

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Complexos de Metais de Transição para o Desenvolvimento de
Novas Drogas Neuroativas”.

Carolina Riverin Cardoso*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de concentração:
QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Rose Maria Carlos
* bolsista CNPq

São Carlos – SP
2010

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

C268cm

Cardoso, Carolina Riverin.

Complexos de metais de transição para o desenvolvimento de novas drogas neuroativas / Carolina Riverin Cardoso. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 88 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3. Fotoquímica. 4. Luminescência. 5. Fármaco. 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 Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata **Carolina Riverin Cardoso**, realizada em 26 de fevereiro de 2010:*

Rose Maria Carlos

Prof. Dra. Rose Maria Carlos

Ella Tfouni

Prof. Dr. Ella Tfouni

Mauricio da Silva Baptista

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade concedida de crescimento.

Ao grande mestre iluminado Jesus Cristo.

A Universidade Federal de São Carlos que me proporcionou um ambiente fértil aos estudos.

A minha orientadora Prof. Dr. Rose Maria Carlos por todo ensinamento, amizade e dedicação.

Aos meus colegas de laboratório pelo apoio e amizade.

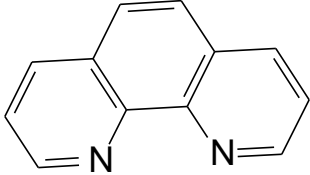
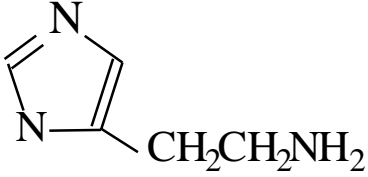
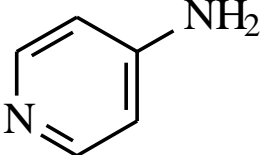
Ao Walter Ernani Ribeiro do Carmo pelo companheirismo e carinho.

Aos meus irmãos Estela Riverin Cardoso, Arthur Cardoso Perez e Diego Cardoso Perez pelo apoio e torcida.

Em especial a minha mãe Rita de Cássia Cardoso por ter sempre me proporcionado condições para o meu desenvolvimento.

Obrigada!

LISTA DE ABRVIATURAS DOS LIGANTES

ABREVIATURA	LIGANTE	ESTRUTURA
phen	1,10-fenantrolina	
him	histamina	
4-apy	4-aminopiridina	

LISTA DE ABRVIATURAS DOS COMPLEXOS

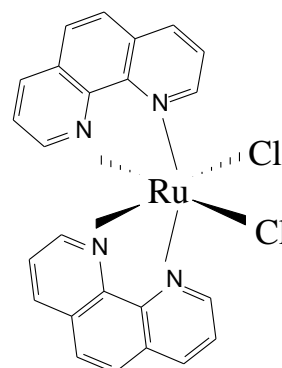
ABREVIATURA

COMPLEXO

ESTRUTURA

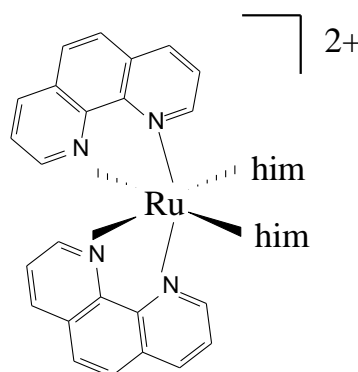
Ru-Cl

cis-[RuCl₂(phen)₂]



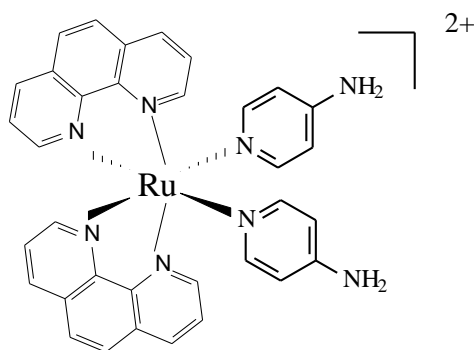
Ru-him

[*cis*-Ru(phen)₂(him)₂]²⁺



Ru-4apy

cis-[Ru(phen)₂(4-apy)₂]²⁺



LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultados de análise elementar para os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os complexos <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂], <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4-apy) ₂](PF ₆) ₂ ·2H ₂ O e <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂](PF ₆) ₂ ·2H ₂ O.....	22
TABELA 2. Deslocamento químico de ¹ H δ _H (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) dos prótons dos isômeros adjacente e remoto do complexo Ru-him em CD ₃ CN.....	24
TABELA 3. Comprimentos de ligação selecionados, ângulos de ligação e ângulos diedrais dos isômeros adjacente e remoto obtidos com a base de cálculo B3LYP/LanL2DZ em CH ₃ CN.	33
TABELA 4. Superfície de contorno dos orbitais moleculares de fronteira do complexo Ru-him para os isômeros A e R.	34
TABELA 5. Deslocamento químico de ¹ H δ _H (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) dos prótons do complexo Ru-4-Apy em CD ₃ CN.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estruturas dos isômeros adjacente (A) e remoto (R) da histamina e os seus isômeros conformacionais remoto1 (R1) e adjacente1 (A1).....	23
FIGURA 2. Estrutura do complexo Ru-him com as respectivas numerações utilizadas na tabela 2 sendo A) Adjacente e B) Remoto.....	24
FIGURA 3. Espectro de RMN ¹ H do complexo Ru-him em CD ₃ CN na região do anel imidazol; inserido a região dos prótons CH ₂ da cadeia CH ₂ CH ₂ NH ₂	25
FIGURA 4. Espectro de RMN ¹ H do complexo Ru-him na região do anel imidazol A) CD ₃ CN, B) CD ₃ OD.....	27
FIGURA 5. Espectro de RMN ¹ H do complexo Ru-him em CD ₃ CN na região do próton mais ácido da fenantrolina.....	27
FIGURA 6. Espectro eletrônico dos complexos <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂] e <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (Him) ₂] ²⁺ na região do visível em CH ₃ CN.	29
FIGURA 7. Espectro de absorção no estado excitado do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ com λ _{exc.} = 355 nm e concentração de 5x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ em CH ₃ CN.	30
FIGURA 8. Estruturas moleculares otimizadas em acetonitrila dos isômeros (A) Adjacente e (B) Remoto.....	32
FIGURA 9. Espectro de absorção teórico e experimental do complexo Ru-him em CH ₃ CN para os isômeros (A) Adjacente e (R) Remoto.	34
FIGURA 10. Voltamograma cíclico dos complexos A) <i>cis</i> -RuCl ₂ (phen) ₂ e B) <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ em diclorometano com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L ⁻¹ de PTBA, v = 100 mV/s.....	37
FIGURA 11. Pulso diferencial do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ em acetonitrila A) oxidação, B) redução com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L ⁻¹ de PTBA, v = 100 mV/s.	38

FIGURA 12. Emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (Him) ₂](PF ₆) ₂ em acetonitrila na concentração de 5x10 ⁻⁵ mol . L ⁻¹ com λ _{exc} = 480nm. Inserido o espectro de excitação com λ _{em} = 650 nm.....	39
FIGURA 13. Dependência da concentração na intensidade de emissão dos complexos [Ru(phen) ₂ (Him) ₂](PF ₆) ₂ em água no intervalo de concentração de 1x10 ⁻⁵ a 1x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ no λ _{exc} = 480nm.....	40
FIGURA 14. Emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂](PF ₆) ₂ em vários solventes na concentração de 5x10 ⁻⁵ mol . L ⁻¹ com λ _{exc} = 480nm.....	40
FIGURA 15. Espectro de absorção e emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ em acetonitrila.	41
FIGURA 16. Espectro de emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ λ _{exc} = 480 nm em solução metanol/etanol (4:1) e a temperatura ambiente.	42
FIGURA 17. Decaimento do tempo de vida de emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ em acetonitrila.....	43
FIGURA 18. Supressão da emissão do BSA (2,27 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) pelo complexo Ru-him nas concentrações 2,5x10 ⁻⁶ a 5,0x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4.....	45
FIGURA 19. Supressão da emissão do BSA (2,27 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) pelo ligante him nas concentrações 2,5x10 ⁻⁶ a 5x10 ⁻⁵ M em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4 a 37 graus.	46
FIGURA 20. Espectros de absorção eletrônica obtidos durante a fotólise do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (Him) ₂] ²⁺ em acetonitrila	48
FIGURA 21. Espectros de absorção eletrônica obtidos durante a fotólise do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ em H ₂ O.	49
FIGURA 22. Fotólise acompanhada por voltametria cíclica do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂] ²⁺ com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L ⁻¹ de PTBA em acetonitrila.....	50

FIGURA 23. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him em CD_3CN antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 30 min A) região dos prótons do anel imidazólico B) região da fenantrolina.....	52
FIGURA 24. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him em CD_3OD antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 40 min na região dos prótons do anel imidazólico.....	52
FIGURA 25. Fotólise contínua do complexo Ru-him com luz de 420 nm em CH_3CN acompanhado por emissão durante 25 minutos.....	54
FIGURA 26. Fotólise contínua do complexo Ru-him com radiação de luz de 420 nm em A) água com 30 minutos de irradiação e em B) tampão tris/HCl na presença de BSA com 40 minutos de tempo de irradiação.	56
FIGURA 27. Estrutura do complexo Ru-4Apy com as respectivas numerações utilizadas na TABELA 6.....	57
FIGURA 28. RMN de ^1H do complexo Ru-4apy em CD_3CN na região do ligante coordenado aminopiridina.	58
FIGURA 29. A) Espectro eletrônico do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$ na região do visível em CH_3CN , B) espectro de absorção no estado excitado do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$ com $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ e concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, C) Voltamograma cíclico do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$ respectivamente com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de PTBA em acetonitrila, $v = 100 \text{ mV/s}$, D) espectro de emissão do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$ $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ respectivamente em solução metanol/etanol (4:1) a 25°C e 77K e no estado sólido.....	60

FIGURA 30. Supressão da emissão do BSA 0,15mg/ml pelo complexo Ru-4-Apy nas concentrações $2,5 \times 10^{-6}$ a 9×10^{-5} M - em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4. Insert o gráfico de Stern-Volmer do BSA-4-Apy em 37 graus.	62
FIGURA 31. Supressão da emissão do BSA 0,15mg/ml pelo ligante 4-Apy nas concentrações $2,5 \times 10^{-6}$ a 9×10^{-5} mol.L ⁻¹ a 37 ⁰ C em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4.	63
FIGURA 32. Espectro de RMN ¹ H do complexo Ru-4apy em CD ₃ CN na região da 4-apy, antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 30 min.	64
FIGURA 33. Espectro de RMN ¹ H do complexo Ru-4apy em CD ₃ CN na região da fenantrolina, antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 30 min. .	65
FIGURA 34. Fotólise do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4-apy) ₂](PF ₆) ₂ acompanhada por A) voltametria cíclica com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L ⁻¹ de PTBA em acetonitrila. B) UV-Vis na região do visível em acetonitrila.	66
FIGURA 35. Viabilidade celular dos macrófagos J774-A1 na presença do complexo Ru-him nas concentrações de: 2,5μM, 5,0μM, 10,0μM e 15,0μM.	67
FIGURA 36. Viabilidade celular dos macrófagos J774-A1 na presença do complexo Ru-him depois da fotólise de 1,0J/cm ²	68

ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Rota sintética para obtenção do complexo <i>cis</i> -RuCl ₂ (phen) ₂	10
ESQUEMA 2. Rota sintética para obtenção do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4-apy) ₂](PF ₆) ₂ ... 11	11
ESQUEMA 3. Rota sintética para obtenção do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (Him) ₂](PF ₆) ₂	12

RESUMO

COMPLEXOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS NEUROATIVAS

As funções biológicas e a utilidade farmacológica desempenhadas pelos ligantes **L** = 4-aminopiridina e histamina no meio fisiológico nos levou ao desenvolvimento de compostos luminescentes e fotoláveis do tipo metal-L capazes de liberarem **L** quando irradiados com luz visível. Nosso interesse neste tipo de compostos estão direcionados tanto para pesquisa fundamental como para a aplicação destes compostos como agentes terapêuticos. Neste trabalho, nós descrevemos a síntese, estudos fotoquímicos e fotofísicos e as propriedades de interação com a proteína do soro albumina bovina (BSA) com complexos do tipo *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺, phen = 1,10-fenantrolina e L = histamina (Ru-him) e 4-apy (Ru-4apy). Os experimentos de RMN de ¹H e os cálculos de DFT confirmam a presença de dois isômeros de ligação (coordenados ao centro metálico pelos nitrogênios da histamina N1 ou N3) para o complexo Ru-him. Em CD₃CN o isômero remoto (**R**), Ru-N1(histamina), esta presente em maior proporção. Entretanto, em solventes próticos como CD₃OD o isômero adjacente (**A**), Ru-N3(histamina), é o mais abundante. A cinética de decaimento de fluorescência para o complexo Ru-him apresenta um decaimento bi-exponencial ($\tau_1 = 184.7$ ns e $\tau_2 = 43.76$ ns) concordante com a observação de dois isômeros.

Os complexos *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ são solúveis em água, apresentam absorção intensa no visível (~ 490 nm, 13000 mol⁻¹ L cm⁻¹) e emissão larga a 640 nm. Estes compostos são estáveis termicamente em solução aquosa e em

solventes orgânicos quando estocados por tempo indeterminado no escuro, mas apresentam reatividade fotoquímica quando irradiados com luz visível (420 nm). A fotólise com luz de 420 nm dos complexos *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ em CH₃CN e CH₃OH resultaram na liberação do ligante **L** e na formação do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺. A liberação fotoquímica do ligante **L** é observada também em água pura e em solução tampão (Tris/HCl, pH 7,4) na ausência e presença de BSA (1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹). Os complexos *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ suprimem a fluorescência do BSA pela combinação dos processos de supressão estático e dinâmico, mas nenhuma alteração no espectro de emissão do BSA foi observado quando histamina livre (2,5 x 10⁻⁶ to 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) ou 4-aminopiridina (2,5 x 10⁻⁶ to 9,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) livre foram usadas como supressores. Isto sugere que o fragmento {Ru(phen)₂}²⁺ apresenta características estruturais que são essenciais para a interação L - BSA. Cabe salientar que a presença do BSA não impede a liberação fotoquímica do ligante **L** no complexo *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺.

Os resultados obtidos nesta dissertação são particularmente interessantes para o desenvolvimento de metalodrogas fundamentadas em processos fotoquímicos e fotofísicos.

ABSTRACT

COMPLEXES OF TRANSITION METALS ON DEVELOPMENT OF NEW DRUGS NEUROACTIVE

The biological role and pharmacological utility of histamine and 4-aminopyridine in the physiological medium has led us to the development of luminescent and photolabile metal-histamine and metal-4-aminopyridine donor that release histamine when exposed to visible light aim both research tools and therapeutic agents. In this work, we report on the synthesis, photochemical and photophysical studies and bovine serum albumin (BSA) binding properties of *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺, L = histamine (Ru-him) and 4-apy (Ru-4apy). The ¹H-NMR experiments and DFT calculations confirm the presence of two linkage isomers (binding through N1 or N3 of histamine) of Ru-him. In CD₃CN the Ru-N1(histamine), **R** isomer, being favored whereas in protic solvents the Ru-N3(histamine), **A** isomer, is the major isomer. The presence of two isomeric populations is a possible explanation for the biexponential fluorescence decay of Ru-Him ($\tau_1 = 184.7$ ns and $\tau_2 = 43.76$ ns). The *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ are water soluble and highly colored with strong absorptions (~ 490 nm, 13000 mol⁻¹ L cm⁻¹) and a broad emission at 640 nm. They are thermally stable over the course of many hours in non-aqueous and aqueous solution but they are photochemically reactive. Photolysis in the visible absorption band of *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ in the CH₃CN and CH₃OH solution causes an efficient photoreaction, converting them into *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺. L photorelease is also observed in pure water and in an aqueous buffer solution (Tris/HCl, pH

7.4) in the presence of BSA ($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). The *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ complex quenches the fluorescence of BSA by a combination of static and dynamic quenching, but no changes in the emission spectrum of BSA were observed when free histamine (2.5×10^{-6} to $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) or free 4-aminopyridine (2.5×10^{-6} to $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) were used as a quencher. This suggests that the [Ru(phen)₂]²⁺ moiety presents structural features which are essential to L - BSA interaction. It is of relevance to note that the presence of BSA does not preclude the photorelease of L in complex *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺.

Overall, these results are of particular interest to the design of intelligent metallodrugs based on photochemical and photophysical processes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DOENÇA DE ALZHEIMER	1
1.2. HISTAMINA	2
1.3. AMINOPIRIDINAS	3
1.4. COMPLEXOS DE RUTÊNIO	4
1.5. SUPRESSÃO	5
1.6. PROCESSOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS	7
2. OBJETIVOS	8
2.1. OBJETIVO GERAL	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3. PARTE EXPERIMENTAL	9
3.1. SÍNTESE.....	9
3.1.1. SÍNTESE DO COMPLEXO <i>cis</i> -RuCl ₂ (phen) ₂	9
3.1.2. SÍNTESE DO COMPLEXO <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4-apy) ₂](PF ₆) ₂	10
3.1.3. SÍNTESE DO COMPLEXO <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂](PF ₆) ₂	11
3.2 INSTRUMENTAÇÃO	12
3.2.1. ANÁLISE ELEMENTAR	12
3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO UV-vis.....	12
3.2.3. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	13
3.2.4. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	13
3.2.5. FOTÓLISE CONTÍNUA.....	13
3.2.6. LUMINESCÊNCIA.....	14
3.2.7. ACTINOMETRIA	15

3.2.8. ABSORÇÃO NO ESTADO EXCITADO.....	18
3.2.9. TEMPO DE VIDA DE EMISSÃO.....	18
3.2.10. CÁLCULOS TEÓRICOS.....	19
3.2.11. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS <i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂], <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (Apy) ₂](PF ₆) ₂ E <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂](PF ₆) ₂	21
4.2. CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS PARA O COMPLEXO <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂](PF ₆) ₂	22
4.2.1 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹ H.....	22
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE UV-vis.....	28
4.2.3. ABSORÇÃO NO ESTADO EXCITADO.....	29
4.2.4. CALCULO TEÓRICO.....	31
4.2.5. VOLTAMETRIA CÍCLICA E PULSO DIFERENCIAL.....	36
4.2.6. FLUORESCÊNCIA.....	38
4.2.7. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA NO ESTADO EXCITADO.....	42
4.2.8. ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO COMPLEXO Ru-him COM SORO ALBUMINA BOVINA.....	44
4.2.9. ESTUDO DE FOTÓLISE CONTÍNUA.....	47
4.2.11. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA UV-vis.....	47
4.2.12. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS POR VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	49
4.2.13. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS RMN 1H.....	50
4.2.14. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS LUMINESCÊNCIA EM ACETONITRILA.....	53

4.2.15. EXPERIMENTOS FOTOQUÍMICOS EM SOLUÇÃO AQUOSA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE BSA.....	54
4.3. CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS PARA O COMPLEXO <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4-apy) ₂] ²⁺	56
4.3.1. CARACTERIZAÇÃO.....	56
4.3.2. ESTUDOS DE SUPRESSÃO.....	61
4.3.3. ESTUDOS FOTOQUÍMICOS.....	63
4.4. EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE CITOTOXICIDADE.....	67
5. CONCLUSÃO.....	69
6. REFERÊNCIAS.....	70
7. ANEXOS.....	78
ANEXO A1 - ALGUNS ASPECTOS SOBRE AS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS.....	78
ANEXO A2 – UMA BREVE EXPLICAÇÃO SOBRE OS PROCESSOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS.....	82
ANEXO A3 - TABELAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica que afeta o cérebro e resulta na progressiva perda de memória e outras funções cognitivas. O indivíduo torna-se progressivamente incapaz de desempenhar atividades da vida diária e de cuidar de si mesmo¹.

O número de portadores de DA atualmente são de 18 milhões e a estimativa é de que em 2025 serão mais de 34 milhões. Este grande número de portadores é devido ao aumento da expectativa de vida da população².

Ao longo dos últimos 30 anos, diferentes teorias têm sido defendidas como principais causas de DA. Em primeiro lugar, seguindo a hipótese colinérgica, a inibição da acetilcolinesterase (AChE) foi validado como uma estratégia terapêutica, e uma nova geração de princípios ativos inibidores da acetilcolinesterase (I-ChE) foram registrados para o tratamento da doença de leve a moderada³. Estudos posteriores⁴ levaram ao desenvolvimento de drogas antagonistas dos receptores ácido (2(R)-2-(amino-metil) succinico (NMDA), que conferem uma ação neuroprotetora contra a ativação excitatória de receptores de glutamato. A introdução da memantina em 2003 forneceu aos pacientes de DA uma nova opção terapêutica para os estágios moderada e grave⁴.

Várias outras classes de drogas estão em desenvolvimento como no caso das aminopiridinas que tem sido de grande interesse devido ao seu potencial terapêutico para o controle de doenças relacionadas à transmissão neurológica⁵⁻¹². A 4-aminopiridina já está em fase clínica III¹³. Estudo feito com o neurotransmissor histamina tem mostrado seu importante papel nas funções fundamentais incluindo a atenção, aprendizagem e

memória¹⁴. Vários estudos vêm sendo feitos com o intuito de verificar se o sistema central histaminérgico é afetado em pacientes com DA¹⁵.

1.2. HISTAMINA

O Sistema histaminérgico está localizado no hipotálamo posterior, e projetam suas fibras para quase todas as regiões do cérebro humano¹⁶. A histamina exerce seus efeitos através dos seus 4 receptores (H1R, H2R, H3R e H4R) em várias células de vários tecidos. Ela provoca a contração das células do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e secreção de muco, taquicardia, alterações da pressão sanguínea, arritmias e estimula a secreção de ácido gástrico. Além disso, a histamina é conhecida por controlar a vigília, controle do apetite, aprendizagem, memória e emoção¹⁷.

Estudos mostraram que o sistema histaminérgico está envolvido com DA sugerindo uma interrupção predominante da neurotransmissão histaminérgica nos processos neurodegenerativos em pacientes com DA. Estes estudos também sugerem que a ativação de neurônios histaminérgicos podem ser potenciais candidatos a intervenção terapêutica na disfunção cognitiva¹⁸.

Infelizmente, atualmente nenhum medicamento eficaz que ativa a neurotransmissão histaminérgica está disponível e um dos fatores limitantes ao uso da histamina é a intolerância em determinadas concentrações no meio fisiológico¹⁹. Neste contexto, o complexo metal-histamina pode ser visto como agentes de entrega eficaz de histamina e, em particular, uma promessa para a entrega fotoquímica de histamina para o meio fisiológico.

1.3. AMINOPIRIDINAS

A molécula 4-aminopiridina (4Apy) desempenha um papel importante no sistema biológico, atuando como bloqueador de canais de potássio permitindo que a condução nos nervos seja restaurada²⁰⁻²². Outra consequência é o aumento do influxo de íons Ca^{2+} nos terminais pré-sináptica resultando no aumento da transmissão neuronal ou neuromuscular nos neurônios normais²¹. Estas propriedades farmacológicas tem estimulado o interesse na química e bioquímica da 4Apy, no seu potencial terapêutico para o controle de doenças relacionadas a transmissão neurológica, nos casos de lesões graves na medula espinhal e nas estratégias para entrega de 4Apy a alvos biológicos¹⁵⁻¹². Vários trabalhos na literatura demonstram os resultados de uma série de testes clínicos em pacientes com esclerose múltipla, epilepsia, botulismo, lesões graves na medula espinhal e Mal de Alzheimer²³⁻²⁷. Melhoras comportamentais atribuídas ao tratamento com a 4Apy incluem: controle motor e sensorial voluntário, perda da marcha, continência, controle respiratório com decréscimos da espasticidade e dor idiopática²³.

A maioria das aplicações clínicas da 4Apy utilizam liberação intravenosa ou oral em cápsulas de gelatina contendo a Apy pura ou triturada com lactose ou celulose microcristalina. Todos estes métodos levaram ao deslocamento imediato da droga com picos de tempo/concentração da droga no soro fisiológico muito curtos^{23,24}.

Desta forma, apesar das melhoras comportamentais expressivas detectadas em vários pacientes, em muitos casos a dose máxima permitida não tóxica é insuficiente para produzir o máximo recobrimento benéfico²³.

Este inconveniente faz com que sua administração seja efetuada sob rigoroso controle clínico²³.

Uma das estratégias envolve o “encapsulamento” da Apy em uma forma inativa e a liberação posterior da droga no sítio alvo sob estímulo. Um dos métodos possíveis envolve compostos de coordenação coordenados a Apy (forma inativa da droga) e que atuem como sistemas de entrega da 4Apy respondendo a estímulos luminosos com a liberação da droga²⁸.

1.4. COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Cabe salientar que vários trabalhos na literatura descrevem as propriedades farmacológicas de complexos de Ru(II) e a baixa toxicidade dos mesmos em meio biológico²⁸⁻³⁰. Os complexos de metais de transição, em particular, preenchem uma série de requisitos específicos para atuarem em processos fotoquímicos e fotofísicos com aplicação prática e na modulação de processos biológicos.

Uma das etapas essenciais relacionada a estas propriedades esta na interação dos complexos de Ru(II) com as proteínas do soro, particularmente a albumina (proteína em maior porcentagem no soro fisiológico na concentrações de 35-50 mg.ml⁻¹). Uma das funções da albumina é fazer o transporte da droga para o interior da célula³¹⁻³⁴. Desta maneira, avaliar as interações detalhadas da droga com esta proteína são etapas essenciais no desenvolvimento de novas drogas e na elucidação dos mecanismos de ação de drogas comerciais conhecidas. Isto porque a ligação destas proteínas as drogas podem resultar na perda das propriedades biológicas dos complexos de partida, da droga livre ou dos produtos de Ru(II) produzidos durante a liberação fotoquímica da droga. Por outro lado, esta interação pode resultar no aumento da atividade biológica e no transporte da droga para o interior da célula e na diminuição da toxicidade no meio em que a droga se encontra.

Considerando-se que o sítio alvo de interação da Apy e histamina é o cérebro e que a formulação oral é geralmente a preferida, os compostos de Ru(II) propostos neste trabalho devem necessariamente ultrapassar duas barreiras biológicas (membranas do intestino e barreira sanguínea do cérebro) para alcançar o sistema nervoso central. Neste sentido, é fundamental avaliar a estabilidade, possível reatividade, propriedades físico-químicas e fotoquímicas dos compostos propostos frente à proteína do soro fisiológico albumina.

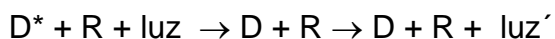
1.5. SUPRESSÃO

A Albumina bovina está relacionada ao transporte de uma variedade de compostos, por exemplo, ácidos graxos, bilirrubina, íons metálicos, hormônios, vitaminas e fármacos incluindo metalodrogas³⁵. O soro albumina realiza uma série de importantes funções fisiologicamente de controle osmótico da pressão arterial, transporte, metabolismo e distribuição de vários compostos (inclusive medicamentos), a desativação radical, e entrega de aminoácidos após hidrólise para a síntese de proteínas³⁵.

A interação dos complexos de Ru (II) com a albumina do soro pode ser avaliada através do método de fluorescência. Esta técnica é bastante utilizada para medir a força da interação droga – proteína e identificar o número de sítios de ligação. A albumina do soro bovina (BSA) tem sido muito utilizada nos estudos de fluorescência devido à sua homologia estrutural com albumina humana (HSA). A molécula de BSA é composta de três domínios homólogos (I, II, III), cada um dos domínios é constituído por dois subdomínios (IA, IB, etc), e a estrutura é predominantemente R-helicoidal (67%) e a sequência de aminoácidos contém 17 pontes de dissulfeto e um grupo tiol (cisteína-34) e dois resíduos de triptofano Trp-134 e Trp-212 sendo que o Trp-212 está localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica e Trp-134 está localizada na superfície da proteína³⁶⁻³⁷.

A fluorescência dos dois triptofanos podem ser suprimidas pelas interações intermoleculares com o complexo. Estas interações podem resultar em uma supressão dinâmica, resultantes de encontros colisionais com transferência de energia entre BSA-complexo, ou estática, resultante da formação de um complexo no estado excitado entre o BSA-complexo³⁸.

Estes processos bimoleculares podem ser definidos pelas seguintes equações:



A supressão da fluorescência pode ser descrita pela equação de Stern-Volmer (equação 1)

$$I_0/I = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [R] \quad (1)$$

I_0 = Intensidade da fluorescência sem o supressor

I = Intensidade da fluorescência com o supressor

K_q = constante de supressão bimolecular

K_{SV} = constante de Stern-Volmer

τ_0 = tempo de vida de emissão do BSA

$[Q]$ = concentração do supressor

O gráfico de Stern-Volmer (I_0/I vs $[Q]$), é representado por uma reta que passa pelo um no eixo y onde o coeficiente angular da reta é a constante de Stern-Volmer (K_{SV}). Neste caso dizemos que temos uma supressão dinâmica. Quando o gráfico de Stern-Volmer resulta em uma parábola ao invés de uma reta, é indicativo da presença dos dois processos de supressão dinâmica e estática. Nestas condições utiliza-se a equação (2):

$$I_0/I = (1 + K_D [R])(1 + K_{SV} [R]) \quad (2)$$

Quando a macromolécula BSA interage com o complexo, a conformação da proteína pode sofrer alteração devido às forças intermoleculares envolvidas entre a proteína e o complexo. Utilizando a técnica de fluorescência pode-se tirar várias informações como: mecanismo de ligação, tipo de ligação, número de sítios ativos, constante de ligação, distâncias intermoleculares, etc³⁹.

1.6. PROCESSOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS

Uma etapa importante do nosso trabalho é o estudo das propriedades fotoquímicas e fotofísicas do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(fármaco)₂]²⁺. Estes estudos são fundamentais para avaliar a liberação do fármaco pela irradiação com luz visível. A presença de luminescência também é importante uma vez que esta permite o mapeamento do fármaco no meio fisiológico. Também nos casos onde a liberação fotoquímica do fármaco resulta na supressão da luminescência do complexo permitem avaliar a entrega seletiva e controlada do fármaco – Alguns aspectos sobre a teoria das transições eletrônicas e processos fotoquímicos e fotofísicos estão no anexo A1 e A2.

Neste contexto, avaliar a entrega dos fármacos no meio fisiológico utilizando as técnicas fotoquímica e fotofísica é muito importante. A técnica de fotoquímica permite que

tenhamos alta seletividade na entrega do fármaco uma vez que permite a irradiação do complexo apenas no órgão de interesse, controle da quantidade de droga liberada regulando a intensidade e tempo de irradiação e menor toxicidade uma vez que o fármaco só é liberado do complexo sob irradiação e no local de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um sistema de entrega de fármacos mais eficiente, mais efetivo e menos tóxico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Complexar - Coordenar os ligantes (L) = 4-aminopiridina (4-apy) e histamina (Him) ao complexo polipiridínico Ru(II) formando complexos do tipo : *cis*- $[(Ru^{II}(phen)_2L_2](PF_6)_2$.

Transportar - Avaliar as interações intermoleculares entre o complexo *cis*- $[(Ru^{II}(phen)_2L_2](PF_6)_2$ e a proteína do soro albumina bovina (BSA).

Entregar - Estudar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do complexo *cis*- $[(Ru^{II}(phen)_2L_2](PF_6)_2$ visando a liberação do fármaco e supressão da luminescência do mesmo.

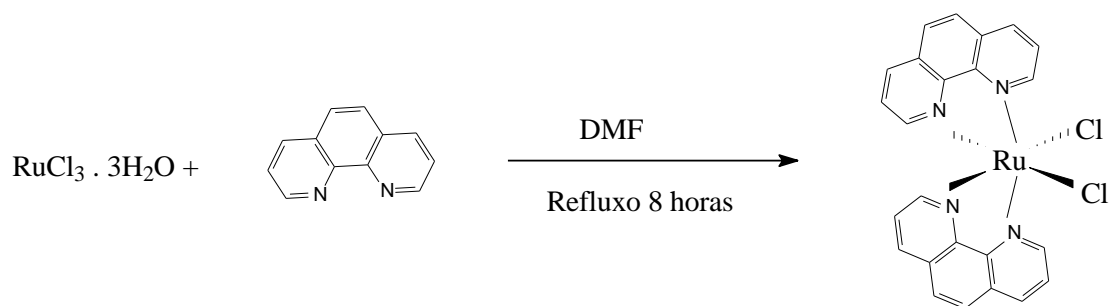
3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. SÍNTESE

Todas as sínteses foram realizadas sob atmosfera inerte de argônio e na ausência de luz, por causa da alta sensibilidade fotoquímica destes complexos. Os reagentes $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e cloreto de lítio (LiCl) e os ligantes 1,10-fenantrolina (phen), 4-aminopiridina (4-Apy) e histamina (Him) de procedência Aldrich foram, sem purificação prévia, usados para sintetizar o precursor $\text{cis-RuCl}_2(\text{phen})_2$ e os complexos $\text{cis}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Apy})_2](\text{PF}_6)_2$ e $\text{cis}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Him})_2](\text{PF}_6)_2$. Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), de procedência Aldrich, foi usado como eletrólito suporte para os procedimentos de análise eletroquímica. Todos os solventes utilizados (diclorometano, acetonitrila, metanol, etc) são de procedência HPLC.

3.1.1. SÍNTESE DO COMPLEXO $\text{cis-RuCl}_2(\text{phen})_2$

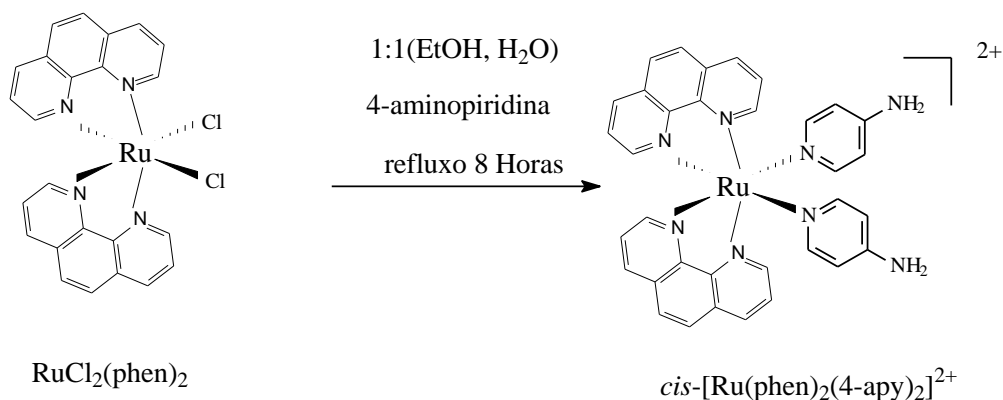
O complexo $\text{cis-RuCl}_2(\text{phen})_2$ foi preparado a partir de 1,15 mmol de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 3,8 mmol de fenantrolina e 7,7 mmol de cloreto de lítio dissolvidos em 15 mL de dimetilformamida previamente desaerado sob agitação contínua e aquecimento. O sistema permaneceu sob refluxo por oito horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência total de luz. Após este período deixou resfriar o sistema e adicionou 150 ml de acetona previamente destilada e resfriada em banho de gelo. A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo. O precipitado foi filtrado e seco a vácuo, obtendo-se um rendimento de 56%.



ESQUEMA 1. Rota sintética para obtenção do complexo *cis*-RuCl₂(phen)₂.

3.1.2. SÍNTESE DO COMPLEXO *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂

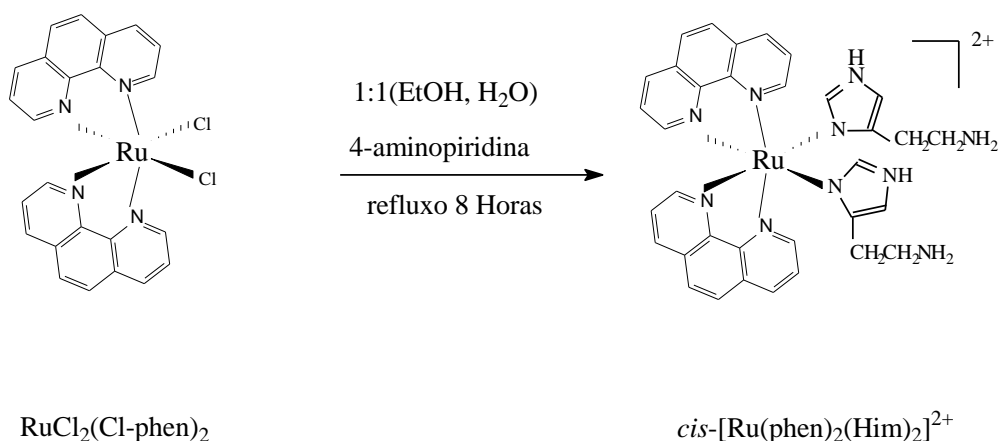
O complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ foi preparado a partir de 0,34 mmol do precursor e *cis*-RuCl₂(phen)₂ dissolvido em 5 ml de etanol e 0,68 mmol de 4-aminopiridina dissolvidos em 5 ml de água previamente desaerados, sob agitação contínua e aquecimento. O sistema permaneceu refluxando por oito horas sob atmosfera de argônio, aquecimento, agitação e ausência de luz. Após este período deixou resfriar o sistema e adicionou 0,68 mmol do contra íon hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆). A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo. O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água, etanol e éter, respectivamente, todos previamente resfriados num banho de gelo. O complexo foi seco a vácuo obtendo-se um rendimento de 50,61%.



ESQUEMA 2. Rota sintética para obtenção do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$.

3.1.3. SÍNTESE DO COMPLEXO $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{him})_2](\text{PF}_6)_2$.

O complexos $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{him})_2](\text{PF}_6)_2$ foi preparado a partir de 0,34 mmol do precursor $\text{cis-RuCl}_2(\text{phen})_2$ dissolvido em 5 ml de etanol e 0,68 mmol de histamina dissolvido em 5 ml de água previamente desaerados, sob agitação contínua e aquecimento. O sistema permaneceu refluxando por oito horas sob atmosfera de argônio, aquecimento, agitação e ausência de luz. Após este período deixou resfriar o sistema e adicionou 0,68 mmol do contra íon hexafluorfosfato de amônio (NH_4PF_6). A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo. O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água, etanol e éter, respectivamente, todos previamente resfriados num banho de gelo. O complexo foi seco a vácuo. O rendimento da síntese foi de 71,43%.



ESQUEMA 3. Rota sintética para obtenção do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(Him)₂](PF₆)₂.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1. ANÁLISE ELEMENTAR

Para a determinação da porcentagem (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio foi utilizado um analisador de C, H e N modelo EA 1108 da FISONs, na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO UV-vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro de feixe duplo UV-Vis-NIR Varian-Cary 500. Utilizou-se celas de quartzo de 10 mm e 4 mL de capacidade.

3.2.3. VOLTAMETRIA CÍCLICA

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se o Potenciostato/galvonostato modelo PGSTAT302N (GPES&FRA), software Autolab, sendo a cela eletroquímica de vidro, com capacidade para 10 mL e três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl em solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) no solvente adequado mantido no interior de um capilar de Luggin-Haber; e os eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de tarugos de platina (Pt) de 1 mm e 4 mm. Usou-se como eletrólito de suporte PTBA dissolvido em diclorometano e acetonitrila, na concentração de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. As medidas também foram feitas em solução aquosa onde o eletrólito suporte era KCl na concentração de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.2.4. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de H^1 foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz e/ou ARX 200 MHz pertencentes ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.2.5. FOTÓLISE CONTÍNUA

Estes experimentos foram realizados utilizando um reator fotoquímico circular idealizado e construído em nosso laboratório consistindo de quatro pares de lâmpadas (independentes duas a duas) de comprimento de onda específico (420 nm) utilizando lâmpadas Rayonet (RMR 4200 A).

O rendimento quântico fotoquímico⁴⁰ foi calculado a partir dos espectros de RMN ¹H através das equações 3 e 4. Como trata-se de uma absorção maior do que 2, a fração de luz absorvida no comprimento de onda de irradiação pelo complexo no tempo foi desconsiderada.

$$n_x = n_0 \frac{S_p}{S_r + S_p} \quad (3)$$

$$\Phi_x = \frac{n_x}{I_0 \cdot t_x} \quad (4)$$

S_p = área integração sinal produto.

S_r = área integração sinal reagente.

n_0 = número de mols no início

n_x = número de mol após fotólise

Φ_x = rendimento quântico

I_0 = intensidade da luz incidente

t_x = tempo de irradiação.

3.2.6. LUMINESCÊNCIA

Os espectros de emissão e de excitação a vários comprimentos de onda foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Aminco-Bowman modelo J4-8960A (lâmpada

de alta pressão de xenônio e um fotomultiplicador do tipo IP 28) pertencente a central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI, do Instituto de Química de São Carlos – USP.

O rendimento quântico foi calculado⁴¹ a partir da equação 5 usando como padrão o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em acetonitrila ($\phi = 0.062$). A constante radiativa (k_r) e não radiativa (k_{nr}) foram calculadas³⁸ usando a equação 6 e 7:

$$\phi_{em} = \phi_{pad} \cdot (A_{pad} \cdot I_0) / (A_0 \cdot I_{pad}) \quad (5)$$

$$k_r = \phi_{em} / \tau_m \quad (6)$$

$$k_{nr} = (1 - \phi_{em}) / \tau_m \quad (7)$$

ϕ_{em} = rendimento quântico de emissão do complexo estudado.

ϕ_{pad} = rendimento quântico de emissão do padrão.

I_0 = intensidade de emissão do complexo estudado.

I_0 = intensidade de emissão do padrão.

K_r = constante radiativa.

K_{nr} = constante não radiativa.

τ_m = tempo de vida de emissão.

3.2.7. ACTINOMETRIA

A intensidade da luz incidente nos estudos fotoquímicos foi medida através da actinometria. O actinômetro (tris (oxalato) ferrato (III) de potássio tri-hidratado) $[\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ foi preparado de acordo com Calvert and Pitts⁴²⁻⁴³.

A intensidade de luz incidente foi calculada pela equação 8:

$$I_i = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot \Delta A \cdot 6,02 \times 10^{23}}{V_2 \cdot \phi_{\text{NCS}^-} \cdot l \cdot t \cdot \epsilon_{\text{Fe(NCS)}_3}} \quad (8)$$

onde

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

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

V_3 = volume final, ou seja, volume do balão volumétrico no qual V_2 foi diluído;

ΔA = diferença da absorbância a 510 nm da solução irradiada e da absorbância a 510 nm do branco;

ϕ_{Fe} = rendimento quântico de formação do íon Fe^{2+} no comprimento de onda da luz irradiada;

f = fração da luz absorvida pela solução irradiada no comprimento de onda de irradiação;

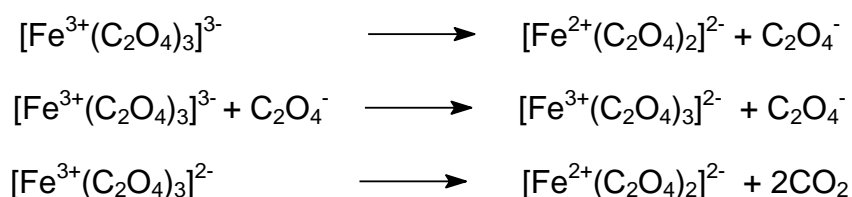
t = tempo de irradiação em segundos;

l – caminho ótico da cela fotolisada (cm);

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

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

Quando a solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ é fotolisada, os íons Fe^{3+} são reduzidos a Fe^{2+} , sofrendo a seguinte reação:



O Produto $[\text{Fe}^{2+}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]^{2-}$ não absorve a luz incidente e os íons Fe^{2+} são determinados pela absorbância a 510 nm, correspondente ao complexo produzido pela adição de 1,10-fenantrolina. Os íons Fe^{3+} também formam um complexo com a 1,10-fenantrolina, mas este não absorve em 510 nm.

O rendimento quântico da reação fotoquímica foi determinado pela equação 9 e 10:

$$\phi = \frac{\Delta A_{\text{medido}} \cdot V \cdot N}{I_i \cdot \Delta \epsilon \cdot l \cdot f \cdot t} \quad (9)$$

onde

ΔA_{medido} = variação na absorbância do complexo no comprimento de onda medida nos tempos $t = t_n$ e $t = t_0$;

V = volume da cela fotolisada (litros);

N = número de Avogadro;

l = caminho ótico da cela fotolisada (cm);

$\Delta \epsilon$ = diferença no coeficiente de extinção molar entre o complexo inicial e o produto de fotólise no comprimento de onda medido ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$);

I_i = intensidade de luz incidente no comprimento de onda de irradiação (Einstein s^{-1});

f = fração de luz absorvida no comprimento de onda de irradiação pelo complexo no tempo $t = t_n$ e $t = t_0$:

$$f = 1 - 10^{-\frac{-(A_{t=0} + A_{t=n})}{2}} \quad (10)$$

ϕ = rendimento quântico total da reação de fotoquímica em mol Einstein^{-1} .

3.2.8. ABSORÇÃO NO ESTADO EXCITADO

Os estudos de absorção de transiente foram realizados em Ribeirão Preto no laboratório do professor Antônio Cláudio Tedesco da FFCLRP-USP.

As medidas foram efetuadas utilizando-se, para a excitação, pulsos do terceiro harmônico (355 nm) de um sistema laser ND-YAG (Continuum, Santa Clara, CA). Para cada um dos comprimentos de onda escolhidos, os transientes de absorção foram obtidos a partir de uma média de 8 pulsos através de uma fenda de 6 mm de diâmetro, e a razão de repetição foi de 10 Hz. A energia média do pulso foi da ordem de 15 mJ por pulsos medidos com um “powermeter” (Field Master da Coherent, usando-se uma cabeça de detecção L-30V). Os decaimentos cinéticos foram medidos com um comprimento de onda simples usando-se um monocromador (M300 - Bentham) e uma fotomultiplicadora (Hamamatsu, modelo R928P). A média dos decaimentos dos transientes foi feita utilizando-se um osciloscópio digital (Tetronix TDS 340A). O tratamento dos dados para a obtenção dos tempos de vida foi efetuado a partir dos programas de análise cinética que acompanham o equipamento. O ajuste por uma função monoexponencial foi adequado para reproduzir o decaimento de todos os comprimentos de onda selecionados (entre 250 e 700 nm).

3.2.9. TEMPO DE VIDA DE EMISSÃO

As medidas de tempo de vida de emissão foram realizadas em Ribeirão Preto no laboratório do professor Amando Siuiti Ito da FFCLRP-USP.

Os tempos de vida de emissão foram determinados por um contador de fótons único correlacionou-(CSP) foi usado para obter as curvas de decaimento de fluorescência de emissão. A fonte de excitação foi um Tsunami 3950 Spectra Physics-laser titânio safira,

bombeado por um estado sólido Millennia X laser Spectra Physics. A taxa de repetição dos pulsos de 5 ps foi ajustado para 800 KHz usando o selecionador de pulso Spectra Physics 3980. O laser foi ajustado para dar saída a 945 nm e um cristal LBO gerador de segundo harmônico (GWN-23PL Spectra Physics) deu a 472 pulsos nm excitação que foram direcionados para um espectrômetro FL900 Edimburgo, onde a configuração do formato de L-permitiu a detecção da emissão no ângulo direito da excitação. A emissão de comprimento de onda foi selecionado por um monocromador e os fótons emitidos foram detectados por uma chapa de refrigeração R3809U microcanais fotomultiplicador Hamamatsu. A FWHM da função de resposta do instrumento era tipicamente 2,20 ns, e as medições foram feitas usando resolução de tempo de 0,245 ns por canal. Um software fornecido pela Edinburgh Instruments foi utilizado para analisar as curvas de deterioração, e da adequação do equipamento multi-exponencial foi julgado pela inspeção dos lotes de resíduos ponderados e de parâmetros estatísticos, tais como redução do qui-quadrado.

3.2.10. CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos apresentados neste documento foram realizados com o Gaussian 03 package⁴⁴. As geometrias moleculares foram obtidas a partir no nível UHF/3-21G da teoria. As otimizações da geometria molecular foram realizadas utilizando o Kohn-Sham teoria de densidade funcional (DFT)⁴⁵ com o Becke de três parâmetros de função híbrido conhecido como B3LYP10⁴⁶ e com um conjunto de bases pseudopotencial conhecido como LanL2DZ⁴⁷⁻⁵⁰. Nenhuma condição de simetria foi imposta. As frequências vibracionais foram calculadas a partir de análise da segunda derivada para obter o valor mínimo na superfície de energia potencial. As energias de interação metal-ligante e a

composição dos orbitais, foram avaliadas usando os fragmentos de h_m , $phen$ e o íon metálico de $Ru(II)$.

Estes cálculos foram realizados pela aluna de mestrado Mariana Romano Camilo do nosso grupo de pesquisa nos laboratórios do prof A. B. P. Lever (York University, Toronto-CA). Nossa responsabilidade descrita nesta dissertação está na interpretação dos dados obtidos.

3.2.11. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Os estudos envolvendo cultura de células serão realizados com a linhagem neoplásica de macrófagos J774-A (American Type Culture Collection, ATCC). Este tipo de células plasmáticas linfóticas serão obtidas originalmente de ratos DBA/2. Os estoques primários cultivados em laboratório, a partir das matrizes animais, serão analisados e comercializados pela ATCC.

Para o cultivo da linhagem J774-A será utilizado o meio Dupleco Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM-Gibco) contendo 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina (Gibco), 2.5 μ g/ml de anfotericina (Gibco), 200 μ M de glutamina (Gibco), constituído de uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, agindo como uma solução nutritiva. Esse meio é destinado à cultura de células humanas e de outros animais. Ao final da adição de todos os componentes, esse meio será filtrado, utilizando-se uma membrana de 0,22 μ m em capela de fluxo e posteriormente distribuído em 11 garrafas de vidro estéreis, contendo cada uma 90,0 mL de DMEM, sendo que, antes da sua utilização, o meio de cultura será enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL).

A solução de soro bovino fetal será pré aquecida a 56°C, para inativação das enzimas. Em seguida será estocada em frascos de 150 mL e conservados no freezer a 20°C. O soro bovino fetal apresenta em sua composição básica insulina, hormônios e vários outros fatores, indispensáveis ao crescimento celular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS *cis*-[RuCl₂(phen)₂], *cis*-[Ru(phen)₂(Apy)₂](PF₆)₂ E *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂](PF₆)₂

Os complexos *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ e *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂](PF₆)₂ foram obtidos de maneira simples com alta pureza a partir do complexo *cis*-[RuCl₂(phen)₂] promovendo o deslocamento do grupo lábil Cl⁻ pelo grupo 4-apy e him. Os complexos estudados são estáveis no estado sólido na presença de oxigênio e em soluções aquosas ou solventes orgânicos.

Antes de iniciar os estudos, os complexos foram caracterizados utilizando as técnicas de CHN, UV-vis, voltametria cíclica, RMN ¹H e fotofísica.

Os valores da análise elementar do precursor *cis*-RuCl₂(phen)₂ e dos complexos Ru-4apy e Ru-him estão coerentes com os valores teóricos apresentados na Tabela 1. Apenas o valor experimental do nitrogênio do complexo Ru-him apresenta uma diferença acima de 5% do esperado, mas veremos posteriormente pelos espectros de RMN ¹H (sessão 4.2.1) que a diferença observada é devido à formação de vários compostos no meio reacional.

TABELA 1. Resultados de análise elementar para os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os complexos *cis*-[RuCl₂(phen)₂], *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂.2H₂O e *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂](PF₆)₂.2H₂O.

Complexo	Experimental (Calculado)		
	N(%)	C(%)	H(%)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (phen) ₂]	10,53(10,48)	54,14(53,76)	3,03(3,63)
<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4-apy) ₂](PF ₆) ₂ .2H ₂ O	11,74(11,48)	44,01(41,8)	3,40(3,30)
<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (him) ₂](PF ₆) ₂ .2H ₂ O	10,51(12,81)	42,17(41,92)	3,75(3,50)

4.2. CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS PARA O COMPLEXO *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂](PF₆)₂

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹H

O ligante histamina, em sua forma neutra, pode apresentar as formas adjacente, remoto e os seus isômeros conformacionais resultante da rotação da cadeia carbônica ao redor do eixo⁵¹⁻⁵². As diferentes conformações são mostradas na Figura 1.

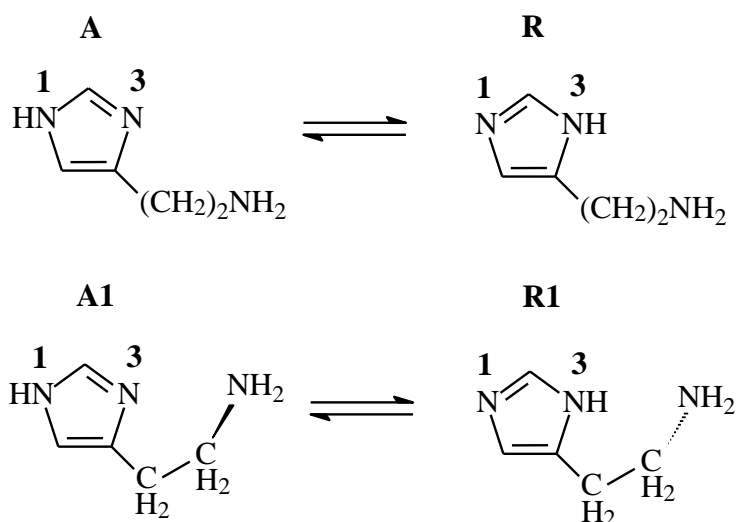


FIGURA 1. Estruturas dos isômeros adjacente (A) e remoto (R) da histamina e os seus isômeros conformacionais remoto1 (R1) e adjacente1 (A1).

Devido a várias estruturas possíveis do ligante histamina e também por ter mais de um ponto de coordenação o espectro de RMN de ¹H do complexo Ru-him em CD₃CN apresentou 2 sinais dubletos devido aos prótons do anel do imidazol e 2 sinais tripletos devido aos grupos CH₂ (Figura 3). Os dois conjuntos de sinais dubleto indicam a presença de dois isômeros do complexo Ru-him, os isômeros adjacente (A) e remoto (R) dependendo de qual átomo de nitrogênio do imidazol esta coordenado ao íon rutênio(II).

Para cada isômero os sinais obtidos no RMN de ¹H foram avaliados usando o método COSY ¹J, ¹H¹H. A Figura 2 apresenta as estruturas dos isômeros A e R para a atribuição do espectro de RMN ¹H. A Tabela 2 apresenta os valores de deslocamento químico e as constantes de acoplamento (J) obtidas para os isômeros A e R do complexo.

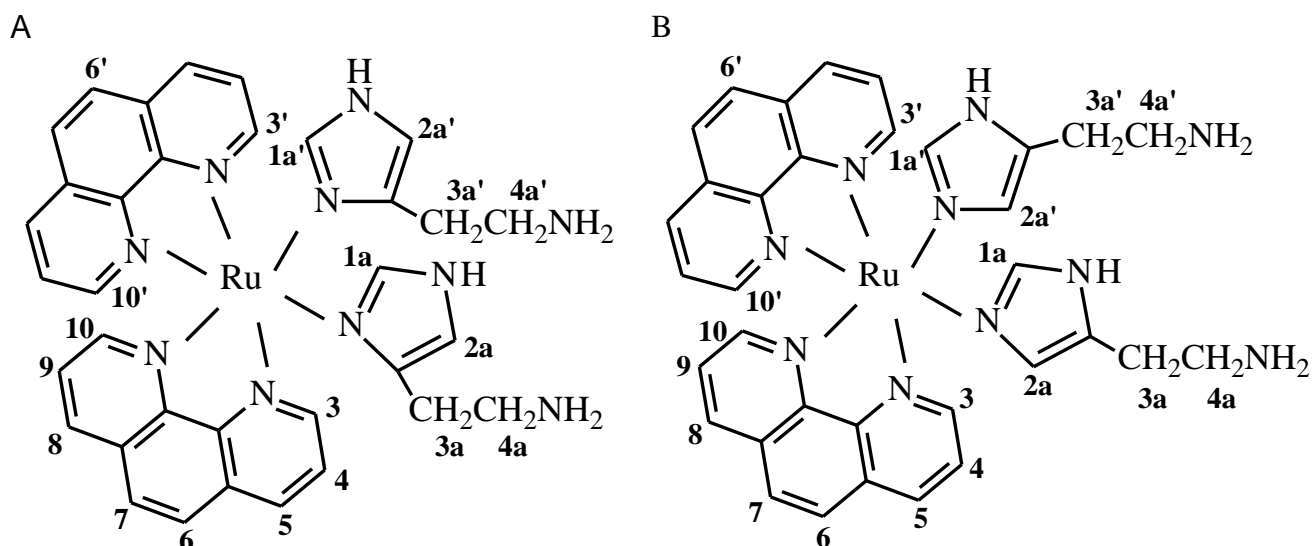


FIGURA 2. Estrutura do complexo Ru-him com as respectivas numerações utilizadas na tabela 2 sendo A) Adjacente e B) Remoto.

TABELA 2. Deslocamento químico de ^1H δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) dos prótons dos isômeros adjacente e remoto do complexo Ru-him em CD_3CN .

H	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)
	adjacente	remoto
3	9,48 (<i>dd</i> ; 1,1/5,1)	9,39 (<i>dd</i> ; 1,0/5,2)
4	8,07 (<i>dd</i> ; 5,2/8,1)	8,04 (<i>dd</i> ; 5,2/8,1)
5	8,71 (<i>dd</i> ; 1,2/8,3)	8,65 (<i>dd</i> ; 1,2/8,2)
6	8,04 (<i>d</i> ; 8,8)	8,09 (<i>d</i> ; 8,8)
7	8,16 (<i>d</i> ; 8,8)	8,18 (<i>d</i> ; 8,8)
8	8,35 (<i>dd</i> ; 0,8/8,2)	8,37 (<i>dd</i> ; 0,8/7,6)
9	7,43 (<i>dd</i> ; 5,3/8,2)	7,39 (<i>dd</i> ; 5,2/8,1)
10	7,83 (<i>dd</i> ; 1,2/5,2)	7,79 (<i>dd</i> ; 1,2/5,2)
1a	7,00 (<i>d</i> ; 1,2)	7,40 (<i>s</i>)
2a	6,10 (<i>d</i> ; 1,2)	6,57 (<i>s</i>)
3a	2,74 (<i>t</i> ; 6,6)	2,74 (<i>t</i> ; 6,6)
4a	2,48(<i>t</i> ; 6,6)	2,48(<i>t</i> ; 6,6)

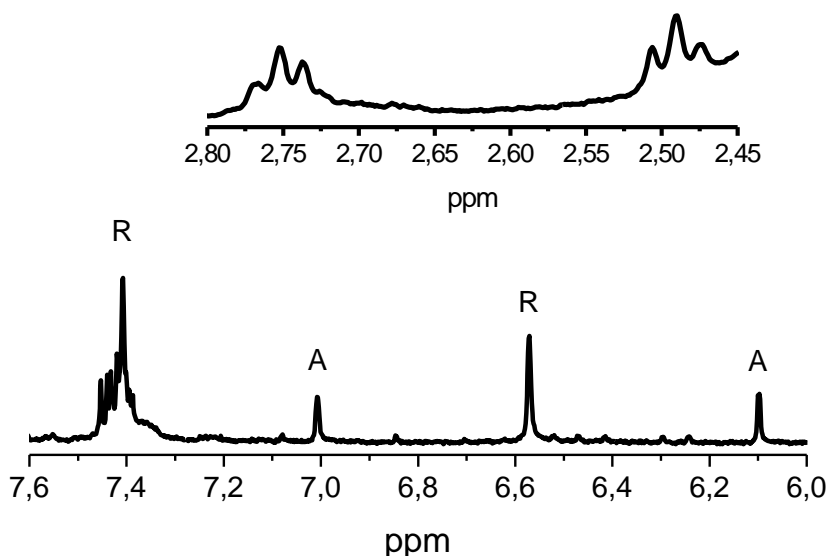


FIGURA 3. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him em CD_3CN na região do anel imidazol; inserido a região dos prótons CH_2 da cadeia $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

O isômero em maior proporção (69,5%) apresentou um deslocamento dos sinais $\text{H1a}'$ e $\text{H2a}'(\text{CH})$ para campos mais alto em 7,40 e 6,57 ppm sendo atribuídos ao isômero **R**. Para o isômero com menor proporção (26,4%) os sinais observados a 7,00 e 6,10 ppm foram atribuídos aos prótons H1a e $\text{H2a}(\text{CH})$ do isômero **A** (Figura 3). Os sinais observados a 2,74 e 2,48 ppm devido aos prótons $\text{H3a}'$ e $\text{H4a}'(\text{CH}_2)$ do grupo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ foram atribuídos aos isômeros **A** e **R** respectivamente (inserido na Figura 3). Os prótons do anel aromático do ligante coordenado fenantrolina com sinais a 9.48 e 7.83 ppm foram atribuídos ao isômero **A** e os sinais a 9.39 e 7.79 ppm atribuídos ao isômero **R**. O grupo NH_2 terminal não coordenou ao íon metálico.

Além dos sinais devido aos isômeros **R** e **A** do complexo Ru-him, observou-se 4 novos sinais na região de 6,2 a 6,5 ppm (Figura 4). Estes sinais foram atribuídos a duas

formas menos estáveis da histamina coordenada (**A1** e **R1**) e surgem devido a rotação do grupo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ como observado para histamina livre⁵¹⁻⁵². Em CD_3CN , os isômeros **A1** e **R1** representam (4,1%) da quantidade total do complexo (Figura 4A).

Em CD_3OD , um solvente mais polar que CD_3CN o isômero **A** é mais abundante (60,0%) que o correspondente isômero **R** (32,3%). Além do mais, em CD_3OD as formas conformacionais **R1** e **A1** da histamina coordenada no complexo Ru-him estão presentes em maior quantidade (7,7%), Figura 4B.

Uma explicação coerente para estas diferenças é que o CD_3OD interage com o nitrogênio do grupo amino e por efeito indutivo esta interação desloca para si a densidade eletrônica do nitrogênio mais próximo fazendo com que o nitrogênio mais distante do grupo amino fique mais “atrativo” para a ligação com o hidrogênio. Em consequência o nitrogênio mais próximo do grupo amino fica livre para se ligar ao metal. Quando o solvente é a CD_3CN , este não interage com os nitrogênios da histamina e o metal irá se ligar no nitrogênio que apresentar menor impedimento estérico. Desse modo é formado maior quantidade de isômero adjacente em CD_3OD (60,0%) e maior quantidade de isômero remoto (69,5%) em CD_3CN .

Estes resultados sugerem que efeitos do solvente são mais importantes para a isomerização do nitrogênio N1 para N3 coordenados que efeitos estéricos. Entretanto, em CD_3OD observa-se também uma pequena quantidade de histamina livre em 6,8 ppm sugerindo que a isomerização é acompanhada pela labilização da histamina coordenada, coerente com o alto efeito estérico imposto pela formação do isômero **A**.

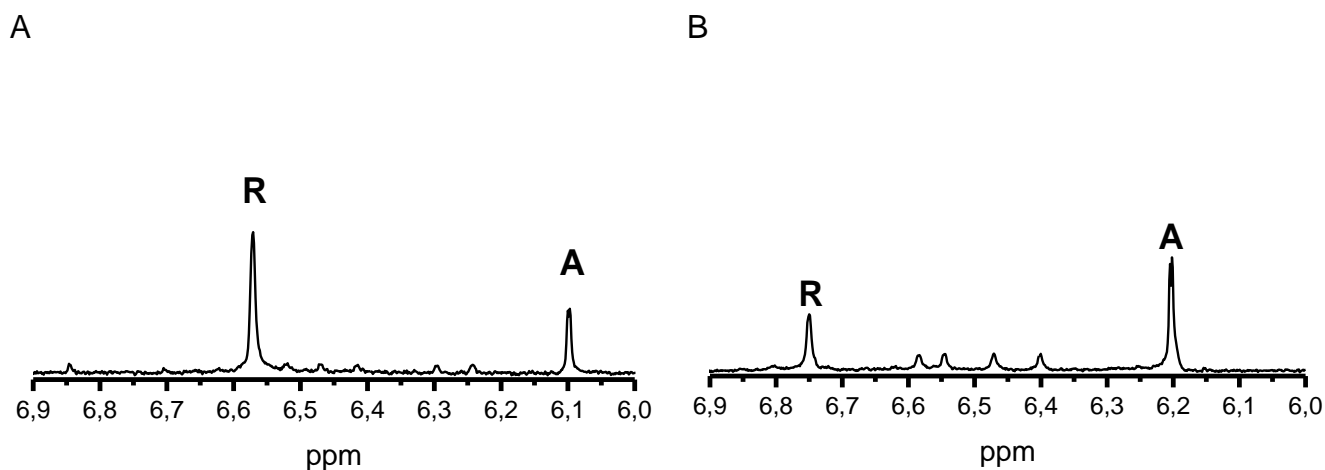


FIGURA 4. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him na região do anel imidazol A) CD_3CN , B) CD_3OD .

A ausência de sinal na região de 9,0 ppm característico do próton mais ácido da fenantrolina do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ e do próton mais ácido da fenantrolina livre em 9,19 ppm⁵³ nos dão indícios da pureza do complexo Ru-him (Figura5).

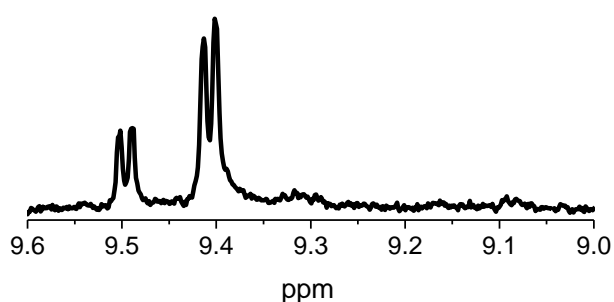


FIGURA 5. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him em CD_3CN na região do próton mais ácido da fenantrolina.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE UV-vis

Para a atribuição das transições eletrônicas nos complexos de Ru(II) estudados foram realizados cálculos da absorvidade molar, ϵ , usando a Lei de Beer⁵⁴ $Abs = \epsilon bc$, onde Abs = valor de absorção no comprimento de onda máximo, b = caminho óptico da cela (1 cm) e c = concentração, em mol L⁻¹. O valor da absorvidade molar mostra o quanto as transições eletrônicas são permitidas.

Os espectros eletrônicos dos complexos *cis*-[RuCl₂(phen)₂] e *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂](PF₆)₂ na região do visível em acetonitrila são apresentados na Figura 6.

O espectro de absorção do complexo *cis*-[RuCl₂(phen)₂] é caracterizado por uma absorção intensa em 544nm ($\epsilon = 8200 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) atribuída a uma transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT $d\pi(\text{Ru(II)}) \rightarrow \text{phen}(\pi^*)$) e uma banda centrada no metal Ru(II) $\rightarrow \text{Ru(II)}$ ($d\pi \rightarrow d\pi^*$) em 358 nm⁵⁵. Os dados mostram também que a mudança do ligante influencia as posições e intensidade relativa dos máximos de absorção dos complexos estudados. O espectro de absorção eletrônica do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ é caracterizado por uma absorção intensa e larga na região do visível com máximo em 484 nm ($\epsilon = 14000 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$) (Figura 6). As absorções presentes na região do ultravioleta (250 – 320 nm) apresentam intensidade alta que são típicas das transições eletrônicas de transferência de carga interna dos ligantes (LLCT), fenantrolina \rightarrow fenantrolina ($\pi \rightarrow \pi^*$) e him \rightarrow him ($\pi \rightarrow \pi^*$). No espectro de absorção de complexos de Ru(II) espera-se também transições centradas no metal Ru(II) $\rightarrow \text{Ru(II)}$ ($d\pi \rightarrow d\pi^*$) que por apresentarem intensidade baixa são obscurecidas pelas transições de transferência de carga.

À medida que os íons cloretos no complexo Ru-Cl é substituído pelo ligante histamina, a absorção desloca para menores comprimentos de onda. Isso ocorre devido a troca dos íons Cl^- que são fortes doadores π por ligantes mais receptores π . Como consequência ocorre uma estabilização da energia dos orbitais t_{2g} .

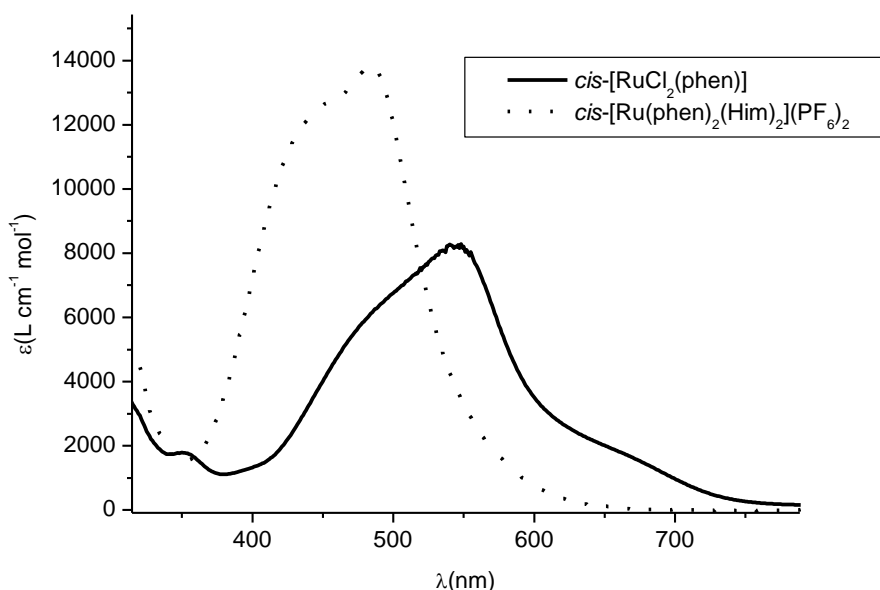


FIGURA 6. Espectro eletrônico dos complexos $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Him})_2]^{2+}$ na região do visível em CH_3CN .

4.2.3. ABSORÇÃO NO ESTADO EXCITADO

A Figura 7 apresenta os espectros absorção no estado excitado dos complexos Ru-him em acetonitrila com um pulso de excitação de 8 ns no comprimento de onda de 355 nm. Observa-se uma absorção negativa entre 400 a 550 nm com máximo aproximadamente em 450 (na mesma região da banda de MLCT observada no estado fundamental) e duas absorções positivas com o máximo aproximadamente em 350 nm e 600 nm que são atribuídas ao ânion radicalar fenantrolina⁵⁶. A absorção negativa na

mesma região da absorção no visível indica que os complexos no estado excitado retém sua estrutura de estado fundamental sugerindo a formação do estado excitado de MLCT³ {Ru^{III}(phen^{•-})₂(Him)₂}*. Os espectros de absorção no estado excitado são similares ao espectro de transiente do complexo [Ru(phen)₃]²⁺⁵⁷.

Apesar de ser observado um valor alto para ΔA , para os dois comprimentos de onda avaliados (350 e 480 nm), ambos os decaimentos retornaram á linha de base. A repopulação do estado fundamental levou a um decaimento bi-exponencial com tempos de vida de transiente de (164,0 ns e 35,7 ns).

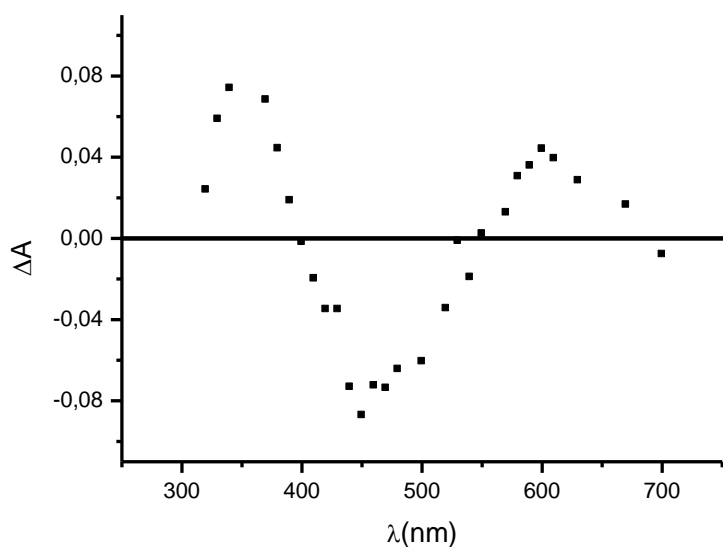


FIGURA 7. Espectro de absorção no estado excitado do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ com $\lambda_{exc.} = 355$ nm e concentração de 5×10^{-5} mol.L⁻¹ em CH₃CN.

Com esses dados podemos concluir que a banda larga de absorção no estado fundamental com o máximo na região de 484 nm do complexo Ru-him pode ser atribuída a uma transição eletrônica de MLCT $d\pi(\text{Ru(II)}) \rightarrow \pi^*(\text{phen})$.

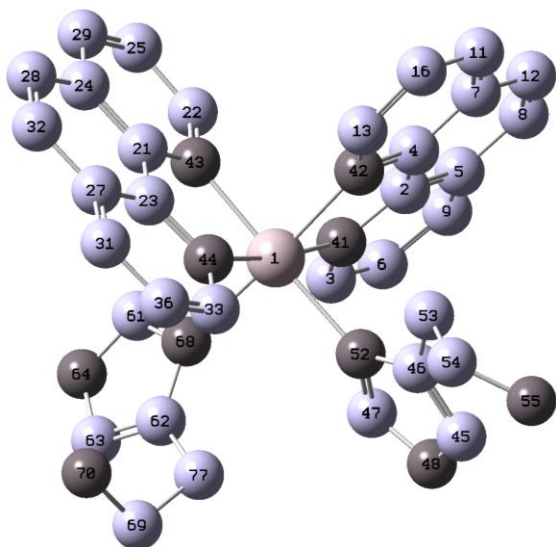
4.2.4. CALCULO TEÓRICO

Para auxiliar na interpretação dos resultados de fotoquímica e fotofísica do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ foram feitos cálculos teóricos utilizando o método do DFT (Teoria Funcional de Densidade) com base B3LYP para os isômeros **A** e **R**. Foram feitas as otimizações das geometrias de equilíbrio dos isômeros **A** e **R** em acetonitrila (Figura 8). Os principais comprimentos e ângulos de ligação dos isômeros **A** e **R** são apresentados na Tabela 3. Os isômeros mostram um arranjo geométrico similar e são caracterizados pela simetria C₁. A coordenação dos ligantes ao redor do rutênio é aproximadamente um octaédrico e os ligantes estão dispostos em posição *cis*. O comprimento de ligação Ru-N(phen), para os isômeros adjacente e remoto são aproximadamente 2,1 que está de acordo com o comprimento de ligação do Ru-N(phen) do complexo [Ru(phen)₃]²⁺ que é aproximadamente 2,06 Å⁵⁸.

A principal diferença observada nos comprimentos e ângulos de ligação do complexo Ru-him são um alongamento da ligação Ru-N(him) de 2,12 para 2,18 Å e uma diminuição no ângulo de ligação (phen)N41-Ru-N52(him) de 87,23 para 84,72° observadas quando analisamos a passagem do isômero **R** para o isômero **A**. Também o ângulo de ligação (him)N68-Ru-N42(phen) diminui de ~4,10°. Estas diferenças nos comprimentos e ângulos de ligação ocorrem devido a interação dos orbitais *s*- do metal e do ligante him que sofrem uma distorção para aumentar a sobreposição orbital na formação do orbital molecular.

Computacionalmente, ambos os isômeros possuem energias similares. O isômero remoto possui menor energia (0.0342 a.u). A pequena diferença de energia entre os isômeros indica à probabilidade de coexistir ambas as formas isoméricas em uma mistura reacional. Sendo confirmado pelos resultados experimentais.

A



B

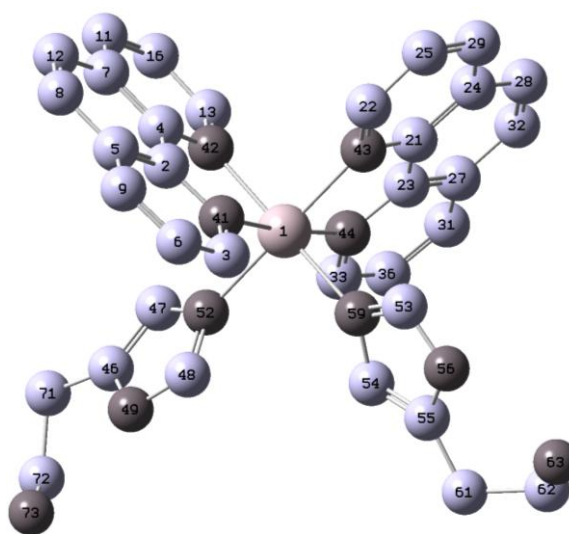


FIGURA 8. Estruturas moleculares otimizadas em acetonitrila dos isômeros (A) Adjacente e (B) Remoto.

TABELA 3. Comprimentos de ligação selecionados, ângulos de ligação e ângulos diedrais dos isômeros adjacente e remoto obtidos com a base de cálculo B3LYP/LanL2DZ em CH₃CN.

Comprimento de ligação , A			
	Remoto		Adjacente
Ru-N41(phen)	2,10045	Ru-N41(phen)	2,11568
Ru-N42(phen)	2,09480	Ru-N42(phen)	2,09156
Ru-N43(phen)	2,09446	Ru-N43(phen)	2,09511
Ru-N44(phen)	2,10157	Ru-N44(phen)	2,11347
Ru-N52(him)	2,12362	Ru-N52(him)	2,15993
Ru-N59(him)	2,12570	Ru-N68(him)	2,18559
Ângulo de ligação, °			
(phen)N42-Ru- N41(phen)	79,59651	(phen)N42-Ru-N41(phen)	79,3850
(phen)N43-Ru-N44(phen)	79,58505	(phen)N43-Ru-N44(phen)	79,33164
(phen)N41-Ru-N52(him)	87,23013	(phen)N41-Ru-N52(him)	84,72645
(him)N52-Ru-N59(him)	91,31703	(him)N52-Ru-N68(him)	91,94379
(phen)N43-Ru-N59(him)	89,73750		
(phen)N41-Ru-N44(phen)	174,76099	(phen)N41-Ru-N44(phen)	173,60009
(phen)N42-Ru-N59(him)	176,30496	(phen)N43-Ru-N68(him)	87,98490
		(phen)N42-Ru-N68(him)	172,19505

Para uma melhor elucidação da estrutura eletrônica foram feitos os espectros de absorção eletrônica dos dois isômeros **A** e **R** pela análise da composição e energias dos orbitais moleculares de valência Figura 9. Os cálculos levaram em consideração o efeito no solvente (CH₃CN). As representações dos orbitais moleculares de fronteira estão descritos na Tabela 4.

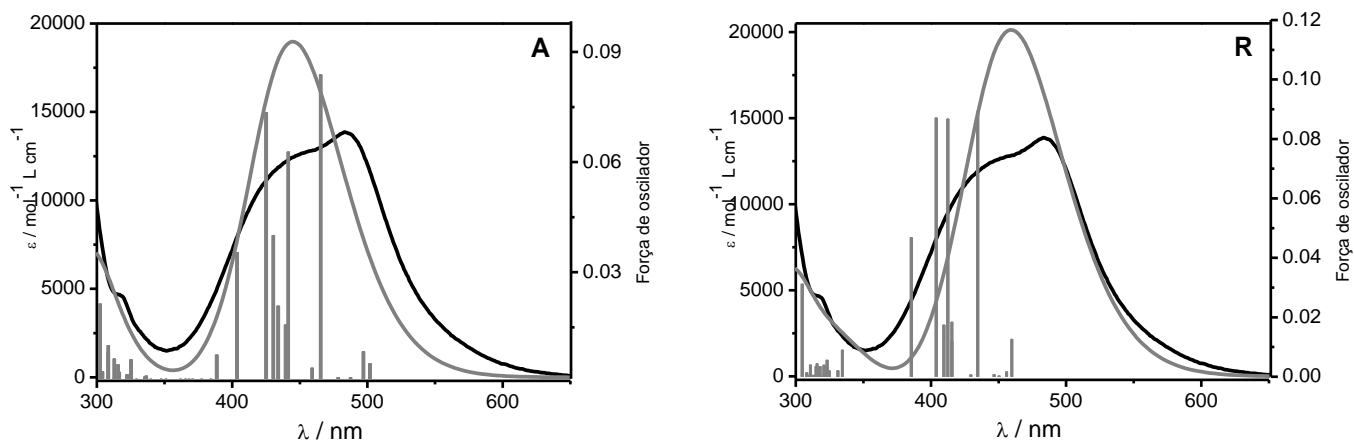
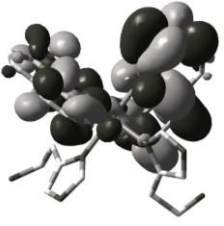
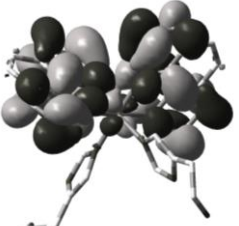




FIGURA 9. Espectro de absorção teórico e experimental do complexo Ru-him em CH_3CN para os isômeros (A) Adjacente e (R) Remoto.

TABELA 4. Superfície de contorno dos orbitais moleculares de fronteira do complexo Ru-him para os isômeros A e R.

	Isômero A, Energia (eV)		Isômero R, Energia (eV)	
LUMO		-2,55		-2,51
HOMO		-5,82		-5,70

Os três orbitais moleculares ocupados (OMs) de maior energia (HOMO, HOMO-1 e HOMO-2) dos dois isômeros do complexo Ru-him apresentam uma porcentagem alta (>70%) dos orbitais **d** do centro metálico de Ru(II) e contribuições tanto da phen como do ligante him. Os OMs HOMO-3 e HOMO-4 são caracterizados exclusivamente pelos orbitais do ligante him coordenado. Para os dois isômeros, o OM de menor energia não ocupado (LUMO) apresenta uma contribuição significativa (96,6%) do ligante phen coordenado com uma participação pequena do centro metálico (3%). O intervalo de energia HOMO-LUMO (~ 3,2 eV) é relativamente grande para os dois isômeros, mas são menos estabilizados quando comparados ao complexo Ru(phen)₃]²⁺ (3,54 eV)⁵⁹.

Considerando a correlação entre este intervalo de energia e o grau de delocalização de carga pode-se deduzir que a interação covalente Ru-phen envolve principalmente a doação de carga do ligante histamina para o fragmento {Ru(phen)₂}.

Os espectros de absorção UV-vis dos isômeros **A** e **R** do complexo Ru-him são caracterizados por 3 absorções intensas de MLCT (Ru→phen) (Tabela 1 e 2 do anexo A3) para o isômero **A** as transições de ¹MLCT são calculadas a 2,62 eV (473,8 nm), 2,76 (448 nm) e 2,87 eV (431,9 nm) com força de oscilador alta. Observou-se um deslocamento para o vermelho na absorção de ¹MLCT teórica para o isômero **R** de 2,53 (490nm), 2,70(458nm) e 2,77 (447nm) em relação ao isômero **A**. Este deslocamento pode ser atribuído a maior força de campo-ligante do nitrogênio N1- em relação ao nitrogênio N3- da histamina coordenada, que aumenta a energia dos orbitais dπ do metal por 0,12 eV e diminui a energia necessária para promover um elétron para o orbital π* da phen. O valor experimental do máximo de absorção (485 nm) do complexo Ru-him é compatível com o valor teórico de 2,53 eV (489,7 nm) obtido para o isômero **R**, Figura 9. Estes resultados indicam que as transições eletrônicas observadas experimentalmente em CH₃CN podem ser atribuídas ao isômero **R**. Além do mais, o fato de que as transições

eletrônicas calculadas seguem os espectros eletrônicos experimentais sugerem que as geometrias calculadas estão pelo menos qualitativamente corretas.

Além das transições de MLCT, os cálculos teóricos de absorção UV-vis indicam a presença de estados excitados dissociativos centrados no metal (MC). Estes estados excitados são observados a 3,69 eV (335,9 nm) para o isômero **A** e 3,81 eV (325,3 nm) para o isômero **R**, Tabela 1 e 2, anexo A3. Estes estados excitados apresentam força de oscilador muito baixas ($1,5 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-4}$) para o isômero **A** e **R** respectivamente. Devido a intensidade baixa, esta transição é obscurecida pela transição intensa de MLCT.

4.2.5. VOLTAMETRIA CÍCLICA E PULSO DIFERENCIAL

Utilizando a técnica eletroquímica pelo método de voltametria cíclica e pulso diferencial, estudou-se os processos de oxidação e redução dos complexos *cis*-RuCl₂(phen)₂, *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂](PF₆)₂ em diclorometano. O voltamograma cíclico do precursor *cis*-RuCl₂(phen)₂ (Figura 10A) é caracterizados por um par redox apresentando ΔE de ~ 60 mV que segue a equação de Nerst indicando um processo reversível de um único elétron.

A remoção de um elétron do orbital $d\pi$ do Ru(II) para gerar Ru(III) é influenciado pela natureza do ligante. Uma vez que a densidade eletrônica localizada sobre o metal está diretamente relacionada as propriedade π e σ doadora e receptora de elétrons dos ligantes coordenados, a natureza dos ligantes coordenados afeta os potenciais Ru(II/III)⁶⁰. Para ligantes da mesma série, a presença de substituintes retiradores de elétrons aumenta o potencial de oxidação enquanto o oposto ocorre para substituintes doadores de elétrons⁶¹. Desta forma a substituição dos íons cloretos, que são ligantes doadores π de elétrons pelo ligante imidazol, promove uma diminuição na densidade eletrônica sobre o

centro metálico, com conseqüente deslocamento do potencial do Ru(II) para regiões mais anódicas (Figura 10B). Nos voltamogramas cíclicos também estão presentes varias reduções que ocorrem a potenciais negativos e todas são centradas no ligante fenantrolina. A Figura 11A,B apresentam os espectros de pulso diferencial do complexo Ru-him em acetonitrila.

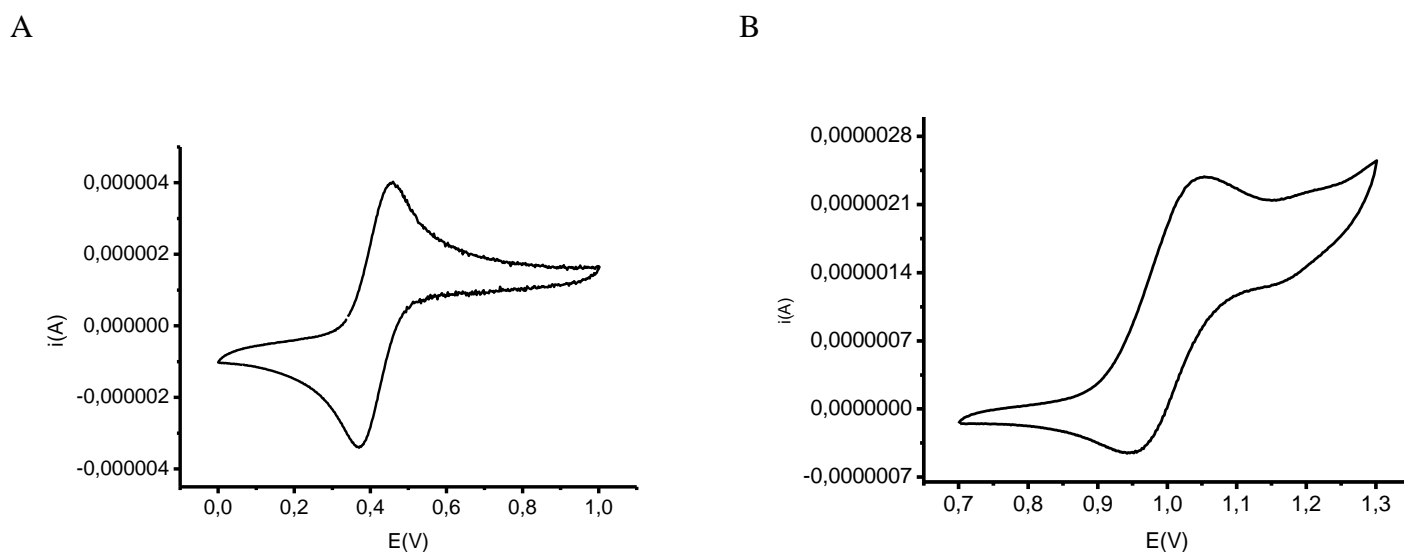


FIGURA 10. Voltamograma cíclico dos complexos A) *cis*-RuCl₂(phen)₂ e B) *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ em diclorometano com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L⁻¹ de PTBA, $v = 100$ mV/s.

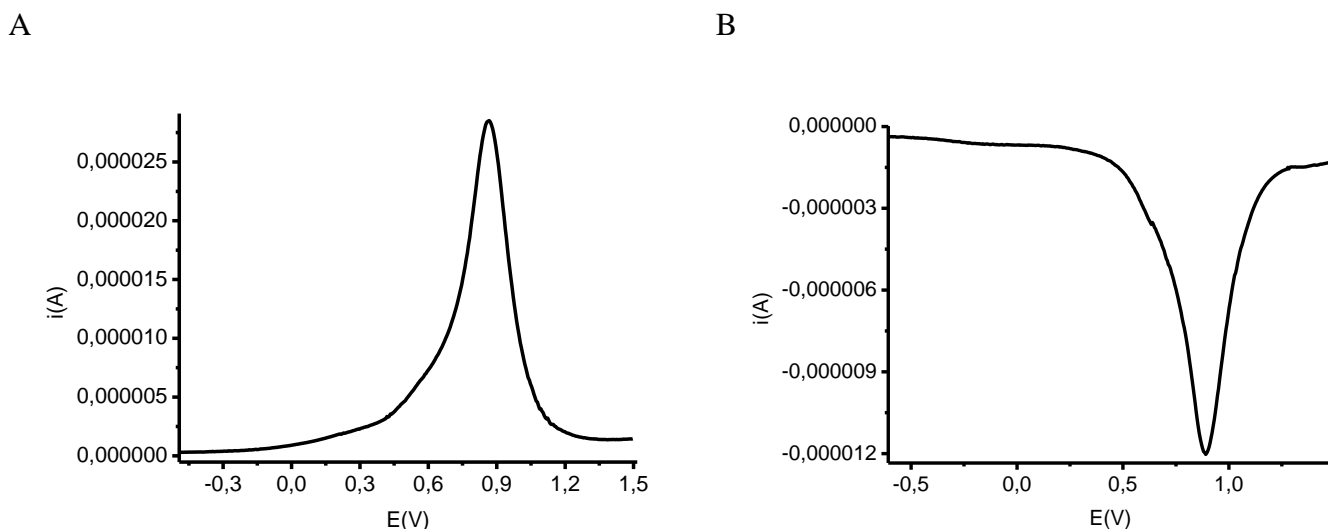


FIGURA 11. Pulso diferencial do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ em acetonitrila A) oxidação, B) redução com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L⁻¹ de PTBA, $v = 100$ mV/s.

4.2.6. FLUORESCÊNCIA

O espectro de emissão do complexo Ru-him em acetonitrila quando excitado com luz de 490 nm apresenta uma banda bem definida com comprimento de onda máximo em 635 nm, (Figura 12). A emissão é independente do comprimento de onda de excitação (300 e 500 nm) e o espectro de excitação ($\lambda_{em} = 640$ nm) é similar ao espectro de absorção (inserido na Figura 12).

Para verificar efeitos de agregação os quais podem levar a supressão da emissão do complexo, a luminescência do complexo Ru-him foi investigada na faixa de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} mol L⁻¹. Os gráficos de intensidade de emissão (λ_{em}) vs Ru(II) realizado em acetonitrila são mostrados nas Figura 13. Determinou-se, assim, a concentração de 5×10^{-5} mol L⁻¹ para a continuidade aos estudos.

Apesar da emissão ser independente do λ_{irr} , a intensidade de emissão é dependente do solvente usado (acetonitrila, acetona, metanol, DMSO, clorofórmio, diclorometano e água) sendo mais intensa em solventes apolares (Figura14). Neste caso o rendimento quântico de emissão em CH_3CN (0,035) é similar ao obtido para o complexo⁶² $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apesar da emissão no complexo Ru-him ser mais deslocada para a região do vermelho o que indica que não há impureza de $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

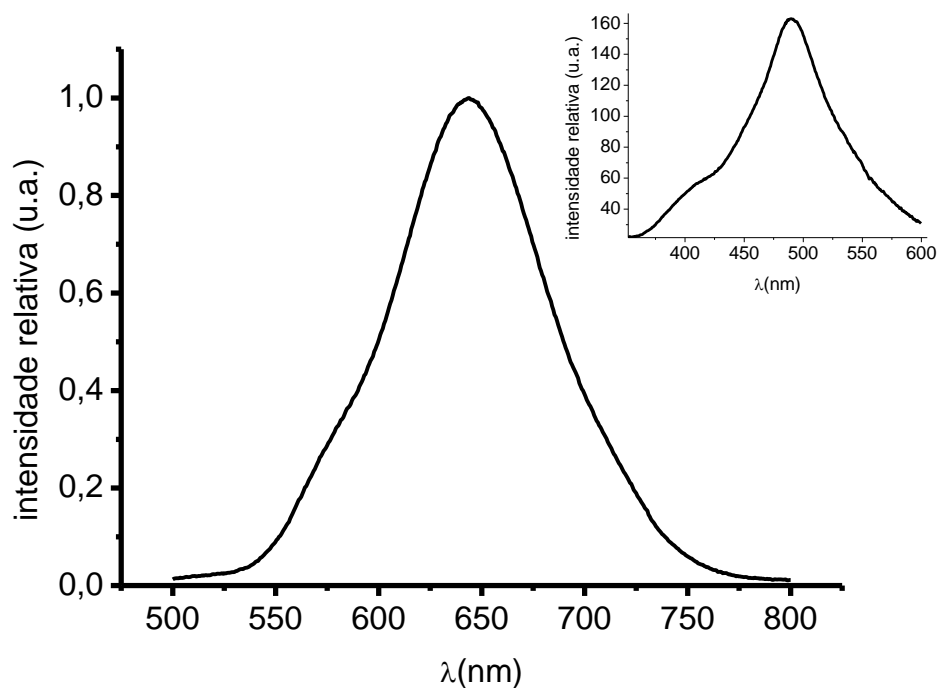


FIGURA 12. Emissão do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Him})_2](\text{PF}_6)_2$ em acetonitrila na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$. Inserido o espectro de excitação com $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$.

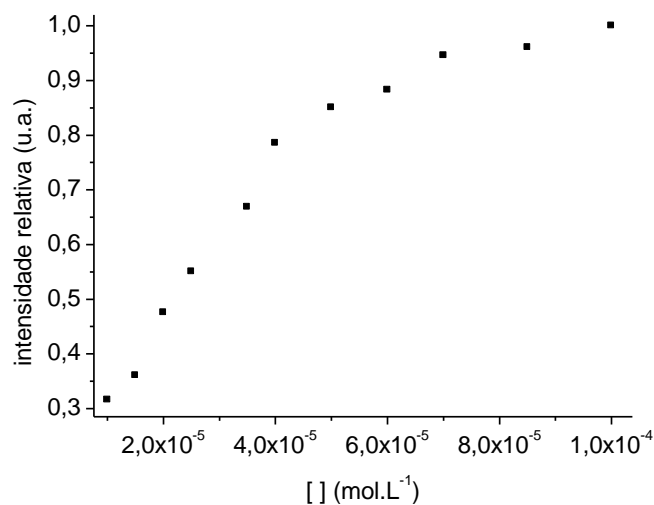


FIGURA 13. Dependência da concentração na intensidade de emissão dos complexos $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Him})_2](\text{PF}_6)_2$ em água no intervalo de concentração de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} mol.L⁻¹ no $\lambda_{\text{exc}} = 480\text{nm}$.

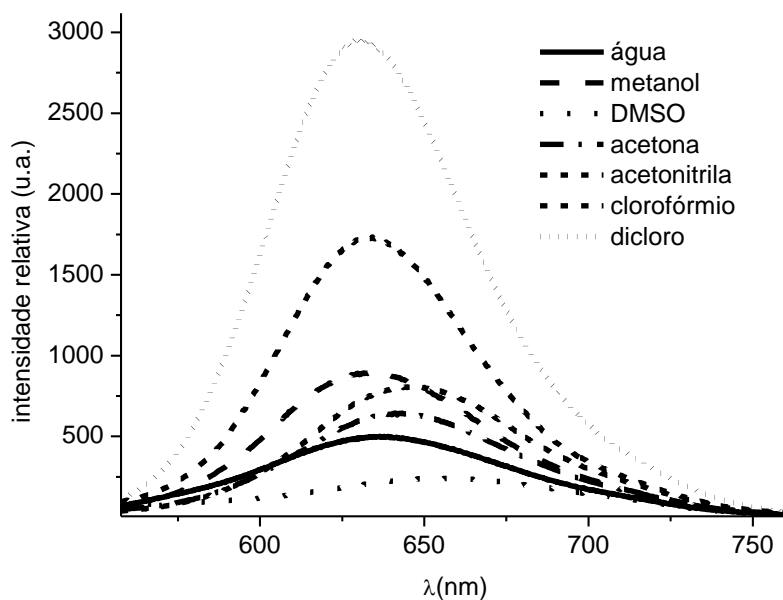


FIGURA 14. Emissão do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{him})_2](\text{PF}_6)_2$ em vários solventes na concentração de 5×10^{-5} mol . L⁻¹ com $\lambda_{\text{exc}} = 480\text{nm}$.

A Figura 15 mostra a diferença de energia entre o máximo de emissão e a absorção de menor energia, ΔE (abs-em), do complexo Ru-him, denominado deslocamento de Stokes⁶³. O valor obtido de 6000 cm^{-1} é coerente com os valores esperados para complexos polipiridínicos de Ru(II)⁶⁴⁻⁶⁵ e mostram a alteração na polaridade do complexo com a excitação com luz de 490 nm.

As propriedades luminescentes do complexo Ru-him também foram verificadas em solução de MeOH/ ETOH 4:1 na temperatura de 77K (Figura 16). A 77 K a emissão do complexo apresenta dois picos vibracionais com uma diferença entre eles de 1257 cm^{-1} semelhante aos valores observados para o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ⁶⁶.

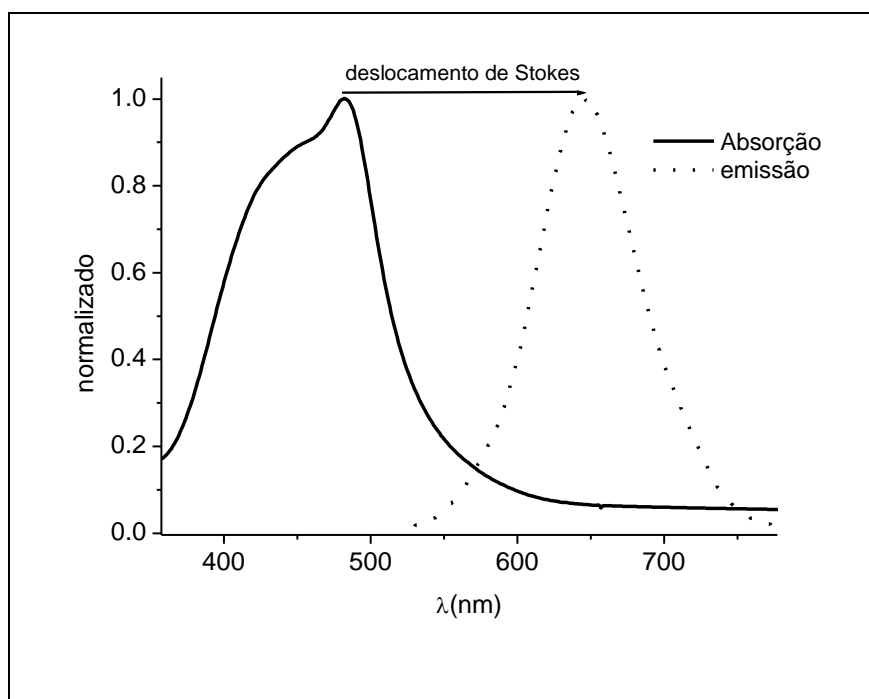


FIGURA 15. Espectro de absorção e emissão do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{him})_2]^{2+}$ em acetonitrila.

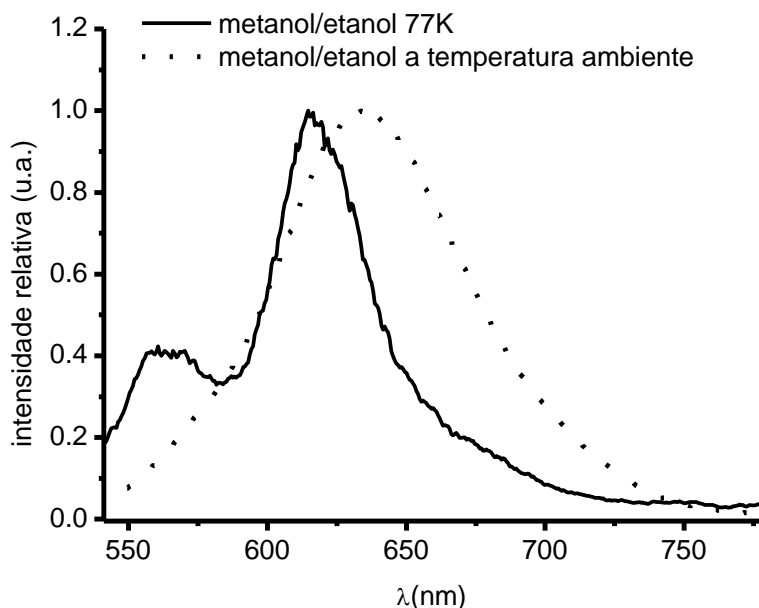


FIGURA 16. Espectro de emissão do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{him})_2]^{2+}$ $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ em solução metanol/etanol (4:1) e a temperatura ambiente.

4.2.7. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA NO ESTADO EXCITADO

A Figura 17 mostra a cinética de decaimento de emissão para o complexo Ru-him em acetonitrila. O perfil da curva de decaimento de emissão resultou em um decaimento bi-exponencial com valores de tempo de emissão medidos de 184,7 ns e 43,76 ns com fatores pre-exponenciais de 0,67 e 0,33.

Estes resultados sugerem a presença de dois compostos emissores no complexo Ru-him, antes da excitação, consistente com a observação de dois isômeros, **A** e **R**, do complexo Ru-him obtidas nos experimentos de RMN de ^1H em CD_3CN . A similaridade nos valores de tempo de vida de transiente (164,0 ns and 35,7 ns) com os valores de tempo de

vida de emissão confirmam que as duas emissões tem origem nos estados excitados de $^3\text{MLCT}$ ($\text{Ru} \rightarrow \text{phen}$).

Os valores de tempos de vida de emissão são menores que os valores observados para o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (500 ns)⁶², sendo que o isômero que apresenta maior tempo de vida de emissão medido é responsável por 90,7% da emissão de fluorescência total. A diminuição no tempo de vida de emissão é atribuída em parte a contribuição do decaimento não radiativo ($5,2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) que esta associado com o menor valor da constante de velocidade radiativa ($0,18 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) provavelmente devido a população térmica de um estado excitado centrado no metal.

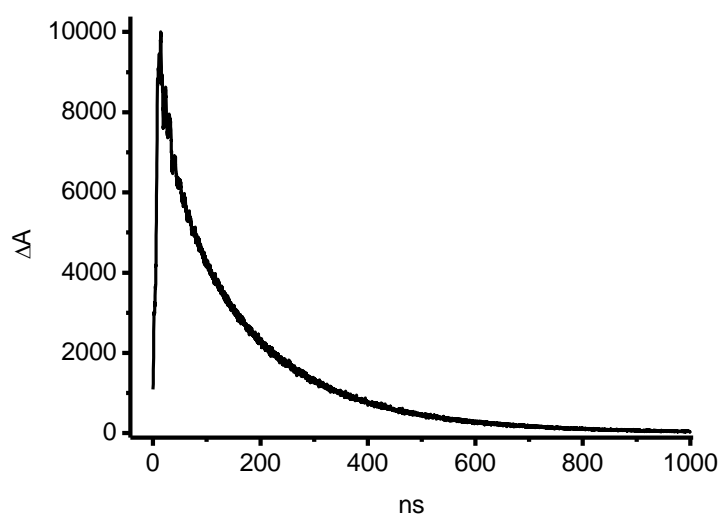


FIGURA 17. Decaimento do tempo de vida de emissão do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{him})_2]^{2+}$ em acetonitrila.

4.2.8. ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO COMPLEXO Ru-him COM SORO ALBUMINA BOVINA

O perfil observado nos espectros de absorção UV-vis e de emissão do complexo Ru-him em solventes não aquosos são mantidas em água pura e em solução aquosa (tampão Tris/HCl, pH 7.4) na ausência e presença da proteína do soro albumina bovina (BSA). Estas propriedades são relevantes para o desenvolvimento de um sistema de entrega de fármacos principalmente porque as propriedades de transporte de metalofármacos para seus sítios alvo no sistema fisiológico da albumina do soro vêm sendo extensivamente descrita na literatura⁶⁷⁻⁷⁰.

Por este motivo, iniciamos estudos da interação do complexo Ru-him com a proteína do soro bovino albumina (BSA). Nestes experimentos a solução aquosa de tampão (Tris HCl, pH 7.4) de BSA e do complexo Ru-him foram misturadas e incubadas por 24 horas antes do uso, e avaliadas usando a técnica de supressão de fluorescência. O espectro de emissão da proteína BSA quando excitada com luz de 280 nm apresenta um máximo de emissão em 344 nm. Como mostrado na Figura 18 as mudanças na forma da banda e no comprimento de onda máximo de emissão do BSA ($2,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) com a adição do complexo Ru-him nas concentrações ($2,5 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) foram insignificantes, indicando que a presença do complexo não provoca mudanças significativas na estrutura secundária da proteína.

Não foi possível calcular o gráfico de Stern-Volmer (K_{SV}), a constante de velocidade de supressão (K_q) e o número de sítios ativos para este experimento devido ao efeito de filtro existente no experimento. Podemos dizer apenas que os resultados indicam que ocorre uma interação do complexo com BSA como esperado devido a diminuição da emissão do BSA pelo complexo Ru-him.

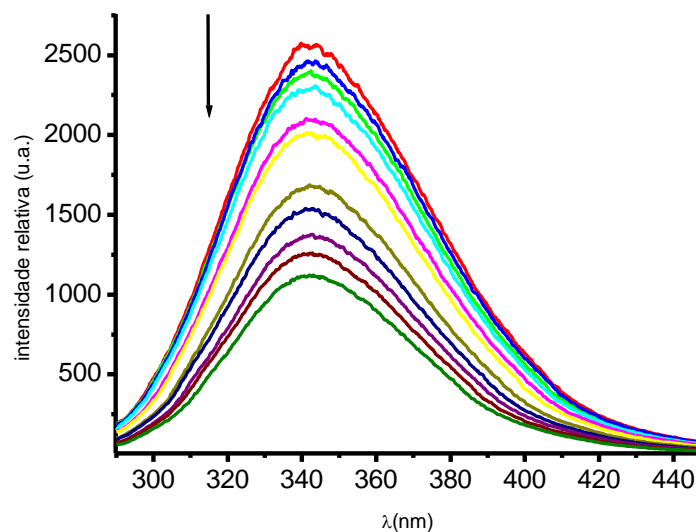


FIGURA 18. Supressão da emissão do BSA ($2,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) pelo complexo Ru-him nas concentrações $2,5 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4.

Para avaliar a contribuição do fragmento $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ para a interação BSA - complexo, experimentos semelhantes de supressão da fluorescência do BSA pelo complexo foram realizados para a histamina livre. Nenhuma mudança na intensidade da fluorescência do BSA foi observada na presença da histamina livre ($2,5 \times 10^{-6}$ a $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 19). Estes resultados mostram que a afinidade de histamina com o BSA pode ser aumentada significativamente, pela coordenação do centro metálico de Ru (II). Além disso, esses resultados sugerem que o fragmento $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ apresenta características estruturais que são essenciais para a interação da histamina com o BSA.

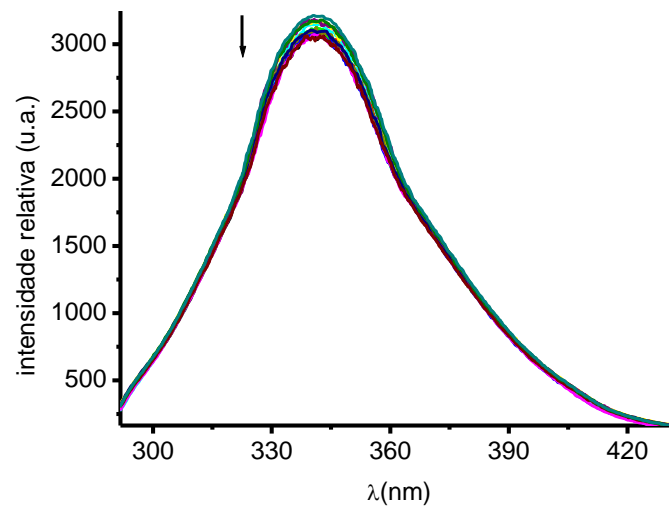


FIGURA 19. Supressão da emissão do BSA ($2,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) pelo ligante him nas concentrações $2,5 \times 10^{-6}$ a 5×10^{-5} M em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4 a 37 graus.

4.2.9. ESTUDO DE FOTÓLISE CONTÍNUA

O complexo Ru-him é termicamente estável quando estocado em solução aquosa e em solventes orgânicos na ausência de luz.

4.2.11. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA UV-vis.

Os espectros de absorção obtidos durante a fotólise contínua do complexo Ru-him em CH₃CN com luz de 420 nm são mostrados na Figura 20. Neste experimento efetuaram-se medidas de absorção de 30 em 30 segundos durante aproximadamente 30 minutos. Observa-se um decaimento contínuo dos máximos de absorção a 483 nm e o aparecimento de uma banda com o máximo de absorção em torno de 420 nm típico da formação do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺, ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$; $\epsilon_{\text{max}} = 8700 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)⁷¹ sugerindo um mecanismo fotoquímico dissociativo com participação dos estados excitados centrados no metal (MC).

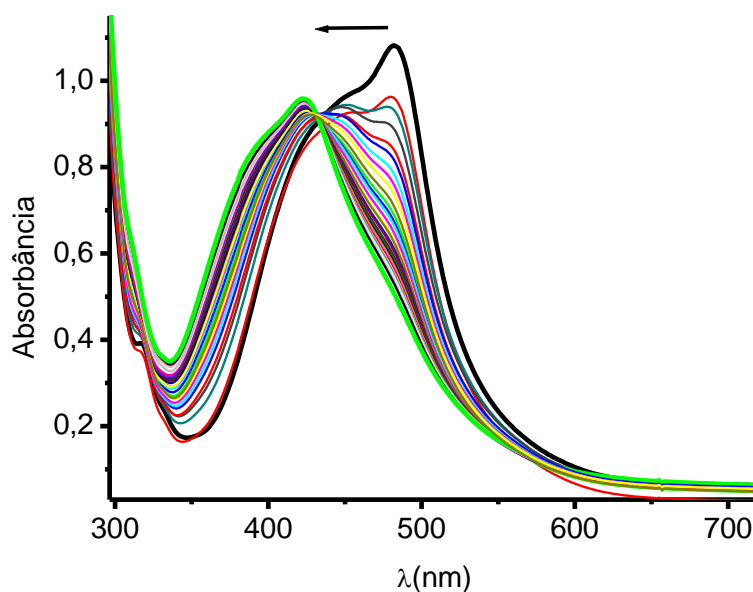


FIGURA 20. Espectros de absorção eletrônica obtidos durante a fotólise do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(Him)₂]²⁺ em acetonitrila .

Os experimentos de fotólise contínua acompanhados por absorção UV-vis realizados em meio aquoso não levaram a alterações significativas nos espectros de absorção eletrônica uma vez que o fotoproduto *cis*-[Ru(phen)₂(H₂O)₂]²⁺ ($\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{max}} = 10700 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)⁷¹ apresenta absorções intensas na mesma região do complexo Ru-him (Figura 21). Este fato dificultou a análise da reatividade fotoquímica destes complexos em solução aquosa pela técnica de espectroscopia UV-vis. Os estudos fotoquímicos em meio aquoso foram acompanhados por espectroscopia de emissão descritos na seção 5.2.13.

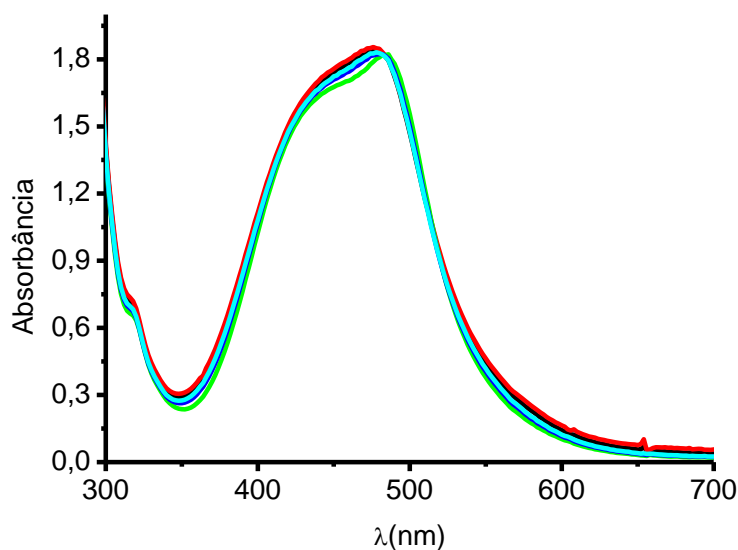


FIGURA 21. Espectros de absorção eletrônica obtidos durante a fotólise do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ em H₂O.

4.2.12. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS POR VOLTAMETRIA CÍCLICA.

A fotoquímica do complexo Ru-him com luz de 420 nm em CH₃CN foi acompanhado por voltametria cíclica. Durante a fotólise o potencial de oxidação em 1,04 V do complexo Ru-him desloca para 1,22 V (Figura 22). Os novos picos de oxidação formados são concordantes com os valores da literatura⁷¹ para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺. Estes resultados são consistentes com o decréscimo da densidade eletrônica do centro metálico causada pela diminuição da basicidade do ligante coordenado.

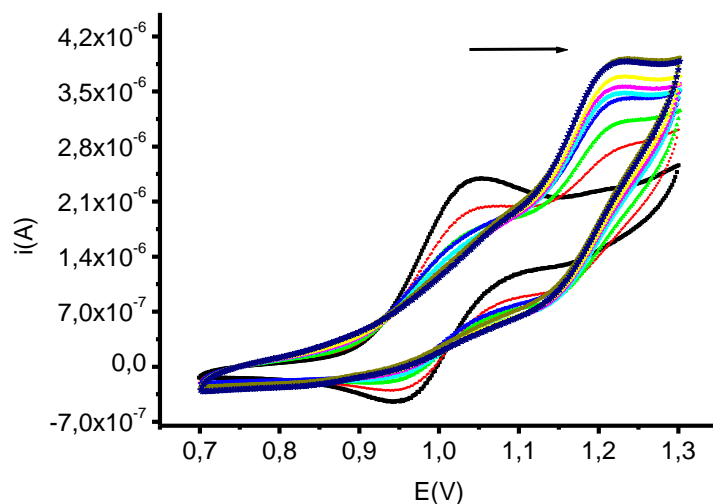


FIGURA 22. Fotólise acompanhada por voltametria cíclica do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(him)₂]²⁺ com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L⁻¹ de PTBA em acetonitrila.

4.2.13. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS RMN 1H.

Para avaliarmos as propriedades fotoquímicas dos isômeros **A** e **R** do complexo Ru-him foram realizados experimentos fotoquímicos acompanhados por espectroscopia de RMN de ¹H nos solventes CD₃CN e CD₃OD.

Na Figura 23 são mostrados os espectros de RMN de ¹H obtidos antes da fotólise e após uma irradiação de 40 min em CD₃CN com luz de 420 nm. A primeira comparação foi realizada na região do próton do anel imidazólico (figura 23A). Observa-se uma conversão do grupo H2a'(CH) somente para o isômero **R** (72%). Os sinais do grupo H2a(CH) para o isômero **A** (38%) permaneceram intactos. Após 30 minutos de irradiação a concentração do isômero **R** foi consumida sendo mantida em 27% da concentração inicial. Uma vez que

histamina livre é insolúvel em CD_3CN não identificamos sinais devido a labilização deste ligante, Entretanto observamos sinais a 9,77 ppm que correspondem ao íon complexo⁷² *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CD}_3\text{CN})_2]^{2+}$ (Figura 23B).

O acompanhamento da fotólise por RMN ^1H em solução de CD_3OD resultou em comportamento similar. Observou-se que somente o isômero **R** foi consumido. A Figura 24 mostra que após a irradiação de 40 minutos o sinal do isômero **R** em 6,75 ppm desaparece formando um sinal em 6,80 ppm característico dos prótons de histamina livre, enquanto que o sinal do isômero **A** permaneceu praticamente intacto. A concentração de histamina livre é equivalente ao consumo do complexo Ru-him, indicando que a fotossustituição foi quantitativa. Os quatro sinais na região de 6,4 a 6,6 ppm atribuídos aos dois isômeros conformacionais **A1** e **R1** em CD_3OD também foram totalmente consumidos durante a fotólise.

O rendimento quântico de formação de produto avaliado para a histamina liberada na fotólise do complexo Ru-him foi determinado para os solventes CD_3CN e CD_3OD com luz de 420 nm e o valor obtido foi de 0,13 para ambos os solventes.

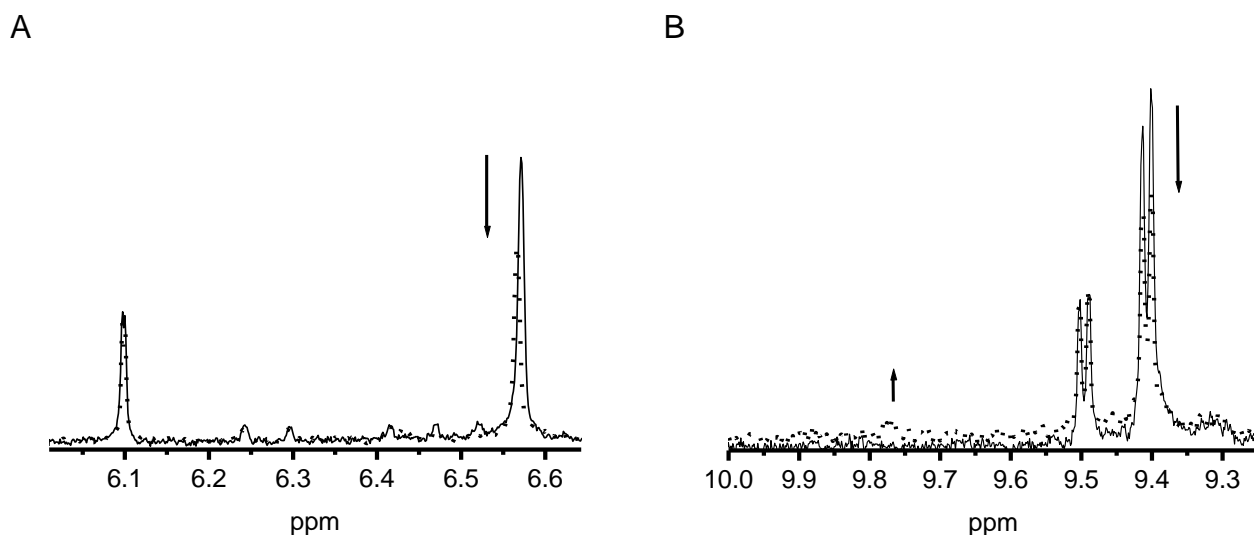


FIGURA 23. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him em CD_3CN antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 30 min A) região dos prótons do anel imidazólico B) região da fenantrolina.

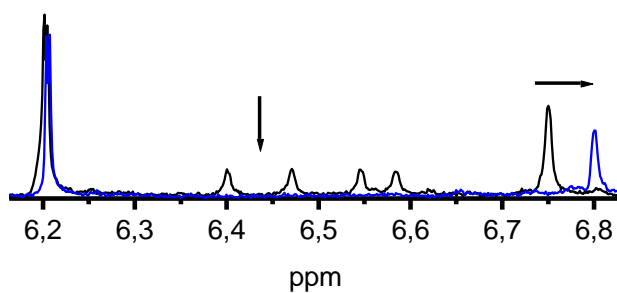


FIGURA 24. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-him em CD_3OD antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 40 min na região dos prótons do anel imidazólico.

4.2.14. FOTÓLISES CONTÍNUAS ACOMPANHADAS LUMINESCÊNCIA EM ACETONITRILA.

A fotólise do complexo Ru-him também foi monitorada pelas alterações nos espectros de emissão. Como mostrado na Figura 25 a intensidade de emissão diminui continuamente durante a fotólise. Como esperado o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺ não apresenta luminescência a temperatura ambiente.

Os resultados de fotólise contínua monitorada pelas técnicas espectroscópica (UV-vis, RMN de ¹H e de luminescência) e eletroquímica por voltametria cíclica indicam que a irradiação do complexo Ru-him com luz de 420 nm envolve a fotosubstituição dos dois ligantes histamina coordenados de acordo com as equações 1 e 2.

Estes resultados sugerem que a fotosubstituição da histamina resulta da população de um estado excitado dissociativo. Neste caso os estados excitados de MLCT e MC teriam energias muito próximas com população competitiva ou população térmica pelo estado excitado de menor energia. Em adição, histamina pode ser considerada um ligante de campo ligante fraco (pKa ~ 9,8)⁷³. Portanto, é esperado ser lábil em complexos de metais de transição que apresentam estado excitado de Ru(II)⁷⁴. A presença de um ligante doador de elétrons desestabiliza os estados excitados de MLCT os quais levam a um decréscimo no intervalo de energia entre os estados emissivos de ³MLCT e os estados excitados centrados no metal (³MC) dissociativos. Cabe salientar que os estados excitados ³MC são populados por caminhos térmicos em um número relativamente grande de complexos polipiridínicos de Ru(II). Os cálculos de DFT descritos anteriormente também mostraram a presença de estados singleto de MC e MLCT no complexo Ru-him abrindo a possibilidade de população dos estados tripleto de MC e MLCT durante a fotólise do complexo como observado experimentalmente.

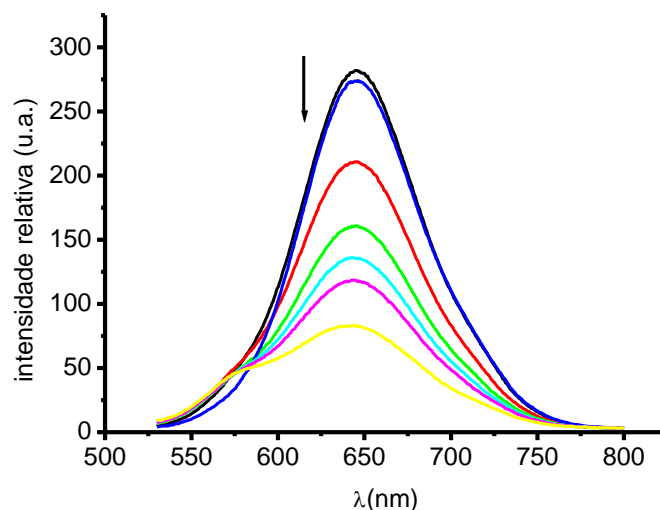
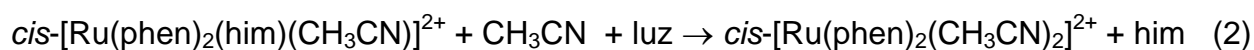
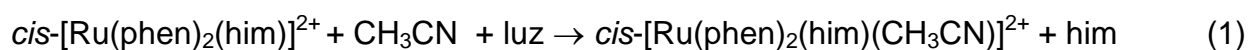


FIGURA 25. Fotólise contínua do complexo Ru-him com luz de 420 nm em CH₃CN acompanhado por emissão durante 25 minutos.

A irradiação contínua do complexo Ru-him com luz de 420 nm está associada a um processo dissociativo (equação 1 e 2).



4.2.15. EXPERIMENTOS FOTOQUÍMICOS EM SOLUÇÃO AQUOSA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE BSA.

A Figura 26 mostra o experimentos de fotólise contínua ($\lambda_{irr} = 420$ nm) do complexo Ru-him acompanhados por luminescência em água pura (Figura 26A) e em solução tampão (Tris HCl, pH 7.4) na presença de BSA (Figura 26B). Os resultados obtidos foram

similares: Observou-se uma diminuição contínua na intensidade de emissão do complexo a 640 nm revelando no final da fotólise um ombro a 580 nm.

Com base em resultados da literatura⁵², nas condições fisiológicas de pH o ligante histamine livre é encontrado principalmente na forma mono-cátion N1. Os experimentos fotoquímicos acompanhados por espectroscopia de RMN de ¹H em solvente prótico, discutidos anteriormente, também mostraram que o isômero **A** é mais sensível a fotólise do que o isômero **R**. Estas investigações sugerem que no pH 7,4 o máximo de emissão a 580 nm (Figura 26B) provavelmente corresponde ao isômero **A**.

Vale ressaltar que a presença do BSA não altera a fotosubstituição da histamina no complexo Ru-him.

Os resultados obtidos mostram que a supressão da luminescência do complexo Ru-him durante a liberação fotoquímica da histamina coordenada pode ser usada como sonda molecular dos sítios alvos da histamina bem como no controle do tempo e dose de histamina a ser liberada no meio fisiológico.

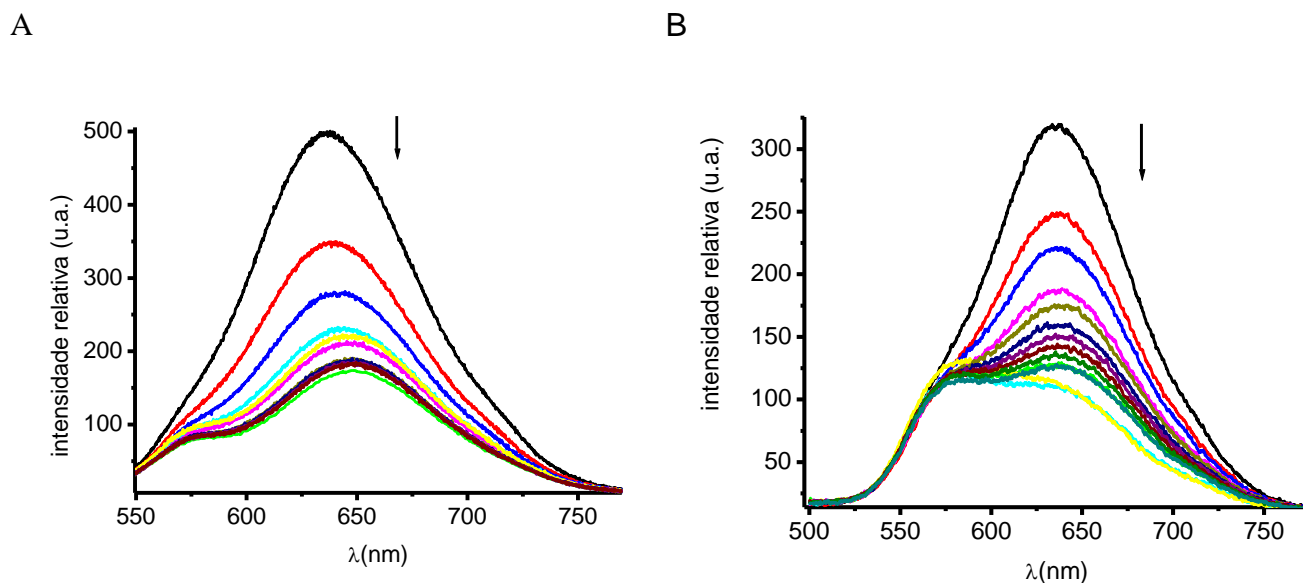


FIGURA 26. Fotólise contínua do complexo Ru-him com radiação de luz de 420 nm em A) água com 30 minutos de irradiação e em B) tampão tris/HCl na presença de BSA com 40 minutos de tempo de irradiação.

4.3. CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS PARA O COMPLEXO $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2]^{2+}$

4.3.1. CARACTERIZAÇÃO

A Figura 27 apresenta a estrutura do complexo Ru-4apy para a atribuição do espectro de RMN de ^1H . A Tabela 5 apresenta os valores de deslocamento químico e as constantes de acoplamento (J) para o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$. O espectro de RMN de ^1H do complexo Ru-4apy em CD_3CN apresentou dois dubletos devido aos prótons do anel da aminopiridina em 7,76 e 6,34 ppm e 1 singleto atribuído ao NH do grupo amina em 5,26 ppm (Figura 28).

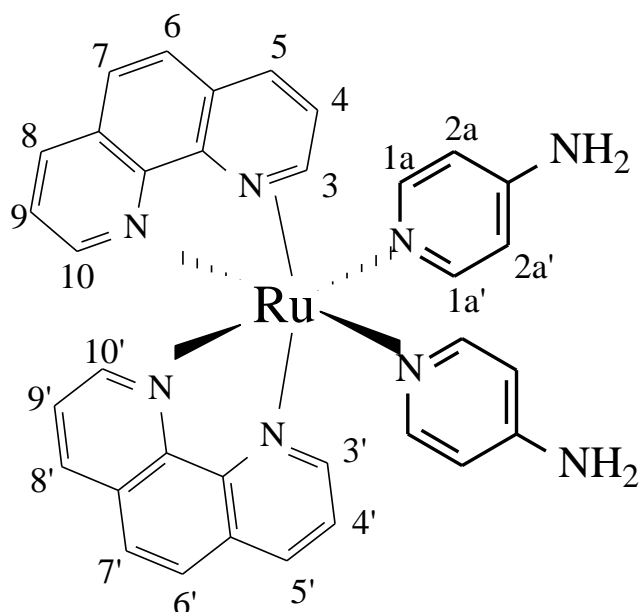


FIGURA 27. Estrutura do complexo Ru-4Apy com as respectivas numerações utilizadas na TABELA 6.

TABELA 5. Deslocamento químico de ^1H δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) dos prótons do complexo Ru-4-Apy em CD_3CN .

H	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)
3, 3'	9,35 (dd; 5,4/1,1)
4, 4'	8,09 (m)
5, 5'	8,67 (dd; 8,4/1,1)
6, 6'	8,15 (d; 8,9)
7, 7'	8,05 (d; 8,9)
8, 8'	8,32 (dd; 8,4/1,1)
9, 9'	7,42 (m)
10, 10'	7,94 (dd; 5,4/1,1)
1a, 1a'	7,76 (d; 7,0)
2b, 2b'	6,34 (d; 7,0)
N-H	5,26 (s)

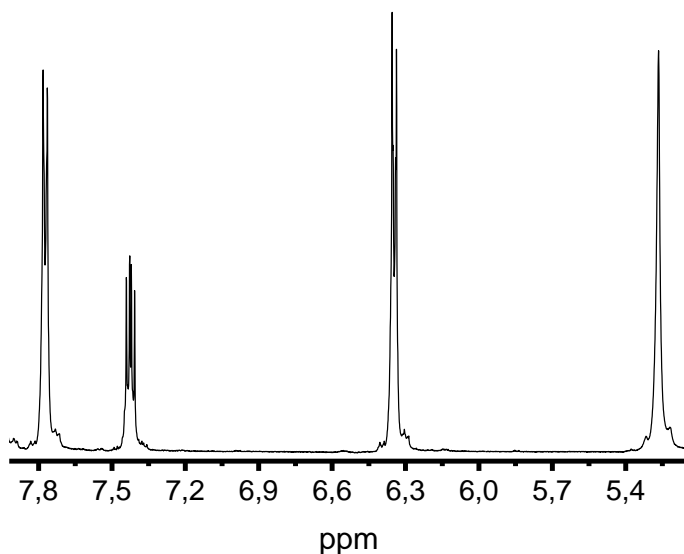


FIGURA 28. RMN de ^1H do complexo Ru-4apy em CD_3CN na região do ligante coordenado aminopiridina.

O espectro eletrônico do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$ na região do visível em acetonitrila é caracterizado por uma absorção intensa e larga em 482 nm ($\epsilon = 7600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) atribuída qualitativamente a duas transições de MLCT sobrepostas $d\pi(\text{Ru}(\text{II})) \rightarrow \text{phen}$ e $d\pi(\text{Ru}(\text{II})) \rightarrow 4\text{Apy}$ (Figura 29 A). As absorções presentes na região do ultravioleta são atribuídas qualitativamente a sobreposição das transições de transferência de carga interna do ligante (LLCT), fenantrolina \rightarrow fenantrolina ($\pi \rightarrow \pi^*$), 4Apy \rightarrow 4Apy ($\pi \rightarrow \pi^*$) e também as transições centradas no metal $\text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \text{Ru}(\text{II})$ ($d\pi \rightarrow d\pi^*$).

A Figura 29 B apresenta os espectros absorção no estado excitado do complexo Ru-4apy em acetonitrila com um pulso de excitação de 8 ns no comprimento de onda de 355 nm. Observa-se uma absorção negativa na região entre 400 a 550 nm com máximo aproximadamente em 500 nm (na mesma região da banda de MLCT observada no estado

fundamental) e duas absorções positivas com o máximo aproximadamente em 350 nm e 600 nm que são atribuídas ao ânion radicalar fenantrolina. A absorção negativa na mesma região da absorção no visível indica que os complexos no estado excitado retêm sua estrutura de estado fundamental sugerindo a formação do estado excitado de MLCT³ {Ru^{III}(phen^{•-})₂(4-Apy)₂}*. O espectro de absorção no estado excitado do complexo Ru-4-Apy é similar ao espectro de transiente do complexo [Ru(phen)₃]²⁺. Com esses dados podemos concluir que a banda larga de absorção no estado fundamental com o máximo na região de 450 nm é uma transição MLCT dπ(Ru(II) → phen.

Utilizando a técnica eletroquímica pelo método de voltametria cíclica, estudou-se os processos de oxidação e redução do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ em acetonitrila. O voltamograma cíclico apresentou um par redox em 0,84 /0,92 V referente ao par redox Ru (II/III). O valor de E_{1/2} obtido foi 0,88 V (Figura 29 C).

O complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4apy)₂](PF₆)₂ apresentou luminescência na região do visível. O espectro de emissão mostra uma banda bem definida com comprimento máximo de emissão em 635 nm em acetonitrila, quando foi excitado em 480 nm. O espectro de emissão foi independente do comprimento de onda de excitação entre 300 e 500 nm. A emissão foi verificada a temperatura de 77 K, em uma solução MeOH/ ETOH 4:1 e no estado sólido (Figura 29 D). Na temperatura de 77 K a emissão do complexo Ru-4apy apresentou dois picos de absorção com uma diferença entre eles de 1257 centímetros⁻¹ é semelhante aos picos do complexo [Ru(phen)₃]²⁺. O rendimento quântico de emissão obtido a temperatura ambiente em acetonitrila foi igual a 0,038.

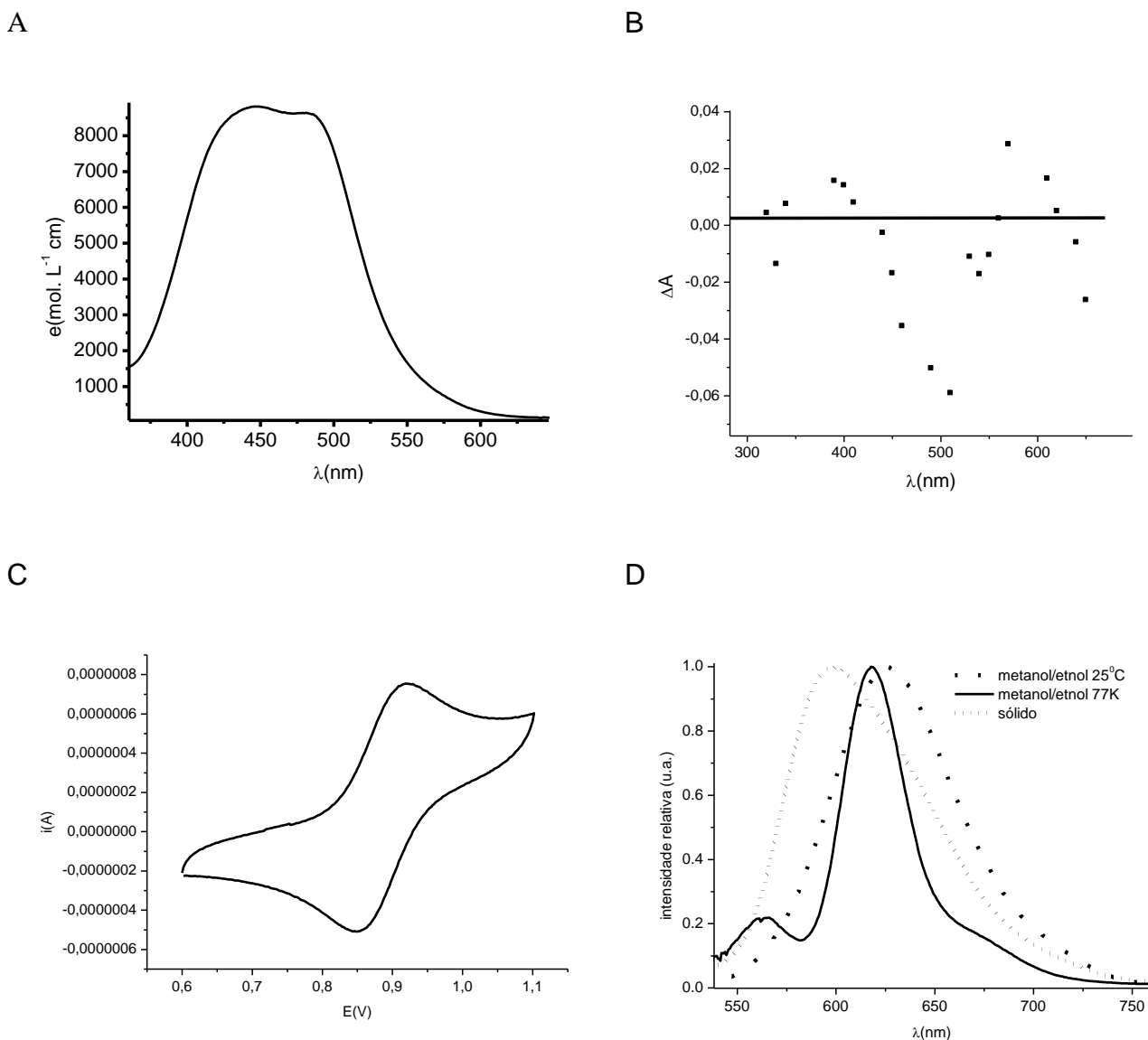


FIGURA 29. A) Espectro eletrônico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ na região do visível em CH₃CN, B) espectro de absorção no estado excitado do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ com $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ e concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, C) Voltamograma cíclico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ respectivamente com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de PTBA em acetonitrila, $v = 100 \text{ mV/s}$, D) espectro de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ respectivamente em solução metanol/etanol (4:1) a 25°C e 77K e no estado sólido.

4.3.2. ESTUDOS DE SUPRESSÃO

A interação do BSA com o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ e com o ligante 4-Apy foram analisadas pelo método de fluorescência. Nestes experimentos a emissão do BSA a 340 nm foi monitorada a várias concentrações de complexo ($2,5 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-5}$ M) (Figura 30). As mudanças na forma no comprimento de onda máximo de emissão do BSA foram insignificantes, indicando que a presença do complexo não provoca mudanças significativas na estrutura secundária da proteína. Não foi possível calcular o gráfico de Stern-Volmer (K_{SV}), a constante de velocidade de supressão (K_q) e o número de sítios ativos para este experimento devido ao efeito de filtro existente no experimento. Podemos dizer apenas que os resultados indicam que ocorre uma interação do complexo com BSA como esperado devido a diminuição da emissão do BSA pelo complexo Ru-4Apy.

A interação BSA com a 4apy livre também foi analisada por supressão da luminescência do BSA (Figura 31). Para a temperatura de 37 °C obteve-se os seguintes valores: $K_{SV} = 3,68 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$, $K_q = 5,92 \times 10^{11} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ e $K_a = 38,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Estes resultados mostram que a coordenação da 4-aminopiridina ao fragmento {Ru(phen)₂²⁺} aumenta a interação da 4apy com o BSA. Este fato é muito importante para nosso trabalho já que o nosso objetivo é aumentar o tempo de retenção da 4-aminopiridina no organismo.

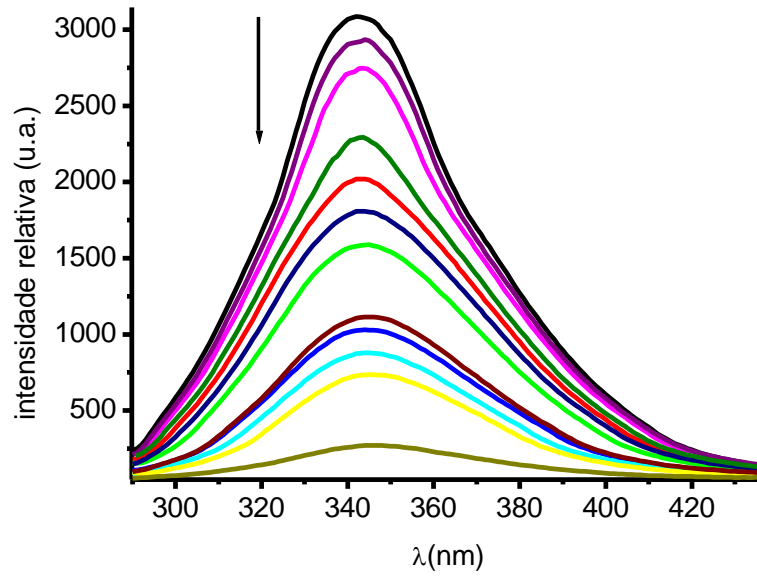


FIGURA 30. Supressão da emissão do BSA 0,15mg/ml pelo complexo Ru-4-Apy nas concentrações $2,5 \times 10^{-6}$ a 9×10^{-5} M - em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4. Insert o gráfico de Stern-Volmer do BSA-4-Apy em 37 graus.

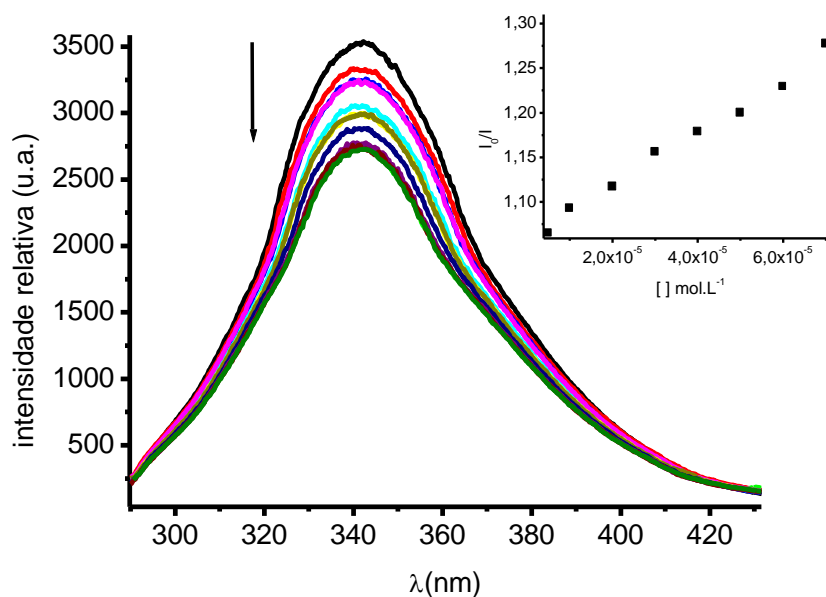


FIGURA 31. Supressão da emissão do BSA 0,15mg/ml pelo ligante 4-Apy nas concentrações $2,5 \times 10^{-6}$ a 9×10^{-5} mol.L⁻¹ a 37^oC em tampão tris/HCl 50mM pH 7,4.

4.3.3. ESTUDOS FOTOQUÍMICOS

A fotoquímica do complexo Ru-4apy com luz de 420 nm acompanhada por RMN ¹H em CD₃CN na região da 4-aminopiridina está apresentada na Figura 32. Podemos observar que depois de 30 minutos de fotólise os sinais dos prótons CH do anel da aminopiridina em 7,76 e 6,34 ppm e o sinal do próton do grupo amino em 5,26 ppm foram parcialmente consumidos com o aparecimento de um sinal alargado em 4,85 ppm que corresponde ao sinal do próton do grupo amino da 4-aminopiridina livre (Gráfico inserido na Figura 32). Os espectros de RMN de ¹H mostram também que após a fotólise os sinais dos prótons da fenantrolina deslocaram para um campo mais forte sendo que o sinal que

surge em 9,80 ppm corresponde ao próton mais ácido do complexo *cis*-Ru(phen)₂(CD₃CN)₂²⁺ (Figura 33). Estes resultados mostram ocorreu a labilização fotoquímica do ligante 4apy coordenado no complexo Ru-4apy. O rendimento quântico de consumo do complexo Ru-4apy foi de 0,22 em acetonitrila.

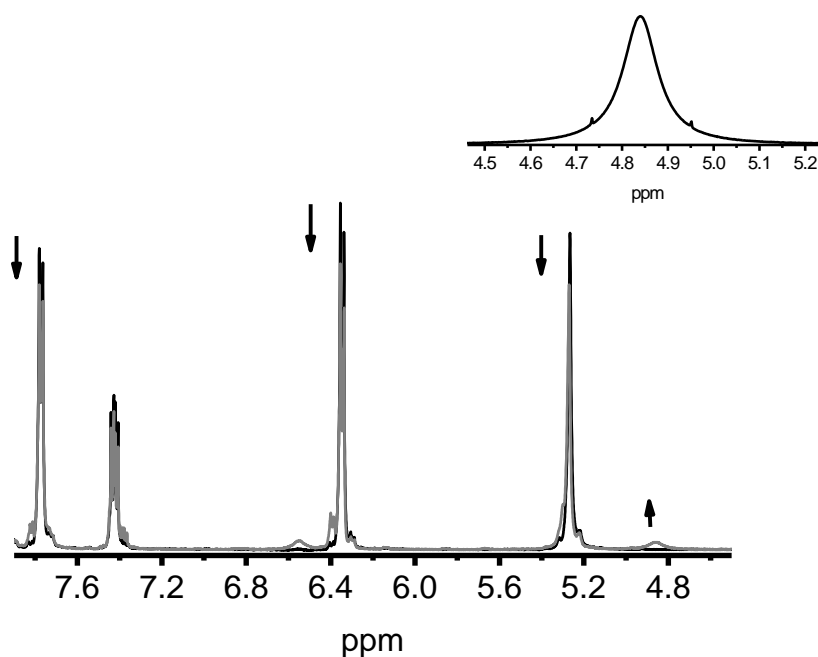


FIGURA 32. Espectro de RMN ¹H do complexo Ru-4apy em CD₃CN na região da 4-apy, antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 30 min.

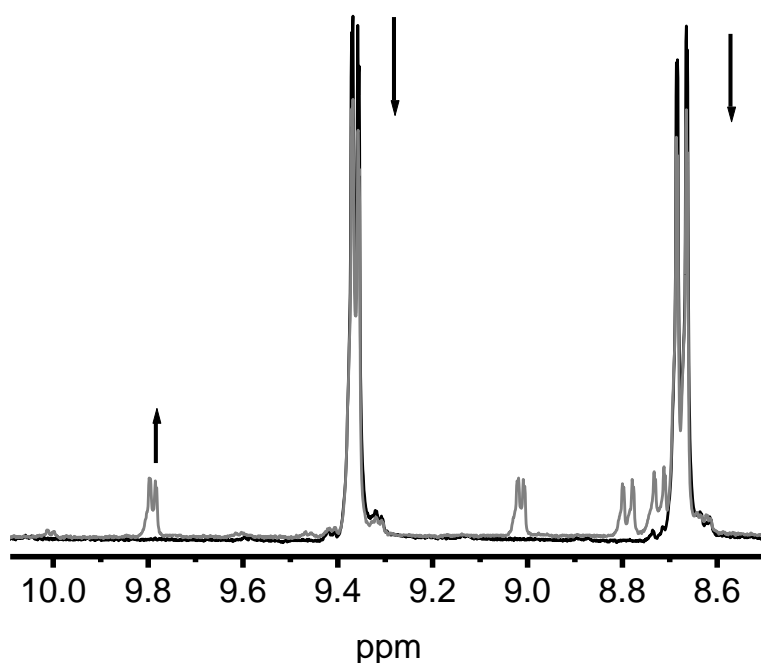


FIGURA 33. Espectro de RMN ^1H do complexo Ru-4apy em CD_3CN na região da fenantrolina, antes e depois da fotólise utilizando uma irradiação de 420 nm por 30 min.

A fotoquímica do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-apy})_2](\text{PF}_6)_2$ também foi acompanhada por espectroscopia (UV-vis e luminescência) e por voltametria cíclica (Figura 34).

A Figura 34A mostra que a fotólise em acetonitrila acompanhada por voltametria cíclica resulta no deslocamento do potencial redox inicial $E_{\text{ox}} = 1,08 \text{ V}$ e $E_{\text{red}} = 1,0$ para $E_{\text{ox}} = 1,27 \text{ V}$ e $E_{\text{red}} = 1,15 \text{ V}$, respectivamente. O novo par redox formado é concordante com os valores da literatura⁵³ para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$.

Nos experimentos de fotólise contínua acompanhados por UV-vis em acetonitrila observou-se um decaimento contínuo do máximo de absorção em 484 nm e o

aparecimento de uma absorção com máximo em torno de 420 nm típico da formação do complexo⁵³ *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺ (Figura 34B).

Os experimentos de fotólise contínua acompanhados por UV-vis realizados em meio aquoso não levaram a alterações significativas nos espectros de absorção eletrônica uma vez que o aquocomplexo formado apresenta absorções intensas na mesma região do complexo de partida.

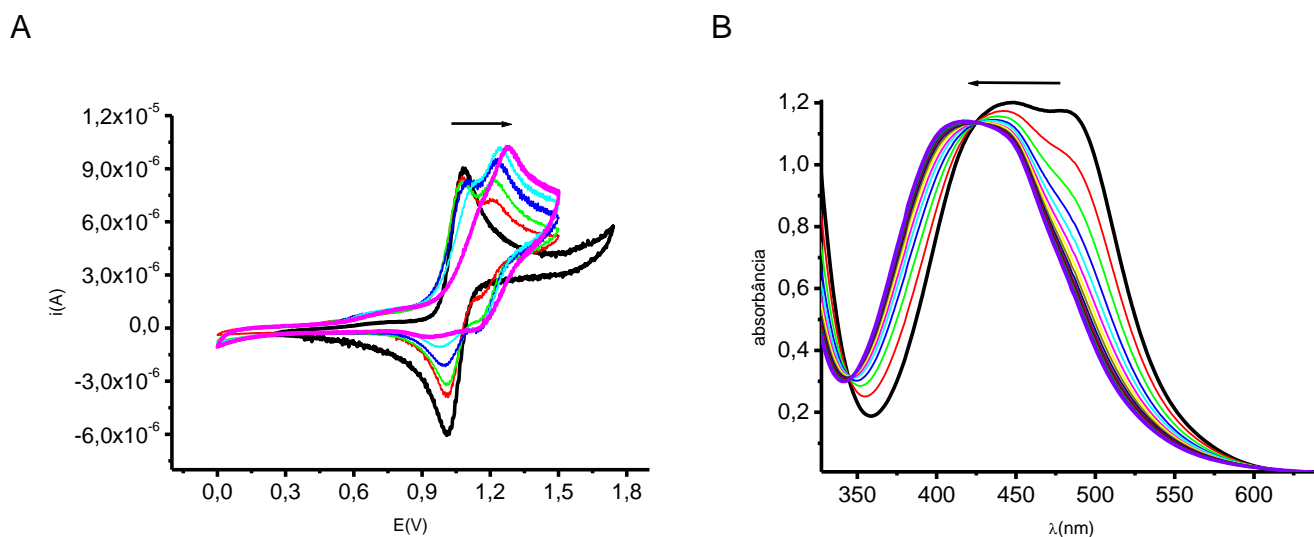


FIGURA 34. Fotólise do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(4-apy)₂](PF₆)₂ acompanhada por A) voltametria cíclica com eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L⁻¹ de PTBA em acetonitrila. B) UV-Vis na região do visível em acetonitrila.

4.4. EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE CITOTOXICIDADE

Foram feitos estudos preliminares de citotoxicidade em macrófagos J774-A1 para o complexo Ru-him. A Figura 35 mostra a viabilidade celular em (%) dos macrófagos na presença do complexo Ru-him nas concentrações: 2,5 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M e 15,0 μ M. Como podemos observar em nenhuma dessas concentrações houve alteração da viabilidade celular o que é um excelente resultado já que esta etapa é essencial para nosso candidato a fármaco. Investigamos também a citotoxicidade dos subprodutos da fotoquímica em meio aquoso do complexo Ru-him. Para este experimento usamos a concentração de 2,5 μ M de complexo a qual foi a mais próxima do controle (CT). A Figura 36 representa a viabilidade celular quando irradiamos com luz de 1,0 J/cm² com filtro na região de 400 – 600 nm no meio macrófago – complexo. Podemos observar que a fotoquímica não afetou os resultados de viabilidade celular dos macrófagos.

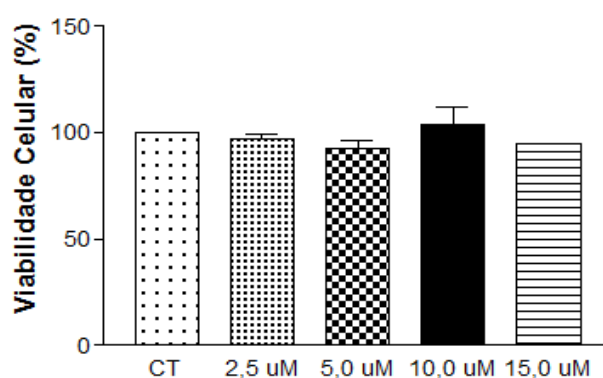


FIGURA 35. Viabilidade celular dos macrófagos J774-A1 na presença do complexo Ru-him nas concentrações de: 2,5 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M e 15,0 μ M.

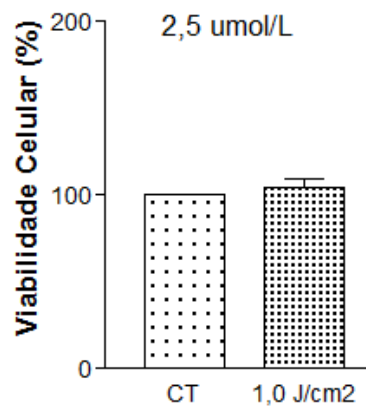


FIGURA 36. Viabilidade celular dos macrófagos J774-A1 na presença do complexo Ru-him depois da fotólise de 1,0J/cm².

5. CONCLUSÃO

Os complexos *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ são solúveis em água e apresentam absorção e emissão intensas na região do visível. Estes complexos são termicamente estáveis quando estocados no escuro por tempo indeterminado, tanto em solução aquosa como em solventes orgânicos. Entretanto, quando irradiados com luz visível são capazes de liberar o ligante doador-σ (him, 4-apy). A fotólise destes complexos podem ser acompanhadas pela diminuição contínua dos máximos de emissão.

Os experimentos de supressão da luminescência do BSA com o aumento da concentração do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(L)₂]²⁺ mostram que a viabilidade celular dos candidatos a fármacos histamina e 4-aminopiridina aumentam significativamente pela coordenação ao fragmento metálico {Ru(phen)₂}²⁺. Apesar de preliminares os resultados de citotoxicidade obtidos até o momento como macrófagos J774-A1 mostraram que o complexo não apresenta toxicidade a este tipo de célula no escuro bem como na presença de luz visível.

Estas características são bastante atrativas para o possível uso destes complexos no tecido humano. Os resultados obtidos mostram também que estes complexos são candidatos promissores para atuarem como sistema de entrega fotoquímica mais efetiva destes fármacos aos alvos específicos do sistema fisiológico. Isto porque a perda da luminescência destes complexos com a irradiação permite localizar a região a ser entregue o fármaco e seletivamente controlar a dose do fármaco a ser liberado. Estes resultados são importantes também quando consideramos a intolerância da histamina livre em determinadas concentrações no meio fisiológico¹⁹ e a alta toxicidade da 4-aminopiridina uma vez que a dose máxima permitida não tóxica é insuficiente para produzir o máximo recobrimento benéfico²³.

6. REFERÊNCIAS

1. FORLENZA, O. V.; Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer; Revista de Psiquiatria Clínica, 2005, 1-14.
2. AlzheimerMed, Informação e Solidariedade; disponível no site: http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1011.
3. BARTUS RT, DEAN RL III, BEER B, LIPPA AS; The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction; Science 1982, 217:408-414.
4. WITT A, MACDONALD N, KIRKPATRICK P; Memantine hydrochloride; Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3:109-110.
5. LUNDH, H.; NILSSON, O.; ROSEN, I.; Treatment of Lambert-Eaton syndrome: 3,4-diaminopyridine and pyridostigmine; *Neurology* ; 1984, 34, 1324-1330.
6. CARLSSON, C.; ROSEN, I.; NILSSON, E.; *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 1993, 27, 87-90.
7. SCHWID, S. R.; PETRIE, M. D.; MCDERMOTT, M. P.; TIERNEY, D. H.; MASO, D. H.; Goodman, A. D.; Quantitative assessment of sustained-release 4-aminopyridine for symptomatic treatment of multiple sclerosis; *Neurology*, 1997, 48, 817-821.
8. MCEVOY, K. M.; WINDEBANK, N.; DAUBE, J. R.; LOW, P. A.; 3,4-Diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome; *Engl. J. Med.* 1989, 321, 1567-1571.
9. SEGAL, J. L.; BRUNNEM, S. R.; 4-Aminopyridine improves pulmonary function in quadriplegic humans with longstanding spinal cord injury; *Pharmacotherapy* 1997, 17, 415-423.
10. SELLIN, L. C. The action of botulinum toxin at the neuromuscular junction; *Med. Biol.*; 1981, 59, 11-20.

11. DAVIDSON, M.; ZEMISHLANY, J. H.; MOHS, R. C.; 4-Aminopyridine in the treatment of alzheimer's disease; *Biol. Psychiatry* 1988, 23, 485-490.
12. SMITH, D. T.; SHI, R.; BORGENS, R. B.; MCBRIDE, J. M.; JACKSON, K.; BYM, S. R.; Development of novel 4-aminopyridine derivatives as potential treatments for neurological injury and disease; *Eur. J. Med. Chem.* 2005, 40, 908-917.
13. Dado disponível no site: <http://www.acorda.com/pipeline.asp>
14. YANAI, K., TASHIRO, M.; The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies; *Pharmacology & Therapeutics* 113 (2007) 1–15.
15. AIRAKSINEN, M. S., PAETAU, A., PALJARVI, L., REINIKAINEN, K., RIEKKINEN, P., SUOMALAINEN, R., *et al.* Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains; *Neuroscience*; 1991; 44(2), 465–481.
16. PANULA, P., YANG, H. Y., & COSTA, E.; Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus; 1984, 81(8), 2572-2576.
17. MAINTZ, L.; NOVAK, N.; histamine and histamine intolerance; *The american journal of clinical nutrition*, 2007, 1185 - 1196
18. HIGUCHI, M., YANAI, K., OKAMURA, N., MEGURO, K., ARAI, H., ITOH, M., *et al.* Histamine H1 receptors in patients with Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography. *Neuroscience*, 2000, 99(4), 721-729.
19. TIMERBAEV, A. R.; HARTINGER, C. G.; ALEKSENKO, S. S.; KEPPLER, B. K.; Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology; *Chem Rev.* 2006, 106, 2224-2248.
20. KIRSCH, G. E.; NARAHASHI, T.; 3,4-Diaminopyridine a Potent New Potassium Channel Blocker; *Biophys. J.*, 1978, 22, 507-512.

21. MOLGÓ, J.; LEMEIGNAM, M.; PERADEJORDI, F.; LECHAT, P. J.; Effects presynaptiques des aminopyridines a la juntion neuromusculaire de vertébrés; *Pharmacol.* 1985, 16, 109-144.
22. CARLSSOM, C.; ROSEN, I.; NILSSON, E.; Can 4-aminopyridine be used to reverse anaesthesia and muscle relaxation; *Acta Anaesth Scand.* 1993, 27, 87- 90
23. HAYES, K. C.; The use of 4-aminopyridine (fampridine) in demyelinating disorders; *Drug Rev.* 2004, 10, 295-316.
24. HAYES, K. C.; KATZ, M.A.; Pharmacokinetics of an Immediate-Release Oral Formulation of Fampridine (4-Aminopyridine) in Normal Subjects and Patients with Spinal Cord Injury; *J. Clin. Pharmacol.* 2003, 43, 379-385.
25. HAYES, K. C.; POTTER, P. J.; HANSEBOUT, R. R.; Pharmacokinetic Studies of Single and Multiple Oral Doses of Fampridine-SR (Sustained-Release 4-Aminopyridine) in Patients With Chronic Spinal Cord Injury; *Clin. Neuropharmacol.* 2003, 26, 185-192.
26. DAVIDSON, M.; ZEMISHLANY, H. J. MOHS, R. C.; HORWATH, T. B.; POWCHIK, P.; BLASS, J. P.; DAVIS, K. L.; 4-Aminopyridine in the treatment of alzheimer's disease, *Biol. Psychiat*, 1988, 23, 485-490.
27. WICKELGREN, I.; Animal Studies Raise Hopes for Spinal Cord Repair; *Science*, 2000, 178-181.
28. CLARKE, M. J.; Ruthenium metallopharmaceuticals Coord.; *Chem. Rev.*, 2003, 236, 209.
29. ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects; *Platinum Met. Rev.*, 2001, 45, 62-69.
30. JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K.; Antitumour metal compounds: more than theme and variations; *Dalton Trans.*, 2008, 2, 183–194.

31. BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A.; *Neurociências, desvendando o sistema nervoso*, 2ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2002.
32. SHEPHERD, G. M.; *Neurobiology*; Oxford University Press, Oxford, 1994.
33. LIPPARD, S.J.; BERG, J. M.; *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994.
34. COWAN, J. A.; *Inorganic Biochemistry an Introduction*, 2nd Ed.; Wiley-VCH, New York, 1997.
35. CARTER, D. C.; HO, J. X. Atomic structure and chemistry of human serum albumin; *Adv. Protein Chem.* 1994, 45, 153.
36. ANDREI R. TIMERBAEV, *et al*, Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology; *Chem. Rev.* 2006, 106, 2224-2248.
37. PETER, T. Serum Albumin.; *AdV. Protein Chem.* 1985, 37, 161-245.
38. LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 1999; 698 pp.
39. HONG GAO, *et al*, The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 167, 2004, 213-221.
40. Antonio Otávio de Toledo; Complexos de rênio (I) e filmes de TiO₂ em dispositivos moleculares fotoinduzidos; 2009, pp.60.
41. CASPAR, J. V.; MEYER, T. J.; Photochemistry of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) ion (Ru(bpy)₃²⁺). Solvent effects; *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 5583-5590.
42. CALVERT, J. G.; PITTS, J. N.; *Photochemistry*. 2. ed. New York: Wiley, 1967. p. 779-789.
43. RABEK, J. F. *Experimental methods in photochemistry and photophysics*. New York: John Wiley, 1982. p. 944-951.

44. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A., JR.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; 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.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; ALLAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. *Gaussian 03*, revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

45. KOHN, W.; SHAM, L.; Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, v. 140, p. A1133-A1138, 1965.

46. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G.; Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review*, v. B 37, p. 785-789, 1988.

47. BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

48. HAY, P. J.; WADT, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg; *J. Chem. Phys.* 1985, 82, 270-283.

49. WADT, W. R.; HAY, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi; *J. Chem. Phys.* 1985, 82, 284-298.
50. HAY, P. J.; WADT, W. R.; Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals; *J. Chem. Phys.* 1985, 82, 299-310.
51. RACZYNSKA E. D., *et al.*; Ab initio study of tautomerism and of basicity center preference in histamine, from gas phase to solution - comparison with experimental data (gas phase, solution, solid state). *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2003, 783-796.
52. KRASZNI M; KÖKÖSI J.; NOSZÁL B.; Concentration and basicity of histamine rotamers; *The Royal Society of Chemistry*, 2002, 914-917.
53. STEEL, P. J.; LAHOUSE, F.; LERNER, D.; MARZIN, C.; New ruthenium(II) complexes with pyridylpyrazole ligands. Photosubstitution and proton, carbon-13, and ruthenium-99 NMR structural studies; *Inorg. Chem.*, 22, 1983, 1488.
54. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A.; *Análise Instrumental*, 5a ed., Editora Bookman, São Paulo, 2002.
55. KALYANASUNDARAM K.; *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*; Academic Press, 1a ed., 1992, cap. 33.
56. BANDYOPADHYAY, B.N., HARRIMAN, A., Photoreduction of 1,10-phenanthroline, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, v.73, p.663-674, 1977.
57. CREUTZ, C.; CHOU, M.; NETZEL, T.L.; OKUMURA, M.; SUTIN, N.; Lifetimes, spectra, and quenching of the excited states of polypyridine complexes of iron(II), ruthenium(II), and osmium(II); *Journal of the American Chemistry Society*, v. 102, p. 1309-1319, 1980.
58. MALONEY, D. J.; MACDONNELL, F. M.; A three-dimensional net of tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) in the dual-metal self-assembly of bis[tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II)]tetrakisothiocyanatoiron(II) bis(perchlorate); *Acta Cryst.* 1997, C53, 705-707.

59. ZHENG, K. C.; WANG, J. P.; SHEN, Y.; PENG, W. L.; YUN, F. C.; Studies on electronic structures and related properties of complexes $M(\text{tap})_3^{2+}$ ($M = \text{Fe}, \text{Ru}, \text{Os}$) by the DFT method; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*; 2002, 111-116.
60. RILLEMA, D.P.; ALLEN, G.; MEYER, T.J.; CONRAD, D.; Redox properties of ruthenium(II) tris chelate complexes containing the ligands 2,2'-bipyrazine, 2,2'-bipyridine, and 2,2'-bipyrimidine; *Inorg. Chem.* 1983, 22, 1617.
61. YANG, X-J; JANIAC, C.; HEINZE, J.; DREPPER, F.; MAYER, P.; PIOTROWSKI, H.; KLUFERS, P.; Re-examination of the formation of dinitrosyl-iron complexes during reaction of S-nitrosothiols with Fe(II); *Inorg. Chim. Acta*, 2001, 318, 1-7.
62. SHINOZAKI, K.; SHINOYAMA, T.; Substituent effect on the nonradiative decay rates from 3MLCT excited state of ruthenium(II) complexes: A quantum chemical treatment *Chem.; Phys Lett.* 2006, 417, 111-115.
63. WAYNE R. P.; Principles and Applications of Photochemistry; Oxford University Press, New York, 1988, pp 76-78.
64. VILLEGAS, J. M.; STOYANOV, S. R.; RILLEMA, D. P.; Synthesis and Photochemistry of Ru(II) Complexes Containing Phenanthroline-Based Ligands with Fused Pyrrole Rings; *Inorg. Chem.* 2002,41, 6688-6694.
65. TYSON, D. S.; LUMAN, C. R.; ZHOU, X. L.; CASTELLANO, F. N.; New Ru(II) Chromophores with Extended Excited-State Lifetimes; *Inorg. Chem.* 2001, 40, 4063-4071.
66. MCGEE, K. A.; MANN, K. R.; Inefficient Crystal Packing in Chiral $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$ Enables Oxygen Molecule Quenching of the Solid-State MLCT Emission; *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 1896-1902.
67. TRYNDA-LEMIESZ, L.; KARACZYN, A.; KEPPLER, B. K.; KOZLOWSKI, H.; Studies on the interactions between human serum albumin and trans-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate(III); *J. Inorg. Biochem.* 2000, 78, 341-346.

68. PICCIOLI, F.; SABATINI, S.; MESSORI, L.; ORIOLI, P.; HARTINGER, CH. C.; KEPPLER, B. K.; A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl₄(Ind)₂] and serum proteins; *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 1135-1142.
69. ASCONE, I.; MESSORI, L.; CASINI, A.; GABBIANI, C.; BALERNA, QA.; DELL'UNTO, F.; CASTELLANO, A. C.; Exploiting Soft and Hard X-Ray Absorption Spectroscopy to Characterize Metallodrug/Protein Interactions: the Binding of [trans-RuCl₄(Im)(dimethylsulfoxide)][ImH] (Im = imidazole) to Bovine Serum Albumin; *Inorg. Chem.* 2008, 47, 8629-8634.
70. DAVIES, C. L.; DUX, E. L.; DUHME-KLAIR, A. K. *Supramolecular interactions between functional metal complexes and proteins*; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2009, 46, 10141-10154.
71. BONNISON, P.; WALSH, J. L.; PENNINGTON, W. T.; CORDES, A. W.; DURHAM, B.; Six-coordinate complexes with 1,10-phenanthroline ligands in the trans configuration. Preparation of trans-bis(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) complexes and crystal structure of trans-bis(1,10-phenanthroline)bis(pyridine)ruthenium(II) hexafluorophosphate; *Inorg. Chem.* 1983, 22, 1761-1765.
72. WATSON, R. T.; JACKSON, J. L.; HARPER, J. D.; KANEMAGUIRE, K. A.; KANEMAGUIRE, L. A. P.; KANEMAGUIRE, N. A. P.; The resolution of *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺ (phen = 1,10-phenanthroline), and its use in the synthesis of chiral *cis*-[Ru(phen)₂X₂]ⁿ⁺ species (n = 0, 2; X = CN⁻, Cl⁻, py); *Inorg. Chim. Acta*, 249, 1996, 5-7.
73. DE ABREU, H. A.; DE ALMEIDA, W. B.; DUARTE, H. A.; pKa calculation of poliprotic acid: histamine; *Chem. Phys. Lett.* 2004, 383, 47-52.
74. DURHAM, B.; WALSH, J. L.; CARTER, C. L.; MEYER, T. J. Synthetic applications of photosubstitution reactions of poly(pyridyl) complexes of ruthenium(II) T. J. *Inorg. Chem.* 1980, 19, 860-865.

7. ANEXOS

ANEXO A1 - ALGUNS ASPECTOS SOBRE AS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS

Uma série de transições eletrônicas tais como as transições centradas no metal (MC, $\pi_M (t_{2g}) \rightarrow \sigma_M (eg)$), internas do ligante ($L_{\pi} \rightarrow L_{\pi^*}$), transferência de carga metal para ligante (MLCT, $d_{t_{2g}} \rightarrow L_{\pi^*}$), transferência de carga ligante para metal (LMCT, $L_{\pi} \rightarrow d_{t_{2g}}$) podem ser observadas nos complexos de metais de transição. Em geral, a labilidade cinética e termodinâmica, as características redox, a solubilidade e as propriedades fotoquímicas e fotofísicas desses compostos podem ser modificadas pela escolha de ligantes específicos que alterem a densidade eletrônica do centro metálico e, assim, suas propriedades químicas, físicas e, conseqüentemente, a dinâmica dos estados excitados¹.

A Figura 1 ilustra, de forma simplificada, o diagrama de orbitais moleculares de um complexo de rutênio (II) e suas possíveis transições.

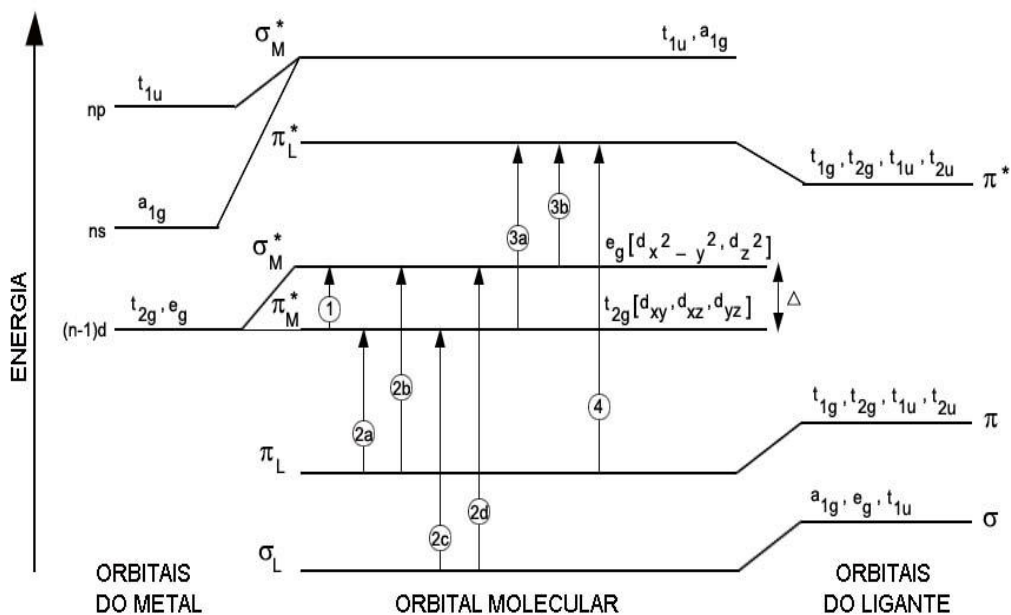


FIGURA 1. Diagrama de energia com todas as transições eletrônicas em complexos octaédricos. (1) transição centrada no metal, (2a, 2b, 2c, 2d) transição de transferência de carga ligante-metal (LMCT), 3a, 3b: transição de transferência de carga metal-ligante (MLCT), 4: transferência de carga interna do ligante (IL).

(1) TRANSIÇÕES CENTRADA NO METAL (MC)

É observada entre níveis energéticos localizados no metal. Em um átomo livre, todos os cinco orbitais d estão degenerados. Quando os seis ligantes se aproximam do metal os orbitais d perdem sua degenerescência desdobrando em dois conjuntos de orbitais: o primeiro triplamente degenerado constituído pelos orbitais d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} (t_{2g}), e o segundo duplamente degenerado constituído pelos orbitais $d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2} (e_g). A energia necessária para promover um elétron do conjunto de orbitais t_{2g} para os orbitais e_g é representada por Δ ou $10Dq$. O valor desta energia é dependente da natureza do metal e

do ligante. As medidas espectroscópicas do parâmetro de desdobramento do campo ligante $10Dq$, permitem ordenar os ligantes segundo a magnitude do desdobramento que induzem em um dado íon metálico.

Com base nessas observações, os ligantes foram ordenados em uma série denominada série espectroquímica. Nesta série os ligantes são arranjados de acordo com a sua capacidade de promover o desdobramento dos orbitais “d”, do centro metálico, na formação do íon complexo, $[ML_6]^{n+}$: $I^- < Br^- < S^{2-} < SCN^-$, $Cl^- < NO_3^- < N_3^- < F^- < OH^- < C_2O_4^{2-} < H_2O < NCS^- < CH_3CN < py < SO_3^{2-} < NH_3 < PPh_3 < CN^- < CO$.

(2A, 2B, 2C, 2D) TRANSIÇÕES DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA DO LIGANTE PARA O METAL (LMCT)

Nesse tipo de transferências os ligantes devem ser altamente redutores, tais como os halogênios e o metal deverá ter orbitais d vazios para receber os elétrons. As bandas de transferência de carga podem ser influenciadas pelo centro metálico, ligantes e o meio reacional. Temos as 4 transições possíveis para um complexo octaédrico.

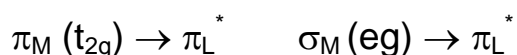


Os orbitais moleculares π_L e σ_L são constituídos principalmente por orbitais dos ligantes e os orbitais moleculares $\pi_M (t_{2g})$ e $\sigma_M (eg)$ são constituídos principalmente por orbitais do metal. Para os complexos octaédricos d^0 de baixo spin, as transições $\pi_L \rightarrow \pi_M (t_{2g})$ e $\sigma_L \rightarrow \pi_M (t_{2g})$ não vão ocorrer porque os orbitais t_{2g} estão preenchidos, logo teremos apenas duas possíveis transições $\pi_L \rightarrow \sigma_M (eg)$ e $\sigma_L \rightarrow \sigma_M (eg)$ LMCT.

(3A, 3B) TRANSIÇÕES DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA DO METAL PARA O LIGANTE (MLCT)

Nessas transições pode-se esperar que, quanto mais fácil reduzido o metal e oxidado o ligante, menor será a diferença em energia entre os orbitais doadores e receptores, e a absorção no espectro eletrônico irá se deslocar para maiores comprimentos de ondas.

As transições de transferência de carga metal-ligante (MLCT) envolvem a excitação de um elétron de um orbital molecular do “metal” para um orbital molecular do “ligante”. Para que esta transição ocorra é necessário que o complexo contenha ligantes π receptores, ou seja, os ligantes devem ter orbitais π vazios ou incompletos para receber os elétrons vindos do metal. As duas transições possíveis para um complexo octaédrico ocorrem entre os orbitais t_{2g} e e_g do “metal” para os orbitais vazios π^* dos “ligantes”.



(4) TRANSIÇÕES DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA INTERNA DO LIGANTE (IL)

É semelhante às transições observadas nos ligantes insaturados não coordenados. Por exemplo, os ligantes aromáticos N-heterocíclicos, não coordenados, geralmente apresentam, na região do ultravioleta próximo e médio, bandas de transições eletrônicas atribuídas a $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Estas transições ocorrem em regiões de maior comprimento de onda e são de alta intensidade.

ANEXO A2 – UMA BREVE EXPLICAÇÃO SOBRE OS PROCESSOS FOTOQUÍMICOS E FOTOFÍSICOS

Os níveis de energia vibracionais e rotacionais de uma molécula são muito próximos em energia, já os níveis eletrônicos podem apresentar diferenças de energia muito grandes. Estes últimos podem ser alcançados pela absorção de luz. A fotoquímica usa estas diferenças de energia entre os estados excitados eletronicamente para produzir moléculas altamente energéticas, que podem ultrapassar a barreira de ativação de A para P com menor gasto energético e, assim, levar a reações específicas e seletivas, que muitas vezes, não ocorrem pelos caminhos térmicos (Figura 2).

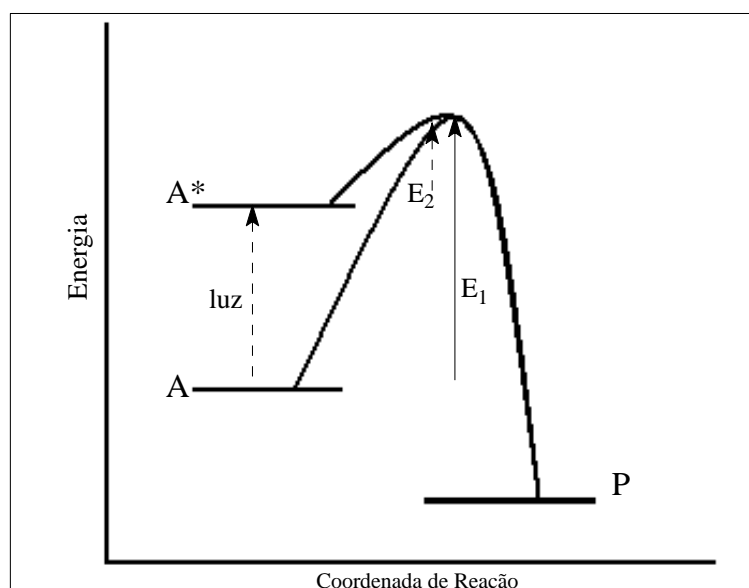


FIGURA 2. Transformação térmica de A para P com energia de ativação E_1 e transformação fotoquímica de A para P com energia de ativação E_2 sendo $E_2 < E_1$.

A população de um estado excitado leva à formação de A^* , cuja energia e geometria podem diferir significativamente daquela observada no estado fundamental^{2,3,4}. Uma vez que estas diferenças refletem diretamente na reatividade do estado excitado

alcançado, a molécula em seu estado excitado passa a apresentar propriedades químicas e físicas, muitas vezes, diferentes das observadas no estado fundamental. Entre essas propriedades, a energia, a geometria molecular, a polarizabilidade, os momentos magnéticos e de dipolos, as propriedades redox e de ácido-base podem ser alteradas quando passamos do estado fundamental para o estado excitado ^{3,4}.

Neste contexto, após a população de um dos seus estados excitados, a molécula excitada "A*" pode dissipar seu excesso de energia eletrônica retornando ao estado fundamental por processos de desativação fotofísicos e/ou processos de desativação fotoquímicos (reação química), k_p . Os processos de desativação fotofísicos podem ser divididos em radiativos, k_r , como fluorescência ou fosforescência, e não radiativos, k_n , conversão interna e cruzamento entre sistemas.

Os processos fotofísicos e fotoquímicos podem ser melhor representados em um esquema denominado diagrama de Jablonsky (Figura 3). Uma substância no estado fundamental (S_0), quando excitada ao primeiro estado singlete (S_1) geralmente segue quatro caminhos de desativação: (1) decaimento não radiativo, (2) reação química originando uma outra espécie no estado fundamental, (3) emissão de fluorescência ou (4) cruzamento intersistemas para o mais baixo estado tripleto (T_1). O estado tripleto gerado pode voltar ao estado fundamental também por decaimento não radiativo, ou emitir fluorescência, ou ter reação química com formação de outra espécie no estado fundamental.

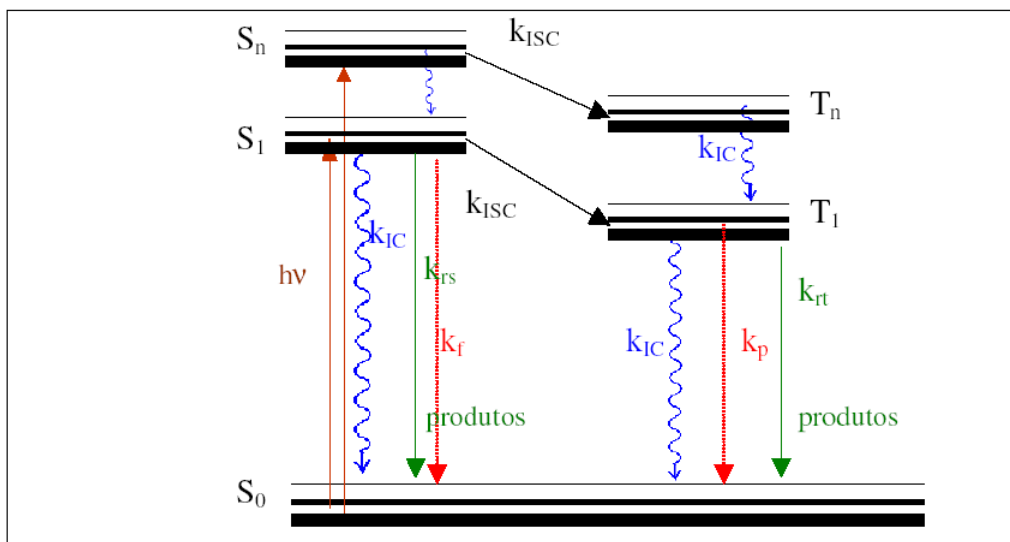


FIGURA 3. Diagrama de Jablonsky. $h\nu$ = absorção, k_{IC} = decaimento não radiativo, k_f = decaimento radiativo (fluorescência), k_{RS} = reação fotoquímica a partir do estado singlete excitado, k_{ISC} = conversão intersistema, k_p = decaimento radiativo (fosforescência) e k_{rt} = reação fotoquímica a partir do estado triplete excitado.

Para se efetuar um estudo quantitativo de uma reação fotoquímica, são necessárias as seguintes medidas experimentais: intensidade da luz absorvida, quantidade e identificação dos produtos da reação e valores de decaimento de emissão ou absorção dos vários estados excitados alcançados.

O rendimento quântico para a formação de produtos^{3,4} (ϕ_p) descreve o número de moléculas de produto formado (ou reagente consumido) relativo à intensidade de luz absorvida no estado reativo, isto é, à eficiência de uma reação fotoquímica (equação 1):

$$\phi_p = \frac{\text{número de moléculas produzidas (ou consumidas)}}{\text{intensidade da luz absorvida}}$$

A fotorreação dos complexos de metais de transição podem ocorrer por diferentes caminhos: fotossustituição, isomerização, oxi-redução, transferência de elétrons e transferência de energia. Frequentemente observa-se que os processos de fotossustituição são induzidos pela irradiação na banda d-d (centrada no metal). Uma transição “d-d” promove a redistribuição de carga entre os orbitais “d” do metal ^{5,6}. Em um complexo octaédrico a excitação na banda de campo ligante leva à promoção de um elétron de um dos orbitais t_{2g} (dxz , dyz , dxy) que estão direcionados entre os eixos cartesianos do octaédro para um orbital e_g (dx^2-y^2 , dz^2), que estão direcionados para os eixos cartesianos, ou seja, diretamente posicionados para os ligantes coordenados ao metal central (Figura 4).

Esta alteração na distribuição eletrônica pode resultar em modificações substanciais tanto nas propriedades químicas como físicas do complexo de metal de transição. Por exemplo, a população dos orbitais “ e_g ”, induz à reorganização da esfera de coordenação podendo induzir um alongamento da ligação M-L e seu enfraquecimento levando à dissociação dos ligantes, ou ao ataque nucleofílico da esfera de coordenação.

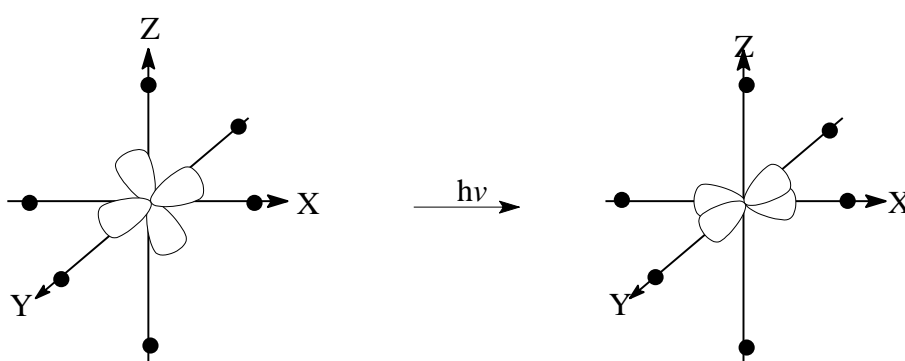


FIGURA 4. Arranjo octaédrico dos ligantes ao redor de um íon metálico antes e depois da irradiação de luz.

8. BIBLIOGRAFIA

1. GREY, J. K.; BUTLER, I. S.; Effects of high external pressures on the electronic spectra of coordination compounds *Coord.; Chem. Rev.* 2001, 219, 713.
2. WAYNE, R.P.; Em *Principles and Applications of Photochemistry* Oxford University, Press Oxford, 1997, pg 5.
3. BALZANI, V.; MOGGI, L.; MANFRIM, M.F.; BOLLETA, F.; Quenching and sensitization processes of coordination compounds *Coord.; Chem. Rev.* 1975, 15, 321-433.
4. FERRAUDI, G.J.; Em *Elements of Inorganic Photochemistry* Willey Interscience, New York, 1988, cap. 3.
5. VAN VLECK J.H.; *Phys. Rev.* 1932, 41, 208. Van Vleck J.H *J. Chem. Phys.* 1935, 803, 807. Jorgensem, C.K. Em *Modern Aspects of Ligand Field Theory* 1970.
6. BALHAUSEN, C.J.; Em *Introduction to Ligand Field Theory* McGraw-Hill, New York, 1962. Jorgensen, C.K. Em *Absorption Spectra and Bonding in Complexes* Pergamon, New York, 1962.

ANEXO A3 - TABELAS

TABELA 1. Energia de transição eletrônica, experimental e teórico (TD-DFT) para os isômeros **A** e **R** do complexo Ru-him em CH₃CN.

Energia, eV (nm) / Exp.	Energia, eV (nm) / Calc.	Força do Oscilador	Transição Eletrônica	Atribuição
isômero A				
2,56 (485)	2,62(474)	0,0838	H-2→L(25%)	MLCT (Ru→ phen [*])
2,77(448)	2,76(449)	0,0628	H→L+3(66%) H→L+2(14%)	MLCT (Ru→ phen [*])
	3,04(408)	0,0735	H-2→L+2(51%)	MLCT (Ru→ phen [*])
	3,69(336)	0,0015	H-1→L+11(53%) H-2→L+11(11%)	MC (Ru→ Ru)
	4,04(307)	0,0083	H-8→L(23%) H-2→L+5(18%)	LLCT (phen→ phen [*])
4,66(266)	4,66(266)	0,1208	H-9→L+2(33%) H-9→L+3(14%)	LLCT (phen→ phen [*])
isômero R				
2,56 (485)	2,53(490)	0,0892	H-1→L+1(35%) H-2→L(28%) H→L(22%)	MLCT (Ru→ phen [*])
	2,70(458)	0,0867	H→L+3(82%)	MLCT (Ru→ phen [*])
2,77(448)	2,77(447)	0,0871	H-2→L+3(75%) H-1→L+2(13%)	MLCT (Ru→ phen [*])
	3,81(325)	0,0001	H-2→L+10(33%) H-2→L+11(25%)	MC (Ru→ Ru)
4,66(266)	4,67(265)	0,1277	H-9→L+2(35%) H-9→L+3(12%)	LLCT (phen→ phen [*])

TABELA 2. Caráter e energia dos orbitais moleculares LUMO+11 – HOMO-4 dos isômeros A e R do complexo Ru-him em CH₃CN.

Orbital	Complexo A		Complexo R	
	Caráter	Energia / eV	Caráter	Energia / eV
LUMO+11	59% Ru d 21% phen 14% him	+0,11	53% Ru d 13% phen 10% him	+0,33
LUMO+10	57% Ru d 18% phen 20% him	+0,02	60% Ru d 21% phen 9% him	+0,32
LUMO+4	98% phen	-1,28	98% phen	-1,23
LUMO+3	100% phen	-2,41	100% phen	-2,36
LUMO+2	98% phen	-2,42	98% phen	-2,39
LUMO+1	7% Ru d 93% phen	-2,52	7% Ru d 93% phen	-2,45
LUMO	3% Ru d 97% phen	-2,55	3% Ru d 97% phen	-2,51
HOMO	76% Ru d 18% phen 6% him	-5,82	72% Ru d 18% phen 10% him	-5,70
HOMO-1	71% Ru d 12% phen 17% him	-5,93	78% Ru d 13% phen 9% him	-5,79
HOMO-2	83% Ru d 11% phen 6% him	-5,94	82% Ru d 12% phen 6% him	-5,82
HOMO-3	7% Ru d 2% phen 90% him	-6,01	3% Ru d 3% phen 94% him	-6,61
HOMO-4	98% him	-6,10	98% him	-6,69