*. 8^a ed.; Andrei: 2009; p 1380.
57. DIAS, M. C. Determinação espectrofotométrica de fungicidas ditiocarbamatos em frutos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - Brasil, 1997.
58. ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. "Medicinal inorganic chemistry: Introduction". *Chem. Rev.*, **99**: 2201, 1999.
59. SEDDON, E. A., *The chemistry of ruthenium*. Elsevier: New York, 1984.
60. CLARKE, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord. Chem. Rev.*, **232**: 69, 2002.

61. REEDIJK, J. "Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes SIGNIFICANCE FOR EFFECTIVENESS AS ANTICANCER DRUGS". *Platin. Met. Rev.*, **52**: 2, 2008.
62. ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. "Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects". *Platinum Metals Rev.*, **45**: 62, 2001.
63. DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; ROGERS, W. P.; KOCH, J. H. " Biological activity of complex ions". *Nature*, **170**: 190, 1952.
64. MULCAHY, S. P.; LI, S.; KORN, R.; XIE, X.; MEGGERS, E. "Solid-phase synthesis of tris-heteroleptic ruthenium(II) complexes and application to acetylcholinesterase inhibition". *Inorg. Chem.*, **47**: 5030, 2008.
65. COX, P. A., *Instant Notes. Inorganic Chemistry*. Second Edition ed.; Taylor & Francis: London, 2004.
66. COWAN, J. A., *The biological chemistry of magnesium*. Verlag Chemie: New York, 1995.
67. SHANNON, R. D. "Revised effective ionic-radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides". *Acta Crystallogr. Sect. A*, **32**: 751, 1976.
68. BOCK, C. W.; KAUFMAN, A.; GLUSKER, J. P. "Coordination of water to magnesium cations". *Inorg. Chem.*, **33**: 419, 1994.
69. TAJMIRRIARI, H. A.; THEOPHANIDES, T. "Magnesium-nucleotide interaction - synthesis, structure, H-1, C-13 nuclear magnetic-resonance and fourier-transform infrared studies of Mg-inosine-5'-monophosphate complexes". *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, **63**: 2065, 1985.
70. CRAIG, M. L.; SUH, W. C.; RECORD, M. T. "HO-center-dot and dnase-i probing of e-sigma(70) rna polymerase-lambda-p-r promoter open complexes - Mg²⁺ binding and its structural consequences at the transcription start site". *Biochemistry*, **34**: 15624, 1995.
71. CARUGO, O.; DJINOVIC, K.; RIZZI, M. "Comparison of the coordinative behavior of calcium(ii) and magnesium(ii) from crystallographic data". *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*: 2127, 1993.
72. BEHBEHANI, G. R.; SABOURY, A. A. "A thermodynamic study on the binding of magnesium with human growth hormone - Consideration of the new

- extended coordination model solvation parameters". *J. Therm. Anal. Calorim.*, **89**: 857, 2007.
73. FRAKES, M. A.; RICHARDSON, L. E. "Magnesium sulfate therapy in certain emergency conditions". *Am. J. Emerg. Med.*, **15**: 182, 1997.
74. MUIR, K. W. "Therapeutic potential of magnesium in the treatment of acute". *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **9**: 257, 2000.
75. PEZZEMENTI, L.; JOHNSON, K.; TSIGELNY, I.; COTNEY, J.; MANNING, E.; BARKER, A.; MERRITT, S. "Amino acids defining the acyl pocket of an invertebrate cholinesterase". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem. Mol. Bio.*, **136**: 813, 2003.
76. LI, B.; WANG, Y. H.; LIU, H. T.; XU, Y. X.; WEI, Z. G.; CHEN, Y. H.; SHEN, D. W. "Genotyping of acetylcholinesterase in insects". *Pestic. Biochem. Physiol.*, **98**: 19, 2010.
77. FILGUEIRA, M. <http://marcosfilgueira.wikidot.com/sistema-nervoso-dos-insetos> (1 Dec 2008.),
78. BAEK, J. H.; KIM, J. I.; LEE, D.-W.; CHUNG, B. K.; MIYATA, T.; LEE, S. H. " Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*". *Pestic. Biochem. Physiol.*, **81**: 164, 2005.
79. GAO, J.-R.; KAMBHAMPATI, S.; ZHU, K. Y. "Molecular cloning and characterization of greenbug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage". *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**: 765, 2002.
80. KIM, J. I.; JUNG, C. S.; KOH, Y. H.; LEE, S. H. " Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*". *Insect. Mol. Biol.*, **15**: 513, 2006.
81. KOZAKI, T.; KIMMELBLATT, B. A.; HAMM, R. L.; SCOTT, J. G. "Comparison of two acetylcholinesterase gene cDNAs of the lesser mealworm. *Alphitobius diaperinus*, in insecticide susceptible and resistant strains". *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **67**: 130, 2008.

82. WEILL, M.; FORT, P.; BERTHOMIEU, A.; DUBOIS, M. P.; PASTEUR, N.; RAYMOND, M. "A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*". *Proc. Biol. Sci.*, **269**: 2007, 2002.
83. POLSINELLI, G. A.; SINGH, S. K.; MISHRA, R. K.; SURANYI, R.; RAGSDALE, D. W.; PANG, Y.-P.; BRIMIJOIN, S. " Insect-specific irreversible inhibitors of acetylcholinesterase in pests including the bed bug, the eastern yellowjacket, German and American cockroaches, and the confused flour beetle". *Chem.-Biol. Interac.*, **187**: 142, 2010.
84. LI, B.; WANG, Y. H.; LIU, H. T.; XU, Y. X.; WEI, Z. G.; CHEN, Y. H.; SHEN, W. D. "Genotyping of acetylcholinesterase in insects". *Pestic. Biochem. Physiol.*, **98**: 19, 2010.
85. QUINN, D. M. "Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states". *Chem. Rev.* , **87** 955, 1987.
86. SCHNEIDER, U. A.; HAVLIK, P.; SCHMID, E.; VALIN, H.; MOSNIER, A.; OBERSTEINER, M.; BOTTCHE, H.; SKALSKY, R.; BALKOVIC, J.; SAUER, T.; FRITZ, S. "Impacts of population growth, economic development, and technical change on global food production and consumption". *Agric. Syst.*, **104**: 204, 2011.
87. DURHAM, B.; WALSH, J. L.; CARTER, C. L.; MEYER, T. J. "Synthetic applications of photosubstitution reactions of poly(pyridyl) complexes of ruthenium(II)". *Inorg. Chem.*, **19**: 860, 1980.
88. KRUG, F. J., *Métodos de Preparo de Amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. Copiadora Luis de Queiroz: Piracicaba, 2008.
89. GORELSKY, S. I.; LEVER, A. B. P. " Electronic structure and spectra of ruthenium diimine complexes by density functional theory and INDO/S. Comparison of the two methods". *J. Organom. Chem.*, **635**: 187, 2001.
90. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.;

NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J., J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. *Gaussian 09, Revision A. 02*, Gaussian, Inc.: Wallingford, 2009.

91. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. "Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density". *Phys. Rev.*, **B37**: 785, 1998.

92. BECKE, A. D. "Density-Functional Thermochemistry. III. The role of exact exchange". *J. Chem. Phys.*, **98**: 5648, 1993.

93. HATCHARD, C. G.; PARKER, C. A. "A new sensitive chemical actinometer .2. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer". *Proc. R. Soc. Lond. A*, **235**: 518, 1956.

94. RABEK, J. F., *Photochemistry in Experimental Methods in Photochemistry and Photophysics*. Part 2. ed.; Wiley & Sons: New York, 1967.

95. *Origin, 7.5*; OriginLab Corporation: Northampton, 2006.

96. DEARDEN, J. C. "Partitioning and lipophilicity in quantitative structure-activity relationships". *Environ Health Perspect.*, **61**: 203, 1985.

97. BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKACS-NOVAK, K. "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 335, 2008.

98. HEBLING, M. J. A.; MAROTI, P. S.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A. D.; PAGNOCCA, F. C. "Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)". *Bull. Entomol. Res.*, **86**: 253, 1996.

99. BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. *An. Soc. Entomol. Brasil*, **26**: 107, 1997.
100. ELANDT-JOHNSON, R.; JOHNSON, N. L., *Survival models and data analysis*. John Wiley and Sons: New York, 1980.
101. GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M., *Biochemistry*. 4^a ed.; Mary Finch: 2008.
102. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochem. Pharmacol.*, **7**: 88, 1961.
103. RONZANI, N.; LAJAT, M. "Acetylcholinesterase inhibition by alkaloids of the ant's venom *Monomorium minutum*". *Bioorg. Medic. Chem. Letters*, **5**: 1131, 1995.
104. SEGEL, I. H., *Enzyme kinetics: behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems* John Wiley and Sons: New York, 1975.
105. SILVA, A. C. Tratamento do percolado de um aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Univ. Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
106. KAISER, K. L. E. "Correlations of *Vibrio fischeri* bactéria test data with bioassay data for other organisms". *Environm. Health Persp. Supplem.*, **106**: 583, 1998.
107. FULLADOSA, E.; MURAT, J. C.; MARTÍNEZ, M.; VILLAESCUSA, I. "Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria". *Chemosphere*, **60**: 43, 2005.
108. MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays". *J. Immunol. Methods*, **65**: 55, 1983.
109. DENIZOT, F.; LANG, R. "Rapid colorimetric assay for cell-growth and survival - modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". *J. Immunol. Methods*, **89**: 271, 1986.
110. KIM, D. K.; KIM, G.; GAM, J. S.; CHO, Y. B.; KIM, H. T.; TAI, J. H.; KIM, K. H.; HONG, W. S.; PARK, J. G. "Synthesis and antitumor-activity of a series of 2-substituted-4,5-bis(aminomethyl)-1,3-dioxolane platinum(II) complexes". *J. Med. Chem.*, **37**: 1471, 1994.

111. WINTERBOURN, C. C. "Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals". *Biochem. J.*, **182** 625, 1979.
112. MOHAMMADI, K.; THOMPSON, K. H.; PATRICK, B. O.; STORR, T.; MARTINS, C.; POLISHCHUK, E.; YUEN, V. G.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. "Synthesis and characterization of dual function vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications". *J. Inorg. Biochem.*, **99**: 2217, 2005.
113. SONG, Y. M.; XU, J. P.; DING, L.; HOU, Q.; LIU, J. W.; ZHU, Z. L. "Syntheses, characterization and biological activities of rare earth metal complexes with curcumin and 1,10-phenanthroline-5,6-dione". *J. Inorg. Biochem.*, **103**: 396, 2009.
114. BYABARTTA, P. "Ruthenium(II)-aryloimidazole-8-hydroxyquinolate complexes: Synthesis, spectral study (H, C, COSY, HMQC-NMR) and redox properties". *Russ. J. Inorg. Chem.*, **54**: 1401, 2009.
115. UCHIYAMA, N.; KIM, I. H.; KIKURA-HANAJIRI, R.; KAWAHARA, N.; KONISHI, T.; GODA, Y. "HPLC separation of naringin, neohesperidin and their C-2 epimers in commercial samples and herbal medicines". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 864, 2008.
116. KHAN, M. K.; RAKOTOMANOMANA, N.; LOONIS, M.; DANGLES, O. "Chemical Synthesis of Citrus Flavanone Glucuronides". *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 8437, 2010.
117. HOLM, R. H.; COTTON, F. A. "Spectral investigations of metal complexes of beta-diketones .1. nuclear magnetic resonance and ultraviolet spectra of acetylacetonates". *J. Am. Chem. Soc.*, **80**: 5658, 1958.
118. ZENG, Y. B.; YANG, N.; LIU, W. S.; TANG, N. "Synthesis, characterization and DNA-binding properties of La(III) complex of chrysin". *J. Inorg. Biochem.*, **97**: 258, 2003.
119. TAN, M. X.; ZHU, J. C.; PAN, Y. M.; CHEN, Z. F.; LIANG, H.; LIU, H. G.; WANG, H. S. "Synthesis, Cytotoxic Activity, and DNA Binding Properties of Copper (II) Complexes with Hesperetin, Naringenin, and Apigenin". *Bioinorg. Chem. Appl.*, **347872**: 1, 2009.

120. DIRNITROV, G. D.; NEYKOV, M. V. "Alkaline earth metal ions mediated self-assembly in the presence of 1,10-phenanthroline, nitrate and tetrafluoroborate anions". *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **68**: 399, 2007.
121. ESCANDAR, G. M.; SALA, L. F. "Complexing behavior of rutin and quercetin". *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, **69**: 1994, 1991.
122. VISWANATHAN, P.; SRIRAM, V.; YOGEEESWARAN, G. "Sensitive spectrophotometric assay for 3-hydroxy-substituted flavonoids, based on their binding with molybdenum, antimony, or bismuth". *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 2802, 2000.
123. WOZNICKA, E.; KOPACZ, M.; UMBREIT, M.; KLOS, J. "New complexes of La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Eu(III) and Gd(III) ions with morin". *J. Inorg. Biochem.*, **101**: 774, 2007.
124. DE SOUZA, R. F. V.; DE GIOVANI, W. F. "Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids". *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **61**: 1985, 2005.
125. SERRA, H.; MENDES, T.; BRONZE, M. R.; SIMPLICIO, A. L. "Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones". *Bioorg. Med. Chem.*, **16**: 4009, 2008.
126. HAN, R.-M.; TIAN, Y.-X.; LIU, Y.; CHEN, C.-H.; AI, X.-C.; ZHANG, J.-P.; SKIBSTED, L.-H. "Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants". *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 3780, 2009.
127. SORGI, K. L., *Triethylamine - Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley & Sons: New York, 2001.
128. KATZ, A. K.; GLUSKER, J. P.; BEEBE, S. A.; BOCK, C. W. "Calcium ion coordination: A comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc". *J. Am. Chem. Soc.*, **118**: 5752, 1996.
129. SIERANSKI, T.; KRUSZYNSKI, R. "Magnesium sulphate complexes with hexamethylenetetramine and 1,10-phenanthroline Thermal, structural and spectroscopic properties". *J. Therm. Anal. Calorim.*, **109**: 141, 2012.
130. DUDEV, T.; LIM, C. "Competition between Li^+ and Mg^{2+} in Metalloproteins. Implications for Lithium Therapy". *J. Am. Chem. Soc.*, **133**: 9506, 2011.

131. MAJUMDAR, S.; SRIRANGAM, R. "Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid". *Pharm Res.*, **26**: 1217, 2009.
132. FOTI, M.; PIATTELLI, M.; BARATTA, M. T.; RUBERTO, G. "Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system: structure-activity relationship. ". *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 497, 1996.
133. HARRIS, C. S.; MO, F.; MIGAHED, L.; CHEPELEV, L.; HADDAD, P. S.; WRIGHT, J. S.; WILLMORE, W. G.; ARNASON, J. T.; BENNETT, S. A. "Plant phenolics regulate neoplastic cell growth and survival: a quantitative structure-activity and biochemical analysis". *Can J Physiol Pharmacol.* , **85**: 1124, 2007.
134. MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. " Biossensores baseados no processo de inibição enzimática". *Quim. Nova*, **31**: 1791, 2008.
135. FELDMANNOVÁ, M.; HILSCHEROVÁ, K.; MARSÁLEK, B.; BLAÁHA, L. "Effects of N-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons on survival, reproduction, and biochemical parameters in daphnia magna". *Environ Toxicol* **21**: 425, 2006.
136. KOBETICOVÁ, K.; BEZCHLEBOVÁ, J.; LÁNA, J.; SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J. "Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms". *Ecotoxicol. Environ. Saf.* , **71**: 650, 2008.
137. SHANG, J. Y.; SHAO, Y. M.; LANG, G. J.; YUAN, G.; TANG, Z. H.; ZHANG, C. X. "Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, in insect cells". *Insect Sci.*, **14**: 443, 2007.
138. MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. "Biossensores Baseados no processo de inibição enzimática". *Quim. Nova*, **31**: 1791, 2008.
139. BODUR, E. "Human serum butyrylcholinesterase interactions with cisplatin and cyclophosphamide". *Biochimie*, **92**: 979, 2010.
140. CAMPS, P.; CUSACK, B.; MALLENDER, W. D.; EL ACHAB, R.; MUNOZ-TORRERO, D.; ROSENBERRY, T. L. "Huprine X is a novel high affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for the treatment of Alzheimer's Disease". *Mol. Pharm.*, **57**: 409, 2000.
141. ILG, T.; CRAMER, J.; LUTZ, J.; NOACK, S.; SCHMITT, H.; WILLIAMS, H.; NEWTON, T. "The characterization of *Lucilia cuprina* acetylcholinesterase as a

- drug target, and the identification of novel inhibitors by high throughput screening". *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **41**: 470, 2011.
142. DIAS, A. Testes de toxicidade em artemia salina: contaminante (K₂Cr₂O₇) e efluentes químicos (tratado e não tratado) - Relatório final da Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, 2002.
143. GASI, T. M. T.; TEIXEIRA, N. D. S., *AMBIENTE TÉCNICO - Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental*. 7 ed.; ASEC/CRF - CETESB, 2004.
144. SHARMA, R. P.; OBERSTEINER, J. "Cytotoxic responses of selected insecticides in chick ganglia cultures". *Can. J. Comp. Med.* , **45**: 60, 1981.
145. FORMAN, S.; NOVAK, J.; TYKVA, R.; KAS, J.; WIMMER, Z.; RUMML, T. "Evaluation of toxicity of pesticides and their biodegradation products using human cells". *Chemosphere*, **46**: 209, 2002.
146. LITTERST, C. L.; LICHTENS.EP; KAJIWARA, K. "Effects of insecticides on growth of hela cells". *J. Agric. Food Chem.*, **17**: 1199, 1969.
147. WANG, C.; CHEN, F.; ZHANG, Q.; FANG, Z. "Chronic toxicity and cytotoxicity of synthetic pyrethroid insecticide cis-bifenthrin". *J. Environ. Sci.*, **21**: 1710, 2009.
148. HERMANSON, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: San Diego, 1996.
149. HAUGLAND, R. P., *The Handbooks - A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 10th ed. ed.; Molecular Probes: Eugene, 2005.
150. LAKOWICZ, J. R., *Topic in fluorescence spectroscopy: probe design and chemical sensing*. Kluwer Academic Publishers: New York, 2002; Vol. 4.
151. ISHIKAWA, H.; SUZUKI, K.; NAKANISHI, M.; INOKAI, A., *Bioimaging for Molecular Dynamics and Cellular Functions*. Kyoritsu-shuppan Co. Ltda. : Tokyo, 1998.
152. E MURPHY, C. C. F.; LIEBERMAN, M. "Cellular Magnesium and Na/Mg Exchange in Heart Cells". *Annu. Rev. Phys.*, **53**: 273, 1991.
153. JUNG, D. W.; CHAPMAN, C. J.; BAYSAL, K.; PFEIFFER, D. R.; BRIERLEY, G. P. "On the use of fluorescent probes to estimate free Mg²⁺ in the matrix of heart mitochondria". *Arch. Biochem. Biophys.*, **332**: 19, 1996.

154. WOLK, J. P. W. V. D.; KLOSE, M.; WIT, J. G. D.; BLAAUWEN, T. D.; FREUDL, R. "Identification of the Magnesium-binding Domain of the High-affinity ATP-binding Site of the *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* SecA Protein ". *J. Biol. Chem.*, **270**: 18975, 1995.
155. RAJU, B.; MURPHY, E.; LEVY, L. A.; HALL, R. D.; LONDON, R. E. "A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium ". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **256**: C540, 1989.
156. MURPHY, E.; FREUDENRICH, C. C.; LEVY, L. A.; LONDON, R. E.; LIEBERMAN, M. "Monitoring cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells by use of the fluorescent indicator Fura-2". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 2981, 1989.
157. TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. "Angiotensin II and Vasopressin Modulate Intracellular Free Magnesium in Vascular Smooth Muscle Cells through Na⁺ dependent Protein Kinase C Pathways ". *J. Biol. Chem.* , **271**: 24353, 1996.
158. BROCARD, J. B.; RAJDEV, S.; REYNOLDS, I. J. "Glutamate-induced increases in intracellular free Mg²⁺ in cultured cortical neurons". *Neuron* **11**: 751, 1993.
159. SUZUKI, Y.; KOMATSU, H.; IKEDA, T.; SAITO, N.; ARAKI, S.; CITTERIO, D.; HISAMOTO, H.; KITAMURA, Y.; KUBOTA, T.; NAKAGAWA, J.; OKA, K.; SUZUKI, K. "Design and synthesis of Mg²⁺-selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg²⁺ measurement in a living cell". *Anal. Chem.*, **74**: 1423, 2002.
160. FRIDOVICH, I. "Overview: biological sources of O₂ - oxygen radicals in biological systems". *Meth. Enzymol.*, **105**: 59, 1984.
161. ORTIZ, M. E.; NÚÑEZ-VERBARA, L. J.; SQUELLA, J. A. "Cyclic voltammetric behaviour of the O₂/O₂⁻ redox couple at a HMDE and its interaction with nisoldipine". *J. Electroanal. Chem.*, **519**: 46, 2002.
162. SUNA, T.; XIEB, W.; XU, P. "Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives". *Carbohydr. Polym.*, **58**: 379, 2004.
163. MOHAMMAD, M.; KHAN, A. Y.; SUBHANI, M. S.; BIBI, N.; AHMED, S.; SALEEMI, S. " Kinetics and electrochemical studies on superoxide". *Research Chem. Intermed.*, **27**: 259, 2001.

164. WEGLICKI, W. B.; PHILLIPS, T. M. "Pathobiology of magnesium deficiency: a cytokine/neurogenic inflammation hypothesis". *Am. J. Physiol.* , **263**: R734, 1992.
165. MASUMOTO, N.; TASAKA, K.; MIZUKI, J.; MIYAKE, A.; TANIZAWA, O. "Regulation of intracellular Mg²⁺ by superoxide in amnion cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**: 906, 1992.
166. MAULIK, D.; ZANELLI, S.; NUMAGAMI, Y.; OHNISHI, S. T.; MISHRA, O. P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. "Oxygen free radical generation during in-utero hypoxia in the fetal guinea pig brain: the effects of maturity and of magnesium sulfate administration". *Brain Res.*, **817**: 117, 1999.
167. FRITZ, K. I.; MISHRA, O. P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. "Mg²⁺-dependent modification of the N-methyl-D-aspartate receptor following graded hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets". *Neuroscience*, **92**: 685, 1999.
168. COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L. V., A. J.; BERGHE, D. V. "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers". *J. Nat. Prod.* , **61**: 71, 1988.
169. ETCHEVERRY, S. B.; FERRER, E. G.; NASO, L.; RIVADENEIRA, J.; SALINAS, V.; WILLIAMS, P. A. M. "Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention". *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**: 435, 2008.
170. HAVSTEEN, B. H. "The biochemistry and medical significance of the flavonoids". *Pharmacol. Ther.* , **96**: 67, 2002
171. LI, T.-R.; YANG, Z.-Y.; WANG, B.-D. "Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin schiff-base and its Cu (II), Ni (I), Zn (II) complexes". *Chem. Pharm. Bull.*, **55**: 26, 2007.

APÊNDICE A

Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase ECh(E.e.): espectros eletrônicos e curvas relacionadas à cinética de formação do íon TNB com absorvância em 412 nm em função do tempo.

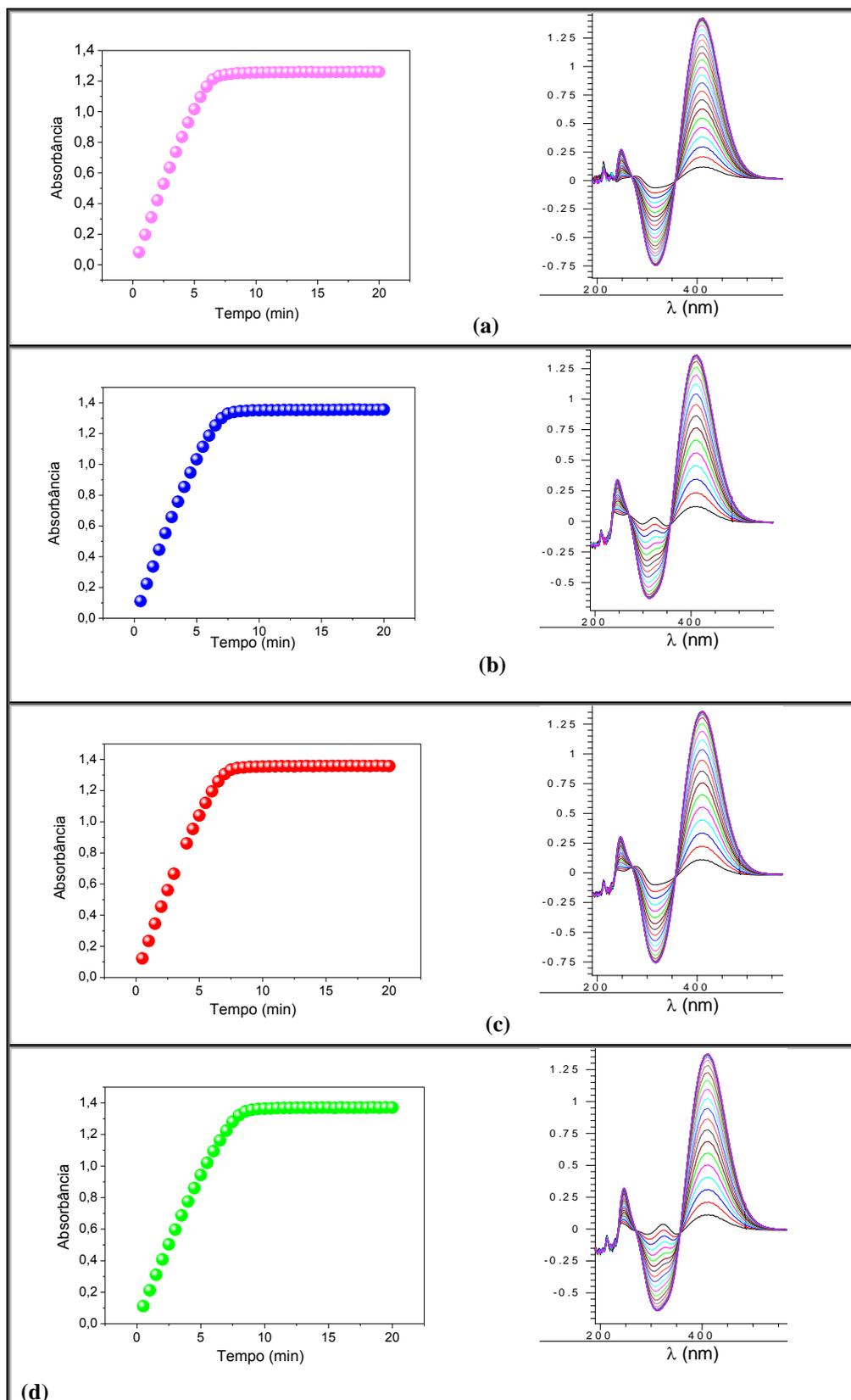


Figura A1: Espectros eletrônicos na região UV-Vis e curva cinética de Absorbância (em 412 nm) vs. Tempo (min) para o acompanhamento reacional da formação do íon TNB, na presença dos compostos: (a) hesperidina, (b) hesperetina, (c) naringina e (d) naringenina, em concentração 100 μ M.

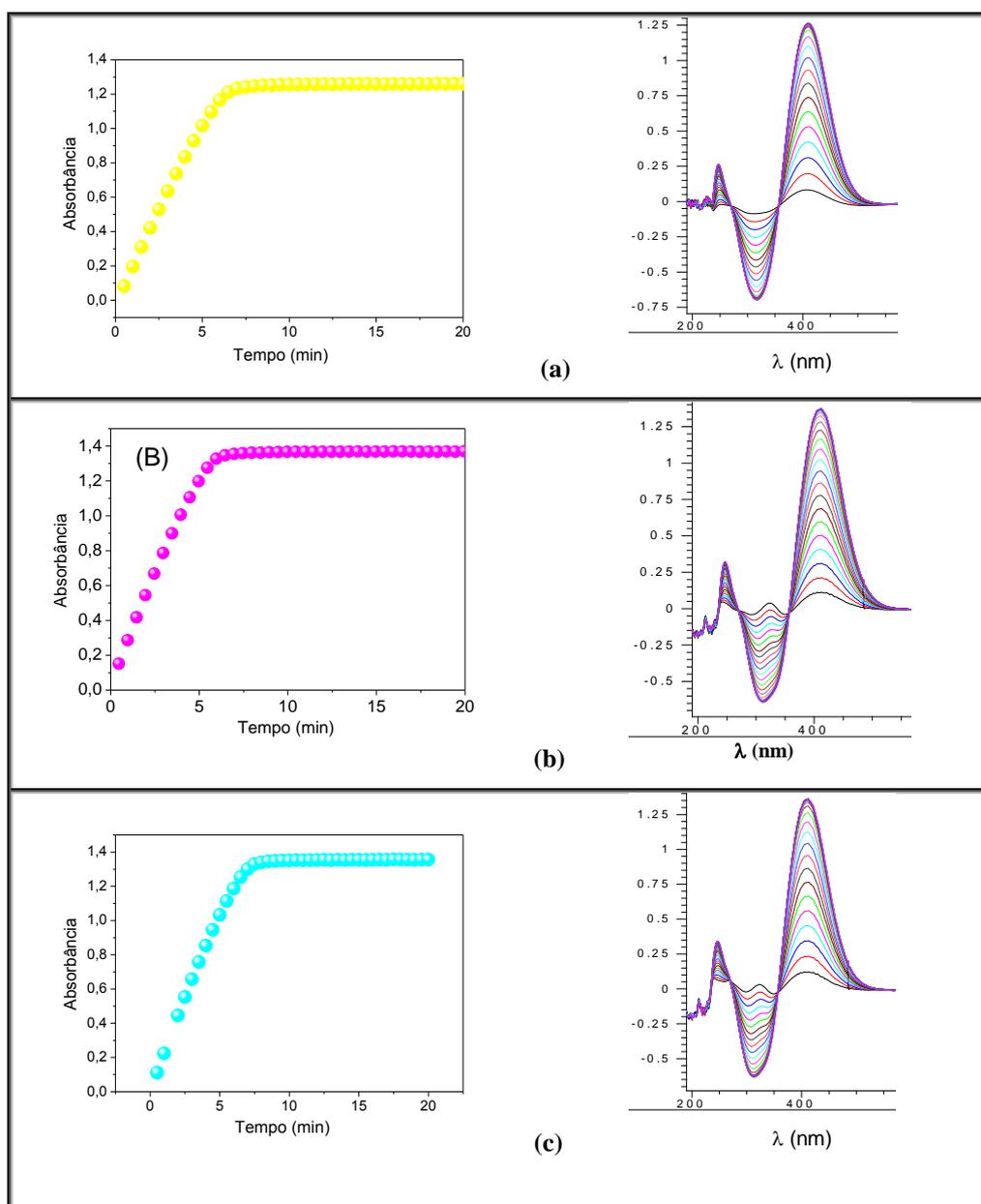


Figura A2: Espectros eletrônicos na região UV-Vis e curva cinética de Absorbância (em 412 nm) vs. Tempo (min) para o acompanhamento reacional da formação do íon TNB, na presença da fenantrolina livre (a), do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(phen)₂] (b) e do complexo **5** (c), em concentração 100 μ M.

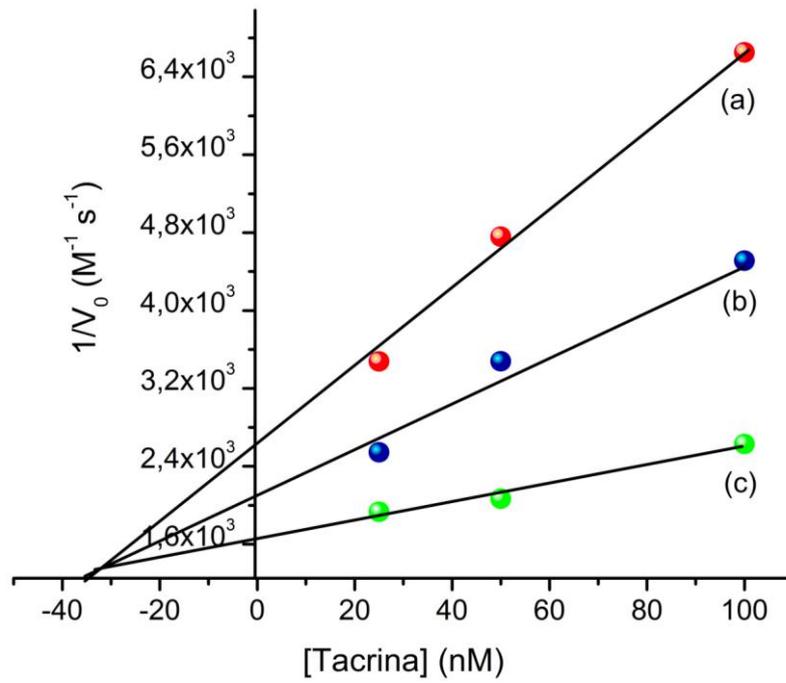


Figura A3: Gráficos de $1/V_0$ vs. concentração da Tacrina, em diferentes concentrações do substrato acetiltiocolina: (a) 50, (b) 75 e (c) 200 μM .