

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

“COMPOSTOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO NEUROATIVOS: INVESTIGAÇÕES
FOTOQUÍMICAS, FOTOFÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E CITOTOXICIDADE PARA
DROGAS NEUROATIVAS EM FASE III”

Mariana Romano Camilo*

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 FAPESP**

**São Carlos - SP
2010**

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

C183cm

Camilo, Mariana Romano.

Compostos de metais de transição neuroativos :
investigações fotoquímicas, fotofísicas, físico-químicas e
citotoxicidade para drogas neuroativas em fase III / Mariana
Romano Camilo. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
97 f.

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

1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3.
Aminopiridina. 4. Fotoquímica. 5. TD-DFT (Métodos de
cálculos computacionais). 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 Mariana Romano Camilo, realizada em 29 de outubro de 2010:

Rose Maria Carlos

Prof. Dra. Rose Maria Carlos

L. C. Gomide

Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas

A. S. Ito

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

*Aos meus queridos pais, João Roberto e
Jacinta, pelo apoio incondicional em todos
os momentos da minha vida. Amo Vocês.*

*"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive".*

*Fernando Pessoa
(Ricardo Reis)*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Rose Maria Carlos pela orientação, amizade, confiança, oportunidades oferecidas, paciência e grande empenho para que este trabalho pudesse se concretizar;

Ao Prof. Dr. Benedito dos Santos Lima Neto do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) pelas inúmeras vezes que me recebeu em seu laboratório sempre com muita atenção e disposição;

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP) pelas medidas no laser e experimentos de citotoxicidade;

Ao Prof. Dr. Amando Suiti Ito da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP) pelas medidas de tempo de vida do estado excitado;

À Profa. Dra. Ivani Aparecida Carlos pela amizade, apoio e contribuições nas discussões científicas;

Ao Prof. Dr. A. B. P. Lever do Department of Chemistry da York University (Toronto/Canadá) pela colaboração;

À Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Campus Cornélio Procopio) pela ajuda na interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear;

Ao Francisco das Chagas Alves Lima do Departamento de Química da Universidade Estadual do Piauí pela colaboração nos cálculos computacionais;

Ao Fernando Lucas Primo (FFCLRP/USP) pela ajuda nos experimentos de cultura celular;

À Profa. Dra. Simone Delezuk Inglez da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela amizade;

Aos colegas que fizeram e fazem parte do Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica – LaFIB/DQ da Universidade Federal de São Carlos;

Aos colegas do Grupo de Química Inorgânica e Analítica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) pelo apoio;

Aos técnicos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em especial, Dorai Periotto Zandonai, Luciana Vizotto e Ademir Aparecido Sertori pelo apoio constante;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos pelo apoio institucional;

Aos amigos e colegas da turma de Química Bacharelado UFSCar/2005 em especial a Mônica Assumpção pela amizade e pelos momentos de muita risada e descontração;

À minha querida irmã Débora pela paciência, incentivo e carinho inesgotável;

Ao Midson pela amizade, companheirismo, incentivo e amor;

A toda a minha família pelo respeito, admiração, união e amor. Amo muito vocês!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para com a realização deste trabalho;

À FAPESP pela bolsa concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4Apy = 4-aminopiridina

bpy = 2,2'-bipiridina

CH₂Cl₂ = diclorometano

CH₃CN = Acetonitrila

cis = referente ao isômero de posição *cis* de um composto inorgânico ou orgânico

δ = Deslocamento químico nos espectros de RMN

DA = doença de Alzheimer

DFT = Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, *Density Functional Theory*)

DMF = dimetilformamida

ϵ = coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar

EtOH = etanol

ϕ_{em} = rendimento quântico de emissão

ϕ_{subs} = rendimento quântico de substituição

HOMO = do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*

HPLC = ou CLAE, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

J = constante de acoplamento

k_{obs} = constante de velocidade para a reação de fotossustituição

λ = comprimento de onda

LLCT: Transferência de Carga do Ligante para o Ligante (do inglês, *Ligand to Ligand Charge Transfer*)

$\lambda_{m\acute{a}x}$ = comprimento de onda máximo

LMCT = Transferência de Carga do Ligante para o Metal (do inglês, *Ligand to Metal Charge Transfer*)

log P = coeficiente de partição

LUMO = do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

MC = Centrada(o) no metal (do inglês, *Metal Centre*)

Me₂bpy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina

mg = miligramas

mL = mililitros

MLCT = Transferência de carga do metal para o ligante (do inglês, *Metal to Ligand Charge Transfer*)

NBO = (do inglês, *Natural Bond Orbital*)

nm = nanômetro

ns = nanosegundo

Ph₂phen = 4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina

phen = 1,10'-fenantrolina

RMN ¹H = Ressonância Magnética Nuclear de próton

Ru(II) = rutênio com estado de oxidação II

Ru(III) = rutênio com estado de oxidação III

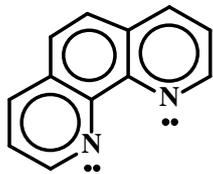
SNC = Sistema Nervoso Central

TD-DFT = Teoria do Funcional da Densidade-Dependente do tempo (do inglês, *Time-Dependent Density Functional Theory*)

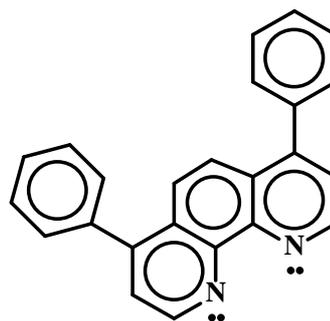
τ_{em} = tempo de vida de emissão

UV-vis = Espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível

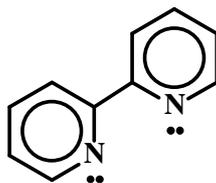
Ligantes α -diimina e 4-aminopiridina:



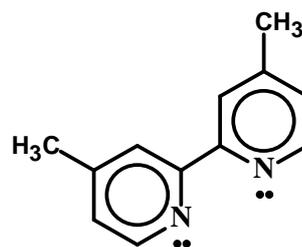
1,10'-fenantrolina (phen)



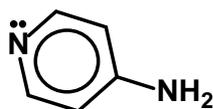
4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina (Ph₂phen)



2,2'-bipiridina (bpy)



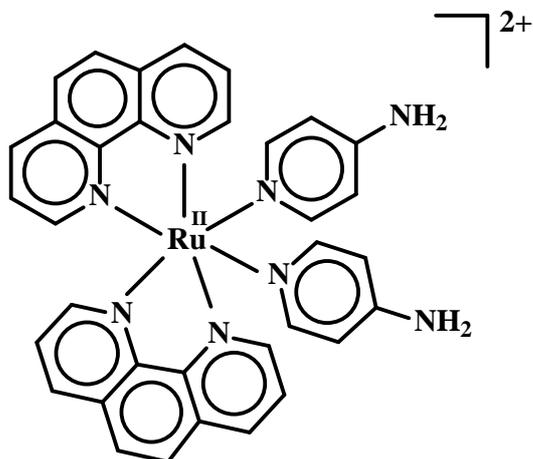
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me₂bpy)



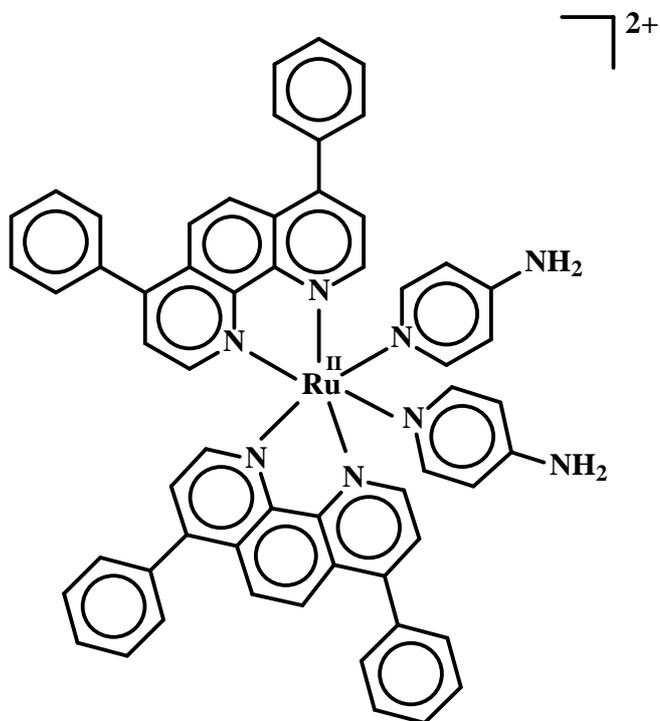
4-aminopiridina (4Apy)

Complexos:

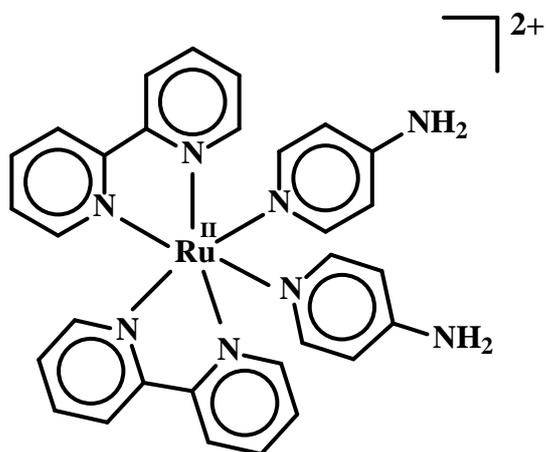
Complexo 1



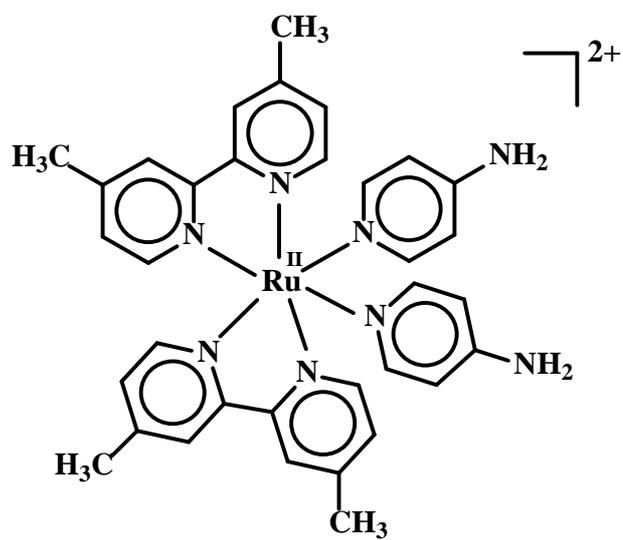
Complexo 2



Complexo 3



Complexo 4



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para os complexos 1 e 3 e [Ru(bpy) ₃](PF ₆) ₂ obtidos de dados experimentais de raio-X. -----	37
Tabela 2: Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para os complexos 1-4 obtidos de cálculos computacionais (geometria otimizada) em CH ₃ CN. -----	40
Tabela 3: Valores de rendimento quântico de emissão (ϕ_{em}) dos complexos 1-4 obtidos em CH ₃ CN.-----	44
Tabela 4: Valores de tempo de vida (τ / ns) e fator pré-exponencial normalizado (α_i) encontrados para os complexos 1-4 em CH ₃ CN e DMF ([complexos] = 2,0×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) usando a Equação 13. -----	46
Tabela 5: Valores de constantes de velocidades (k_{obs}) e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) em CH ₃ CN para os complexos 1-4.-----	60
Tabela 6: Valores de rendimento quântico de substituição (ϕ_{subs}) para os complexos 1-4 em relação aos experimentos fotoquímicos em CH ₃ CN. -----	61
Tabela 7: Dados dos espectros de RMN ¹ H (400 MHz) dos complexos 1-4 em CD ₃ CN [deslocamento químico (δ_H), multiplicidade (mult.) e constante de acoplamento (J)].-----	64
Tabela 8: Análise de carga NBO calculada por DFT (B3LYP/LanL2DZ). -----	72
Tabela 9: Mapa de contorno para os orbitais moleculares HOMO e LUMO para os complexos 1-4 em CH ₃ CN.-----	73
Tabela 10: Dados de absorção eletrônica UV-vis experimental (Exp.) e calculado (Calc.) por TD-DFT para os complexos 1-4 em CH ₃ CN (f = força do oscilador). -----	76
Tabela 11: Valores de coeficientes de partição (log P) para os compostos padrões obtidos experimentalmente e (valores calculados)*. -----	81
Tabela 12: Valores de log k_w obtidos por HPLC.-----	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração do experimento com células J774-A1, em destaque o polimerizador.----- 34
- Figura 2:** Projeções ORTEP para os complexos **1** e **3**.----- 36
- Figura 3:** Geometrias otimizadas dos complexos **1-4** em CH₃CN (DFT, B3LYP/LanL2DZ) (os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza).--- 39
- Figura 4:** Espectros de absorção eletrônica dos complexos **1, 2, 3** e **4** em CH₃CN. 41
- Figura 5:** Espectro de absorção no estado excitado e fundamental para os complexos **1-4** em CH₃CN.----- 43
- Figura 6:** Espectros de emissão e excitação (inserido) dos complexos **1 a 4** obtidos em CH₃CN. ----- 44
- Figura 7:** Curvas de decaimento de emissão para os complexos **1-4** em (A) CH₃CN e (B) DMF a 22 °C; $\lambda_{exc} = 460$ nm; $\lambda_{em} = 660$ nm. As curvas de decaimento foram obtidas após um ajuste bi-exponencial (dados na Tabela 4). A qualidade do ajuste está indicada pelos gráficos de resíduos mostrados abaixo das curvas de decaimento.----- 47
- Figura 8:** Voltamogramas cíclicos obtidos dos complexos **1-4** em CH₃CN (TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹, [complexos] = 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/AgCl).----- 48
- Figura 9:** Espectroeletróquímica dos complexos **1** e **2** em DMF ([complexo] = 0,22 mM, 0,1 mol L⁻¹ TBAPF₆): (A) oxidação, $E_{aplicado} = 1,3$ V, t = 0 a 34 min; (B) redução, $E_{aplicado} = 0$ V, t = 0 a 34 min.----- 50
- Figura 10:** Espectroeletróquímica dos complexos **3** e **4** em DMF ([complexo] = 0,22 mM, 0,1 mol L⁻¹ TBAPF₆): (A) oxidação, $E_{aplicado} = 1,3$ V, t = 0 a 34 min; (B) redução, $E_{aplicado} = 0$ V, t = 0 a 34 min.----- 51
- Figura 11:** Espectros de absorção eletrônica UV-vis obtidos durante fotólise contínua em 420 nm para os complexos **2-4** em solução de CH₃CN (inserido: gráficos de $Abs_{\lambda_{m\acute{a}x}}$ vs tempo). ----- 53
- Figura 12:** Espectros de emissão em CH₃CN obtidos durante fotólise em 420 nm dos complexos **2-4** em CH₃CN ($\lambda_{exc} = 500$ nm) (inserido: gráficos de intensidade de emissão vs absorbância no $\lambda_{m\acute{a}x}$). ----- 54
- Figura 13:** Espectros de absorção eletrônica UV-vis obtidos durante fotólise contínua em 420 nm para o complexo **1** em solução de CH₃CN: (A) fotólise toda

(inserido: gráficos de $Abs_{\lambda_{m\acute{a}x}}$ vs tempo), (B) 0 a 1min e 30 s, (C) 1min e 30 s a 19 min.	56
Figura 14: Espectros de emissão em CH_3CN obtidos durante fotólise do complexo 1 em 420 nm (inserido: gráfico de intensidade de emissão vs absorbância no $\lambda_{m\acute{a}x}$ com $R^2 = 0,997$).	57
Figura 15: Estudo cinético de fotossustituição: gráficos de $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$ versus tempo para os complexos 1-4	59
Figura 16: Desenho das moléculas dos complexos 1-4 juntamente com os respectivos códigos	62
Figura 17: Espectros de RMN 1H (400 MHz) dos complexos 1-4 obtidos em CD_3CN (soluções não irradiadas).	63
Figura 18: Espectros de RMN 1H (400 MHz) obtidos durante fotólise em 420 nm de soluções em CD_3CN dos complexos 2-4	65
Figura 19: Espectros de RMN 1H (400 MHz) (ampliados) obtidos durante fotólise em 420 nm de solução em CD_3CN do complexo 4 : (A) região entre 9,0 e 8,5 ppm; (B) região entre 5,5 e 4,8 ppm (o destaque em vermelho está ampliado).	66
Figura 20: Espectros de RMN 1H (400 MHz) (ampliados) obtidos durante fotólise em 420 nm de solução em CD_3CN dos complexos 2 e 3 : região entre 5,5 e 4,5 ppm (os destaques em vermelho estão ampliados).	66
Figura 21: Espectros de RMN 1H (400 MHz) obtidos durante fotólise em 420 nm de soluções em CD_3CN do complexo 1 : (A) região entre 4,5 e 10 ppm; (B) região entre 9,2 a 10 ppm e (C) região entre 4,6 a 5,05 ppm.	67
Figura 22: Cromatogramas (A) e respectivos espectros de absorção UV-vis (B) obtidos durante fotólise contínua em 420 nm dos complexos 1, 3 e 4 em CH_3CN . --	69
Figura 23: Cromatograma e respectivos espectros de absorção UV-vis (inserido) obtido do ligante 4Apy em CH_3CN	70
Figura 24: Composição (em porcentagem) dos orbitais moleculares dos complexos 1-4 (B3LYP/LanL2DZ, cálculo em CH_3CN).	74
Figura 25: Espectros de absorção eletrônica experimental UV-vis (em preto) e obtidos por DFT (linhas coloridas) para os complexos: 1, 2, 3 e 4 em CH_3CN (barras = força do oscilador).	75
Figura 26: Gráficos de Abs versus b [padrão] para os padrões ciclohexanona, álcool benzílico e acetofenona em (A) octanol e (B) água.	80

Figura 27: Gráficos de Abs versus b[padrão] para os padrões 2-nitrofenol e p-Cl-fenol em (A) octanol e (B) água.	81
Figura 28: Gráfico de log P (ACD/Labs) vs log P (<i>Shake-flask</i>).	82
Figura 29: Gráfico de log <i>k</i> versus ϕ para o complexo 1 e os padrões.	83
Figura 30: Gráfico de log P (<i>Shake-flask</i>) vs log k_w (HPLC) { $R^2 = 0,996$ }.....	84
Figura 31: Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade em macrófagos neoplásicos J774-A1 na ausência de luz para o complexo 1 na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Diferenças são consideradas significativas com $p < 0.05$ para Tukey como pós-teste para One-Way ANOVA.	85
Figura 32: Ensaio <i>in vitro</i> de fototoxicidade em macrófagos neoplásicos J774-A1 na presença de luz nas doses de 3,0 J cm^{-2} e 10 J cm^{-2} para o complexo 1 na concentração de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Diferenças são consideradas significativas com $p < 0.05$ para Tukey como pós-teste para One-Way ANOVA.	86
Figura 33: Ensaio <i>in vitro</i> de fototoxicidade em macrófagos neoplásicos J774-A1 na presença de luz nas doses de 3,0 J cm^{-2} e 10 J cm^{-2} para o complexo 1 na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Diferenças são consideradas significativas com $p < 0.05$ para Tukey como pós-teste para One-Way ANOVA.	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Via de síntese para obtenção do complexo 1 -----	16
Esquema 2: Equipamento de fotólise relâmpago -----	26
Esquema 3: Representação da ligação σ e retrodoação π para Ru-N -----	35
Esquema 4: Diagrama de energia qualitativo para os complexos 1-4 mostrando a distribuição eletrônica de estados singletos obtidos por cálculos computacionais---	78

RESUMO

COMPOSTOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO NEUROATIVOS: INVESTIGAÇÕES FOTOQUÍMICAS, FOTOFÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E CITOTOXICIDADE PARA DROGAS NEUROATIVAS EM FASE III.

Neste trabalho estão descritas as propriedades fotoquímicas e fotofísicas de complexos do tipo *cis*-[Ru(α -diimina)₂(4Apy)₂]²⁺ em que 4Apy = 4-aminopiridina, α -diimina = 1,10'-fenantrolina (phen) (**1**), 4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina (Ph₂phen) (**2**), 2,2'-bipiridina (bpy) (**3**) e 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me₂bpy) (**4**). Os quatro complexos foram caracterizados utilizando as técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H, UV-vis, emissão e de HPLC. As estruturas de Raio-X dos complexos **1** e **3** foram obtidas e são descritas. Os quatro complexos são termicamente estáveis por muitas horas em solução aquosa e não aquosa e são coloridos. Os espectros de absorção eletrônica são caracterizados por dois ombros largos para os complexos derivados do ligante phen e por um pico e um ombro para os complexos derivados do ligante bpy. Os quatro complexos apresentaram dois estados excitados emissivos a temperatura ambiente em solução fluida; os tempos de vida de emissão (τ_{em}) são dependentes do solvente (CH₃CN e DMF), do comprimento de onda de excitação e do ligante α -diimina usado e são atribuídos a população de dois estados excitados de MLCT com spins tripleto e singleto (³MLCT e ¹MLCT). Os experimentos de fotólise contínua em acetonitrila para os complexos *cis*-[Ru(α -diimina)₂(4Apy)₂]²⁺, acompanhada pelas técnicas espectroscópicas (UV-vis, luminescência, RMN de ¹H e HPLC), levaram a dissociação do ligante 4Apy produzindo o complexo mono-acetonitrila (para **2**, **3** e **4**) e o complexo bis-acetonitrila (para **1**). O valor obtido para o rendimento quântico de substituição (ϕ_{subs}) para irradiação com luz de 420 nm foi significativo para o complexo **1** (0,233), mas diminuiu para os demais complexos: **2** (0,044), **3** (0,145) e **4** (0,152). A análise da cinética da reação fotoquímica mais lenta (complexo **2**) para a mais rápida (complexo **1**) resulta em um valor de k_{obs} (a constante de velocidade para a reação de fotossustituição) sete vezes maior para o complexo **1** em relação ao complexo **2**.

Nossos dados espectroscópicos e os cálculos de DFT/TD-DFT confirmam que ambos os ligantes α -diimina e 4Apy atuam como bons doadores σ^- . Entre os ligantes

α -diimina estudados, o ligante phen é o que apresenta o maior comportamento doador σ - para o átomo de Ru (II) (no complexo **1**) quando comparado com os outros ligantes Ph₂phen, bpy e Me₂bpy (nos complexos **2**, **3** e **4**, respectivamente). Com base nestes dados é razoável supor que quanto maior a densidade eletrônica sobre o Ru(II) mais fraca fica a ligação Ru-4Apy favorecendo a labilização deste ligante. De acordo com estas considerações experimentais e da análise computacional de distribuição de cargas NBO (do inglês, *Natural Bond Orbital*) sobre o átomo de Ru(II) é alta para o complexo **1** (+0,287) e relativamente baixa para os complexos **2**, **3** e **4** (~+0,63). Esta análise mostra também que a carga negativa sobre o ligante phen é significativamente reduzida para ~0,12 (**1**) e ~0,05 nos complexos **2**, **3** e **4** sugerindo, como esperado, uma doação σ forte e retro-doação fraca no complexo **1** quando comparado com os outros complexos. Como consequência, o campo ligante do complexo **1** diminui, o que leva a uma diminuição nas diferenças de energia entre os orbitais t_{2g} e e_g^* do centro metálico de Ru(II). Desta maneira, espera-se que os estados excitados de MLCT e MC se aproximem aumentando a viabilidade de fotolabilização do ligante 4Apy no complexo **1**. A liberação do ligante 4Apy em **1** é também demonstrada pela proximidade dos dois estados excitados de menor energia de MLCT/MC a 3,74 eV (demonstrados por cálculos de TD-DFT) os quais podem ser facilmente populados pela absorção de luz visível. Esta é, provavelmente, a chave do mecanismo de fotodissociação do ligante 4Apy no complexo **1** e em seus derivados.

ABSTRACT

NEUROACTIVE TRANSITION METAL COMPOUNDS: PHOTOQUEMISTRY, PHOTOPHYSICS, PHYSICO-CHEMISTRY INVESTIGATIONS AND CYTOTOXICITY FOR NEUROACTIVE DRUGS IN PHASE III.

The photochemical and photophysical properties of the *cis*-[Ru(α -diimine)₂(4Apy)₂]²⁺ complexes where 4Apy= 4-aminopyridine, α -diimine = 1,10'-phenanthroline (phen) (**1**), 4,7'-diphenyl-1,10'-phenanthroline (Ph₂phen) (**2**), 2,2'-bipyridine (bpy) (**3**) and 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (Me₂bpy) (**4**) are reported. The four complexes have been characterized using HPLC, ¹H NMR, UV-vis and emission spectroscopy. The X-ray structure of complexes **1** and **3** were also obtained. The complexes are thermally stable throughout the course of many hours in non-aqueous and aqueous solution and highly colored. The absorptions are characterized by two broad shoulders for the phen derivatives complexes and one peak and one shoulder for the bpy derivatives. The four complexes show two emissive states at room temperature in fluid solution; their emission lifetimes (τ_{em}) are solvent (CH₃CN and DMF), excitation wavelength and α -diimine ligand dependents and are assigned to the population of two different MLCT (³MLCT and ¹MLCT) excited states. Upon photolysis in acetonitrile solution, accompanied by spectroscopic techniques (UV-vis, luminescence, ¹H NMR, HPLC), these *cis*-[Ru(α -diimine)₂(4Apy)₂]²⁺ complexes undergo 4Apy dissociation to give the mono-acetonitrile complex (for **2**, **3** and **4**) and the bis-acetonitrile complex (for **1**). The substitution quantum yield (ϕ_{subs}) ($\lambda_{irr} = 420$ nm) was high for **1** (0.233) but decreased for complexes **2** (0.044), **3** (0.145) and **4** (0.152); the range of k_{obs} (rate constant for the substitution reaction) values is seven times higher in magnitude from the slowest photochemical reaction **2** to the fastest one **1**.

Our spectroscopic data show and DFT/TD-DFT calculations confirm that both α -diimine ligand and 4Apy ligands act as a good electron donor ligand. Among the α -diimine ligand studied the phenanthroline is the electron-richest ligand, which behaves as a good σ -donor toward the Ru(II) atom in complex **1** compared to Ph₂phen, bpy and Me₂bpy in complexes **2**, **3** and **4** respectively. On the basis of this data is reasonable to assume that the Ru-4Apy bond would make weaker the

ruthenium atom becomes more electron rich favoring its labilization. Indeed, the NBO (Natural Bond Orbital) charge analysis indicate a strong variation of the charge on the ruthenium ion, that is, +0.287 (**1**), and \sim +0.63 in complexes **2**, **3** and **4**. The negative charge on the phen ligand is also significantly reduced to \sim -0.12 (**1**) and slightly reduced \sim -0.05 in complexes **2**, **3** and **4** suggesting a stronger σ -donation and weaker back-donation in complex **1** compared to complexes **2**, **3** and **4**. As a consequence the ligand field of the complex is decreased, which decreases the energy differences between the t_{2g} and e_g^* of Ru(II). Doing so, the MLCT and MC states will approach increasing the photoreactivity of the complex. The feasibility of 4Apy release in **1** can be explained by the near proximity of the two low lying energy MLCT/MC states at 3.74 eV (demonstrated by TD-DFT calculations) which can be easily populated by light irradiation. This is probably the key of the photodissociation mechanism of 4Apy in this molecule and its derivatives.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Química medicinal e complexos de metais de transição	1
1.2. A química do Rutênio	3
1.3. Química Inorgânica e Neurociências	4
1.4. Química Computacional	6
1.5. Doença de Alzheimer (DA)	7
1.6. Lipofilicidade	8
2. OBJETIVOS	9
3. PROPOSTA DE TRABALHO E JUSTIFICATIVA	10
4. PARTE EXPERIMENTAL	13
4.1. REAGENTES E SÍNTESES	13
4.1.1. REAGENTES	13
4.1.2. SÍNTESES	14
4.1.2.1. SÍNTESE DE <i>cis</i> -[Ru(<i>phen</i>) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂ •2H ₂ O (complexo 1)	14
4.1.2.2. SÍNTESE DE <i>cis</i> -[Ru(Ph ₂ <i>phen</i>) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂ •2H ₂ O (complexo 2)	15
4.1.2.3. SÍNTESE DE <i>cis</i> -[Ru(<i>bpy</i>) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂ •2H ₂ O (complexo 3)	15
4.1.2.4. SÍNTESE DE <i>cis</i> -[Ru(Me ₂ <i>bpy</i>) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂ •2H ₂ O (complexo 4)	15
4.2. MÉTODOS E EQUIPAMENTOS	16
4.2.1. Atmosfera inerte	16
4.2.2. Análise Elementar	16
4.2.3. Difração de Raios-X	17
4.2.4. Eletroquímica e espectroeletroquímica	17
4.2.5. Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis	18
4.2.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	18
4.2.7. Cálculos Computacionais	18

4.2.8. Fotólise contínua -----	19
4.2.8.1. Actinometria -----	19
4.2.8.2. Rendimento Quântico de Substituição -----	21
4.2.9. Luminescência -----	22
4.2.9.1. Estado Estacionário -----	22
4.2.9.1.1. Rendimento Quântico de Emissão -----	22
4.2.9.2. Resolvidas no Tempo-----	23
4.2.9.3. Tempo de vida de luminescência-----	23
4.2.10. Fotólise Relâmpago: Espectros de Absorção e Cinética de Decaimento dos Estados Excitados (Absorção Transiente) -----	24
4.2.11. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)-----	26
4.2.12. Espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração radial – ICP-OES -----	27
4.2.13. Lipofilicidade -----	27
4.2.13.1. Determinação dos valores do coeficiente de partição por <i>Shake-flask</i> -----	28
4.2.13.2. Determinação dos valores do coeficiente de partição por HPLC-----	29
4.2.13.3. Determinação de $\log k_w$ -----	30
4.2.14. Estudos de citotoxicidade em células -----	31
4.2.14.1. Diagrama de crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas -----	32
4.2.14.2. Aparelhagem -----	32
4.2.14.3. Viabilidade Celular – MTT -----	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	34
5.1. Preparação e caracterização dos complexos polipiridínicos de Ru(II)---	34
5.1.1. Sínteses-----	34
5.1.1.1. A ligação Ru—N: Ru—NH ₂ ou Ru—(N-heterocíclico)? -----	35

5.1.1.2. A geometria dos complexos formados: <i>cis</i> ou <i>trans</i> ? -----	35
5.2. Investigações Estruturais para os complexos 1 e 3 – Estudos de Difração de Raios-X -----	35
5.3. Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-vis-----	40
5.4. Experimentos de Fotólise Relâmpago -----	42
5.5. Luminescência -----	43
5.5.1. Estado Estacionário-----	43
5.5.2. Rendimento Quântico de Emissão:-----	44
5.5.3. Tempo de vida de luminescência -----	45
5.6. Eletroquímica e Espectroeletroquímica -----	48
5.7. Comportamento Fotoquímico-----	52
5.7.1. Fotólises contínuas -----	52
5.7.1.1. Fotólise contínua acompanhada pela técnica de UV-vis e luminescência -----	52
5.7.1.2. Fotólise contínua acompanhada pela técnica de RMN ¹ H-----	61
5.7.1.3. Fotólise contínua acompanhada pela técnica de HPLC-----	68
5.8. Cálculos Computacionais -----	70
5.8.1. Orbital molecular e análise de NBO -----	70
5.8.2. Espectro de Absorção Eletrônica UV-vis-----	75
5.9. Estudos de lipofilicidade -----	79
5.9.1. Determinação dos valores do coeficiente de partição por <i>Shake-flask</i> ---	79
5.9.2. Determinação dos valores do coeficiente de partição por HPLC-----	82
5.10. Estudos de citotoxicidade em células do tipo J774-A1 -----	85
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	87
7. CONCLUSÃO -----	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	88
ANEXO: Fluxograma-----	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química medicinal e complexos de metais de transição

A Química Medicinal é uma área de pesquisa que envolve a química cujo objetivos são planejar, avaliar e sintetizar novos fármacos com o uso ou não da modelagem molecular, estudar sua biotransformação e/ou seu metabolismo, interpretar o seu modo de ação em nível molecular e construir uma relação entre estrutura molecular e atividade farmacológica^{1,2}. É uma área tipicamente interdisciplinar voltada para a racionalização da ação dos fármacos a nível molecular. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) a definição de Química Medicinal é³:

“Medicinal chemistry is a chemistry-based discipline, also involving aspects of biological, medical and pharmaceutical sciences. It is concerned with the invention, discovery, design, identification and preparation of biologically active compounds, the study of their metabolism, the interpretation of their mode of action at the molecular level and the construction of structure-activity relationships”.

Várias estratégias da Química Medicinal podem ser empregadas no desenho molecular de novos candidatos a agentes terapêuticos¹. Estas estratégias são decisivas na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização, diminuindo efeitos colaterais e potencializando sua eficácia, por exemplo. Entre todas as propriedades estruturais que se deva conhecer destes candidatos a fármaco, de maneira a poder otimizá-lo a nível molecular, aquelas relacionadas à fase farmacocinética são relevantes de serem consideradas. O conhecimento do coeficiente de partição ($\log P$) e do pK_a , por exemplo, são propriedades estruturais úteis e relacionadas ao padrão de estabilidade e absorção que os compostos em estudo poderão apresentar nos diferentes compartimentos biológicos. A solubilidade e a capacidade de biotransporte através de membranas celulares são fatores determinantes que poderão influenciar na definição de novas modificações moleculares a serem realizadas nas estruturas dos compostos-protótipos.

Alguns metais vem sendo utilizados há muitos anos no tratamento de determinadas enfermidades. Ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e bismuto (Bi), por exemplo, foram utilizados em práticas médicas desde a antiguidade à idade média⁴. Porém, o mecanismo de ação de certos metais no organismo ainda continua obscuro na maioria dos casos, principalmente naqueles relacionados a metais de transição.

Complexos de platina (Pt) vem sendo estudados desde a década de 60 quando pesquisadores descobriram o potencial anticancerígeno de alguns complexos deste metal^{5,6,7}. Atualmente, complexos de platina são usados na área clínica não somente no tratamento de câncer, mas também no tratamento de moléstias incluindo infecções parasitárias e bacterianas. Pesquisas científicas revelaram que outros compostos metálicos, por exemplo contendo prata (Ag), paládio (Pd), ouro (Au), ródio (Rh) e rutênio (Ru)⁸ possuem propriedades medicinais, porém nem todos ainda são aprovados clinicamente.

Embora se tenha conhecimento da importância dos complexos metálicos no organismo, o seu uso em medicina tem recebido pouca atenção, quando comparados a compostos orgânicos. Talvez uma maneira viável na síntese de novos compostos de interesse farmacológico seja a inserção de uma biomolécula na esfera de coordenação do íon metálico.

A atividade farmacológica de um complexo metálico depende de alguns fatores tais como: tipo de metal, tipo do ligante e também da interação entre ambos⁹. Os fármacos inorgânicos, de uma maneira geral, possuem algumas etapas de absorção pelo organismo baseada no caminho reacional: hidrólise do fármaco → ligação em sítio protéico → transporte através de membrana celular → interação com o alvo molecular¹⁰. Um dos principais pontos neste processo é o transporte dos metais através da membrana celular. Embora o desenvolvimento e o estudo de metalo-fármacos não seja uma área bastante difundida, na medicina existem vários casos de compostos metálicos com comprovada ação farmacológica^{5,6,7,10}.

1.2. A química do Rutênio

O rutênio é um elemento químico de símbolo **Ru** e se encontra no grupo 8 da classificação periódica dos elementos. É um metal de transição de número atômico 44 e em temperatura ambiente se encontra no estado sólido. Foi descoberto por Karl Klaus em 1844, é normalmente encontrado em minas de platina e está comercialmente disponível em formas como $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Em seu estado fundamental possui configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$. Seus estados de oxidação mais comuns são (+II) e (+III) conferindo-lhe uma química diversificada em que ocorre uma simples conversão entre as configurações eletrônicas d^6 e d^5 facilitando assim a estabilização de complexos penta e hexacoordenados¹¹.

Existem três principais propriedades que fazem dos compostos de rutênio serem utilizados em aplicações medicinais^{5,12}: a) velocidade de troca de ligantes; b) os estados de oxidação acessíveis e c) a habilidade do rutênio em mimetizar o ferro (Fe) nas ligações com determinadas moléculas biológicas. Exemplificando: a) Alguns complexos de Ru tem sido avaliados em aplicações clínicas, particularmente no tratamento de câncer devido, em parte, complexos de Ru(II) e Ru(III) terem uma cinética de troca de ligantes similar aos complexos de Pt(II). Estas trocas são importantes na atividade biológica podendo assim interagir melhor com macromoléculas, como as proteínas. b) O Ru possui estados de oxidação acessíveis [Ru(II), Ru(III) e Ru(IV)] em condições fisiológicas e, nestes estados, o centro metálico é predominantemente hexacoordenado essencialmente com geometria octaédrica. O potencial redox do complexo pode ser modificado pela variedade de ligantes coordenados. c) a baixa toxicidade de complexos de Ru com aplicação farmacológica está relacionada com a habilidade deste metal em mimetizar o metal Fe em ligações com macromoléculas do organismo, como a transferrina e a albumina⁵.

Compostos de Ru(II), particularmente complexos polipiridínicos de Ru(II), vem sendo profundamente estudados há décadas. A razão para tal interesse decorre de algumas propriedades destes compostos tais como: estabilidade química, propriedades redox, luminescentes e fotoquímicas, e reatividade no estado excitado^{12,13}.

1.3. Química Inorgânica e Neurociências

O sistema nervoso, juntamente com o sistema endócrino, capacita o organismo a perceber as variações do meio (interno e externo), a difundir as modificações que essas variações produzem e a executar as respostas adequadas para que seja mantido o equilíbrio interno do corpo (homeostase)¹⁴. Estes sistemas estão envolvidos diretamente na coordenação e regulação das funções corporais. Podemos, desta forma, considerar o sistema nervoso como sendo um computador eletroquímico ligado a componentes mecânicos. O meio extracelular que envolve as células nervosas bem como os citoplasmas destas células são repletos de íons inorgânicos os quais produzem as correntes elétricas necessárias para o movimento, sensação, reflexos, aprendizado e memória dos mamíferos. O bombeamento ativo de íons para dentro e para fora da membrana celular, por canais específicos para cada íon, produz potenciais de membrana que são a força motora para os eventos biológicos necessários a nossa sobrevivência^{15,16,17}. Os principais íons envolvidos na geração e regulação das correntes elétricas são os elementos do bloco-s: os metais alcalinos e alcalinos terrosos Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} .

As propriedades químicas e físicas dos íons Na^+ e K^+ são bastante similares. Por exemplo, ambos são de camada fechada, apresentam geometrias de coordenação e cinéticas de troca da molécula de água coordenada similares e, segundo a teoria ácido-base de Basolo e Pearson, são íons duros que preferem doadores de oxigênio^{15,16,17}. Apesar destas similaridades, os canais de íons, uma classe de proteínas ligadas à membrana celular (responsável por uma série de eventos biológicos), são capazes de discriminar seletivamente os íons Na^+ dos íons K^+ facilitando o fluxo dos mesmos a velocidades próximas ao limite difusional. Estes canais são essenciais para o funcionamento dos tecidos excitáveis do sistema nervoso, tais como os músculos do cérebro e do coração. A excitabilidade elétrica é o resultado de um balanço das influências inibitórias e de excitação promovidas pelos neurônios. O impulso nervoso é alcançado pelo movimento de um ou mais íons abaixo de suas respectivas concentrações os quais estabelecem diferenças de voltagens através da membrana celular¹⁵. Desta forma, não é surpreendente que a

ruptura do balanço de excitabilidade de várias células leve a fenótipos neurológicos, chegando a ser letal ao nervo em casos graves¹⁶.

Neste contexto, pesquisas intensivas têm demonstrado que várias desordens neurológicas ocorrem devido a mutações na seqüência dos canais de íon potássio bem como a disfunções neste canal^{17,18}. Por exemplo, várias lesões na medula espinhal resultam da compressão ou contusão do nervo espinhal, deixando partes variáveis do nervo intactas após a lesão. Estas contusões podem levar a destruição da bainha de mielina, expondo os canais de íons K⁺ paranodais. Estes, por sua vez, expostos, abrem o caminho para o êxodo de íons K⁺ durante a atividade neurológica. O efeito total é essencialmente o mesmo que se o nervo estivesse totalmente lesado: nenhuma condução ocorre no sítio da lesão^{17,18}.

Em 1978, Bostock e colaboradores^{19,20,21} demonstraram que a condução poderia ser restaurada usando veneno de escorpião. Este mesmo grupo demonstrou, depois, que um efeito similar poderia ser conseguido aplicando a molécula 4-aminopiridina (4Apy, C₅H₆N₂) na espinha dorsal de um rato^{19,20,21}. Estas mesmas observações foram posteriormente estendidas para o nervo ciático²². A molécula de 4Apy atua como um bloqueador do canal de íons K⁺, mantendo a ação pré-sináptica²³. Como consequência, o influxo de íons Ca²⁺ é aumentado, levando a um aumento no deslocamento do neurotransmissor²³.

Nesta época a 4Apy já estava em uso clínico para a terapia da síndrome miastênica de Lambert-Eaton botulismo²⁴ e a demonstração experimental que a mesma poderia restaurar a condução dos nervos lesados levou a uma série de testes clínicos em pacientes com esclerose múltipla²⁵, lesões graves na medula espinhal²⁶, epilepsia²⁷ e Mal de Alzheimer^{28,29}. Melhoras comportamentais atribuídas ao tratamento com a 4Apy incluem: controle motor e sensorial voluntário, continência, controle respiratório com decréscimos da espasticidade e controle de dores idiopáticas³⁰.

Uma vez que a 4Apy apresenta valor de pK_a = 9,1, nas condições fisiológicas, 98% desta substância encontra-se totalmente protonada formando um monocatión. Como consequência, seu tempo de retenção no organismo é curto (2-3 horas)³⁰. 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 benéfico^{31,32,33}. Este

inconveniente faz com que sua administração seja efetuada sob rigoroso controle clínico^{34,35,36}.

Uma forma possível de utilização da molécula de 4Apy é desenvolver compostos de coordenação neuroquímicos em que a mesma seja inserida na esfera de coordenação do íon metálico de forma inativa e que, através da técnica fotoquímica, o fármaco de interesse seja liberado no sítio alvo. Assim, o sistema pode oferecer um potencial para abordagens fotodinâmicas, atuando como um sistema de entrega da 4Apy de acordo com a resposta aos estímulos luminosos⁸.

1.4. Química Computacional

Estudos computacionais tornaram-se indispensáveis em diversos campos da pesquisa química e desenvolvimento^{37,38}. Diversos trabalhos na área da química computacional estão sendo realizados com foco na aplicação de modernas técnicas computacionais, isto é, cálculos quânticos, para estudos de estrutura, ligação e reatividade de compostos organometálicos e complexos de metais de transição.

Os avanços obtidos na química computacional são de grande valia tanto para os químicos teóricos quanto para a pesquisa experimental. O progresso no desenvolvimento de softwares e hardwares aliado a uma redução constante de custo dos materiais informáticos, torna esta área da química uma das mais promissoras.

Existem diversos métodos que podem ser usados em química computacional. Dentre eles destaca-se o Método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT, do inglês, *Density Functional Theory*)³⁹. Pode-se, com este método, estudar as propriedades eletrônicas e estruturas de moléculas.

1.5. Doença de Alzheimer (DA)

Em geral, a Doença de Alzheimer (DA) acomete inicialmente a parte do cérebro que controla a memória, o raciocínio e a linguagem. Entretanto, pode atingir inicialmente outras regiões do cérebro, comprometendo assim outras funções. A causa da doença ainda é desconhecida e, embora ainda não haja medicações curativas, já existem fármacos que atuam no cérebro tentando bloquear sua evolução, podendo, em alguns casos, manter o quadro clínico estabilizado por um tempo maior. A DA recebeu este nome depois que o Dr. Alois Alzheimer descreveu, em 1906, as mudanças ocorridas no tecido cerebral de uma mulher que faleceu em decorrência do que era conhecido como uma forma de doença mental no idoso. Essas mudanças hoje são reconhecidas como características da alteração do tecido cerebral na doença de Alzheimer⁴⁰.

A DA afeta todos os grupos da sociedade, não tendo influência a classe social, o sexo, o grupo étnico ou a localização geográfica. Embora a doença seja mais comum em pessoas idosas, as pessoas jovens também podem ser afetadas. Nos Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, estima-se que no ano 2040, 12 a 14 milhões de americanos serão portadores dessa doença⁴¹. O número de pacientes diagnosticados no Brasil é significativo, atingindo cerca de 1 milhão e 500 mil brasileiros. Em função do envelhecimento mundial global esses números irão aumentar dramaticamente e, em 2025, a estimativa é que haverá 34 milhões de portadores diagnosticados da DA, sendo 2/3 em países em desenvolvimento. Devido a essa abrangência, a doença ultrapassa as fronteiras da medicina, para se converter num problema de ordem econômico-social, com particular e especial repercussão no núcleo familiar.

1.6. Lipofilicidade

A lipofilicidade de um fármaco é uma característica físico-química importantíssima que, em muitos casos, fornece qual será o tipo de distribuição do mesmo nos diferentes espaços biológicos do corpo humano. Fármacos lipofílicos conseguem transpor vários tipos de barreiras biológicas, pois estas são constituídas de membranas biológicas, as quais são igualmente lipofílicas, e acabam sendo distribuídos preferencialmente aos órgãos que possuem composição predominantemente lipofílicas, como o cérebro, o fígado, os tecidos que compõem as reservas corpóreas de lipídeos do abdômen. Já os fármacos de baixa lipofilicidade normalmente possuem acentuada hidrofílicidade e tendem a se acumular em órgãos que são mais irrigados por água, como pulmões, rins, baço, bexiga. A necessidade de obtenção de dados de lipofilicidade de compostos biologicamente interessantes já se manifesta em estudos que datam da virada do século XIX se estendendo até os dias atuais^{42,43,44,45}. O comportamento de lipofilicidade das moléculas, principalmente os fármacos, é descrito como “coeficiente de partição” (log P).

Coeficiente de partição (P) de uma molécula é uma medida quantitativa que fornece informações a respeito da sua solubilidade em meios distintos (lipofilicidade e hidrofílicidade). Quando a molécula é submetida a um sistema binário de solventes (n-octanol/água) ela se distribui caracteristicamente entre as duas fases e seu P é calculado dividindo-se a concentração da substância de interesse na fase orgânica por sua concentração na fase aquosa ($P = C_o/C_{aq}$) em que P é o coeficiente de partição no sistema n-octanol/água, C_o é a concentração molar da molécula na fase orgânica e C_{aq} é a concentração molar da molécula na fase aquosa. O valor de P obtido empiricamente vem expresso em termos logarítmicos: $\log P = \log (C_o/C_{aq})$. O valor de P pode ser determinado por três diferentes métodos: empiricamente pelo método “*Shake-flask*”, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) ou através de cálculo. Os métodos de cálculo⁴⁶ são fundamentados no isolamento de subestruturas moleculares (fragmentos moleculares) convenientes que possuam valores ou incrementos de lipofilicidade confiáveis e/ou conhecidos. O valor de log P estimado de toda a

molécula é calculado somando-se as constantes que são contribuições (em unidades de log P) correspondentes a subunidades moleculares e incluindo-se os termos de correção devidos às interações intramoleculares e intermoleculares intrínsecas da molécula em questão.

O coeficiente de partição também está relacionado com a energia de Gibbs padrão de transferência (de uma fase para outra) na seguinte relação: $\text{Log } P = -\Delta G^\ominus / (2,3 \text{ RT})$ em que ΔG^\ominus é a energia de Gibbs padrão de transferência, R é a constante universal dos gases perfeitos e T é a temperatura⁴⁷. É importante salientar que este aspecto termodinâmico de partição enfatiza o caráter padrão do coeficiente de partição definido como uma função de duas quantidades padronizadas. Assim, como o potencial químico padrão refere-se a uma solução ideal, é importante destacar que o coeficiente de partição padrão refere-se a partição de um soluto entre dois solventes virtuais^{48,49}.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é obter complexos polipiridínicos de Ru(II) que atuem como sistemas de entrega de 4Apy no SNC de maneira controlada e seletiva mas, que ao mesmo tempo, possam atuar como sondas moleculares luminescentes respondendo por estímulos luminosos aos caminhos de reação ou ao meio em que o fármaco se encontra. A molécula de 4Apy é eficaz contra o mal de Alzheimer, uma doença que atinge um milhão e meio de brasileiros e afeta uma em cada vinte pessoas acima de 65 anos segundo estimativa da ABRAZ (Associação Brasileira de Alzheimer)⁴¹.

Os estudos propostos neste projeto visam o desenvolvimento de compostos neuroquímicos que apresentem atividade biológica similar a 4Apy, porém que sejam mais seletivos e que possam ser administrados a doses menores diminuindo, assim, a toxicidade. Cabe salientar, que a capacidade de estimular neurônios selecionados em um tecido isolado e em seres vivos de maneira não agressiva e não invasiva é fundamental para a investigação do funcionamento e comportamento de células específicas do circuito neurológico. Em adição, os avanços no desenvolvimento de novos fármacos e nos mecanismos de ação em

relação às doenças neurodegenerativas têm um valor especial para a área médica em geral.

3. PROPOSTA DE TRABALHO E JUSTIFICATIVA

Um ponto chave para o pleno desempenho das atividades farmacológicas da 4Apy e para a avaliação das suas funções neurológicas no canal de íons K^+ seria encontrar um método para seletivamente controlar a liberação da droga e simultaneamente mapear suas interações no meio biológico.

Nosso laboratório vem trabalhando no desenvolvimento de compostos de metais de transição luminescentes para uso terapêutico buscando fármacos menos tóxicos e mais seletivos^{50,51}. Uma das estratégias pretendidas envolve a bioativação aplicada a técnica fotoquímica a qual envolve o uso da luz como veículo para a entrega do fármaco no meio biológico. As vantagens desta técnica estão na seletividade, controle temporal, espacial e de dosagem do fármaco para o sítio alvo no meio fisiológico. O fármaco pode ser organizado na forma de um composto estável (fármaco-carregador) e deslocado da molécula carregadora no órgão de interesse pela irradiação local (usando um laser ou fibras óticas com irradiação num determinado comprimento de onda dentro da faixa terapêutica, dependendo do local da lesão). A molécula carregadora deve ser facilmente sintetizada, não ser tóxica ou apresentar o mínimo de toxicidade no escuro, ser ativa a reações fotoquímicas levando ao deslocamento do fármaco no local apropriado gerando produtos secundários não tóxicos e que sejam facilmente excretados pelo organismo.

Em adição, para que um composto luminescente possa atuar como um sensor intracelular de analitos, certos critérios devem ser satisfeitos: sensores devem ligar-se seletivamente e reversivelmente a espécie de interesse mesmo na presença de competidores que possam produzir sinais falsos, sendo que a interação com o analito resulte na alteração na sua luminescência (aumento, diminuição e/ou deslocamento). A luminescência do composto necessita ser intensa e acima de 340 nm para facilitar o uso de lentes microscópicas e evitar danos a célula devido a luz ultravioleta (UV). Em particular, emissão acima de 500 nm ajuda a impedir interferência por autofluorescência das espécies nativas nas células. Em relação as

suas propriedades espectrais, os sensores devem ser solúveis em solução aquosa^{52,53}.

A sensibilidade das propriedades luminescentes dos complexos polipiridínicos de Ru(II) para parâmetros tais como mudanças no pH do meio, liberação ou alterações no ligante coordenado, caráter hidrofílico/hidrofóbico ou eletrônico, combinada com as funções neurológicas da 4Apy, sugerem caminhos para investigar esta proposta de trabalho. Portanto, deve ser possível obter complexos polipiridínicos de Ru(II) coordenados a 4Apy os quais apresentem os estados excitados com características dissociativas centradas no metal (MC, $d_{\pi} \rightarrow d_{\pi}$) e os estados excitados luminescentes com características de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, $d_{\pi} \rightarrow \pi$) próximos em energia de forma a promover a liberação da 4Apy e mapear seus caminhos de reação nos canais de íons K^+ .

De forma a alterar a reatividade pela variação das energias relativas, pretende-se estudar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas de complexos de Ru(II) do tipo *cis*-[Ru(α -diimina)₂(4Apy)₂](PF₆)₂ em que (α -diimina) = 1,10'-fenantrolina (phen) (complexo **1**), 4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina (Ph₂phen) (complexo **2**), 2,2'-bipiridina (bpy) (complexo **3**), 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me₂bpy) (complexo **4**) e 4Apy = 4-aminopiridina.

O comportamento químico dos complexos de Ru(II) com ligantes polipiridínicos do tipo 1,10'-fenantrolina e 2,2'-bipiridina em geral são muito semelhantes^{54,55,56}. Entretanto, o ligante phen é estruturalmente mais rígido. Assim, para os complexos em que a reatividade química e física é influenciada pela capacidade de distorção do ligante quelante, a troca da bpy por phen pode resultar em diferenças significativas na reatividade dos complexos formados^{26,57,58,27,59,28,60}. Em geral, a rigidez do ligante phen permite que muitos complexos de Ru(II)-phen sejam emissivos quando irradiados com luz visível⁶¹. Estes complexos são de interesse e encontram aplicação como sensores biológicos na determinação da concentração de oxigênio e CO₂, pH e temperatura e na análise dos sítios de ligação com o DNA^{62,63,64,65}. Estas aplicações são possíveis devido a alta estabilidade térmica e luminescência intensa proveniente dos estados excitados de menor energia com características de MLCT do fragmento {Ru(phen)₂}²⁺.

O uso de compostos sensíveis a luz para a análise de processos neurológicos vem sendo reportados desde a década de 70^{66,67,68}. A escolha do

ligante 4Apy se deve ao fato de ser um ligante que apresenta a melhor atividade farmacológica dentro da série das aminopiridinas e por se apresentar em fase III nos testes clínicos⁶⁹.

O espectro eletrônico dos complexos, $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_3]^{2+}$ e seus derivados, em geral, podem ser caracterizados por uma série de transições eletrônicas sobrepostas e intensas na região do vermelho (450-600 nm). Estas transições eletrônicas são classificadas em MC, em LC ($\pi \rightarrow \pi^*$), MLCT ou LMCT ($\pi \rightarrow \text{M}$)^{70,71,72,73,74,75}.

Para os complexos *cis*- $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_2(4\text{Apy})_2]^{2+}$, espera-se um número maior de estados excitados devido a introdução das transições ML'CT, e portanto, bandas de absorção adicionais vão surgir devido as diferentes energias dos orbitais dos ligantes adicionais. As energias das bandas LC não são afetadas por outros ligantes. Por outro lado, espera-se que a introdução de substituintes no anel do ligante polipiridínico e a substituição de dois íons cloreto no complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\alpha\text{-diimina})_2]$ por duas moléculas de 4Apy promovam um deslocamento nos máximos de absorção das bandas de MLCT e ML'CT para regiões de maior comprimento de onda (λ_{max}). O λ_{max} a ser observado será função da capacidade doadora/receptora- π dos ligantes (α -diimina) derivados.

Sabendo-se que as propriedades luminescentes dos complexos que apresentam o fragmento $\{\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_2\}^{2+}$ estão localizadas na ligação metal-(α -diimina), as alterações devido a variações do meio (pH, lipofilicidade, eletrólito) e/ou ligante coordenante irão refletir diretamente na luminescência a qual poderá ser suprimida ou aumentada em intensidade. Isto irá permitir uma análise da dosagem da droga bem como uma avaliação cinética e mecanística da função da 4Apy em célula alvo.

A execução desta etapa do nosso trabalho envolve as técnicas espectroscópicas (UV-vis, RMN de ^1H), eletroquímicas (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) e espectroeletroquímica, fotoquímica (fotólise contínua e resolvida no tempo com detecção UV-vis) e fotofísica (luminescência no estado estacionário e resolvida no tempo), HPLC.

Para auxiliar na interpretação dos dados fotoquímicos e fotofísicos apresentados neste trabalho foram realizados cálculos computacionais de estrutura

eletrônica usando o método DFT e TD-DFT (do inglês, *Time Dependent-Density Functional Theory*).

Considerando-se que o sítio alvo de interação da 4Apy é o cérebro e que a formulação oral é geralmente a preferida, estes complexos devem necessariamente ultrapassar duas barreiras biológicas (membranas do intestino e barreira sanguínea do cérebro) para alcançar o Sistema Nervoso Central (SNC). Neste sentido, é fundamental assegurar que a droga possua não somente a atividade farmacológica necessária, mas também as propriedades fundamentais para a adequada viabilidade seguindo a administração oral. Assim, pretendemos avaliar *in vitro* as propriedades hidrofílicas bem como a toxicidade aguda dos complexos propostos.

Em geral observa-se que as drogas mais eficientes encontram-se parcialmente ionizadas no pH do sangue e em equilíbrio entre a forma ionizada e não ionizada. Isto permite a passagem da droga pela membrana celular na forma não ionizada e a ligação a seu sítio receptor na forma ionizada⁷⁶.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES E SÍNTESES

4.1.1. REAGENTES

Todos os reagentes usados foram de alto grau de pureza. Tricloreto de rutênio(II) hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), cloreto de lítio (LiCl), (α -diimina) = 1,10'-fenantrolina (phen), 4,7'-difetil-1,10'-fenantrolina (Ph_2phen), 2,2'-bipiridina (bpy) e 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me_2bpy) todos de procedência Aldrich, foram usados para sintetizar os precursores do tipo *cis*- $\text{Ru}(\text{Cl}_2)(\alpha\text{-diimina})_2$. Na_2CO_3 de procedência J. T. Baker foi utilizado para a síntese do complexo-carbonato $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]$. O ácido hexafluorofosfórico (HPF_6 , procedência Aldrich), foi utilizado na síntese do aquo-complexo *cis*- $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_2(\text{OH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$. Os complexos **1-4** foram precipitados, na forma iônica, usando-se hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6 , procedência Aldrich). O ligante 4Apy foi utilizado sem purificação prévia (procedência Aldrich).

Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆), de procedência Fluka, foi usado como eletrólito suporte para os procedimentos de análise eletroquímica e espectroeletroquímica em solventes orgânicos. Para preparo de soluções aquosas foi utilizada água Milli-Q, obtida do sistema de purificação de água modelo Simplicity, da Millipore. Os solventes usados neste trabalho foram acetonitrila (CH₃CN) e dimetilformamida (DMF, C₃H₇ON) ambos de grau super puro (99%) de procedência Aldrich, diclorometano (CH₂Cl₂), metanol (MeOH) e CH₃CN grau HPLC, de procedência Tédia. Para a realização das sínteses dos complexos **1-4** utilizou-se também álcool etílico (C₂H₅O) de procedência Tédia (HPLC). Nos experimentos de lipofilicidade foi utilizado 1-octanol de procedência Aldrich.

4.1.2. SÍNTESES

Todas as reações foram realizadas sob atmosfera inerte (nitrogênio). O material de partida *cis*-[Ru(α -diimina)₂(OH₂)₂](PF₆)₂•H₂O (aquo-complexo) foi preparado de acordo com os métodos já conhecidos da literatura^{77,71,73,78,79,80}, partindo-se do complexo *cis*-Ru(Cl₂)(α -diimina)₂•2H₂O e ainda pelo complexo [Ru(α -diimina)₂(CO₃)]. Os complexos *cis*-[Ru(α -diimina)₂(4Apy)₂](PF₆)₂ foram sintetizados a partir dos seus correspondentes aquo-complexos por reação com o ligante 4Apy numa mistura etanol/água. Os compostos foram obtidos de forma pura usando cromatografia em coluna de permeação em gel do tipo Sephadex LH-20 (2,5 cm x 50 cm) usando como eluente uma mistura de metanol:tolueno na proporção 3:1. Um caso representativo de via de síntese está descrito a seguir.

4.1.2.1. SÍNTESE DE *cis*-[Ru(phen)₂(4Apy)₂](PF₆)₂•2H₂O (complexo 1)

Um procedimento típico de preparação deste tipo de complexo pode ser descrito como: *cis*-[Ru(phen)₂(OH₂)₂](PF₆)₂ (51 mg, 0,063 mmol) foi dissolvido numa mistura de 1:1 etanol/água (total de 10 mL) e uma quantidade do ligante 4Apy (13,7 mg, 0,15 mmol) foi adicionada. A solução foi mantida sob agitação e refluxo em atmosfera inerte por 8 (oito) horas. Uma quantidade estequiométrica de NH₄PF₆ foi adicionada para precipitação do complexo. O precipitado foi redissolvido numa quantidade mínima de MeOH, passado por coluna Sephadex LH-20 usando uma

mistura de MeOH:Tolueno. A banda vermelha foi coletada e o solvente foi removido por evaporação. O sólido assim obtido foi dissolvido em MeOH, adicionou-se éter etílico na solução para obtenção de um precipitado vermelho, o qual foi filtrado à vácuo, lavado com água, etanol e éter etílico previamente resfriados. O produto foi seco à vácuo. O rendimento da síntese foi de 71% (44 mg). Valores calculados para $\text{RuC}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{P}_2\text{F}_{12}\text{O}_2$: C, 41,80%, N, 11,48%; H, 3,30%. Valores encontrados: C, 43,42%; N, 11,45%; H, 3,03%.

4.1.2.2. SÍNTESE DE *cis*-[Ru(*Ph*₂*phen*)₂(*4Apy*)₂](PF₆)₂•2H₂O (complexo 2)

O complexo **2** foi obtido a partir do complexo *cis*-[RuCl₂(*Ph*₂*phen*)₂]²⁺ com 68% de rendimento após 8 horas de refluxo numa mistura 1:1 de etanol/água, sob atmosfera inerte. Valores calculados para $\text{RuC}_{58}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{P}_2\text{F}_{12}\text{O}_2$: C, 54,42%, N, 8,75%; H, 3,78%. Valores encontrados: C, 54,11%; N, 8,20%; H, 3,88%.

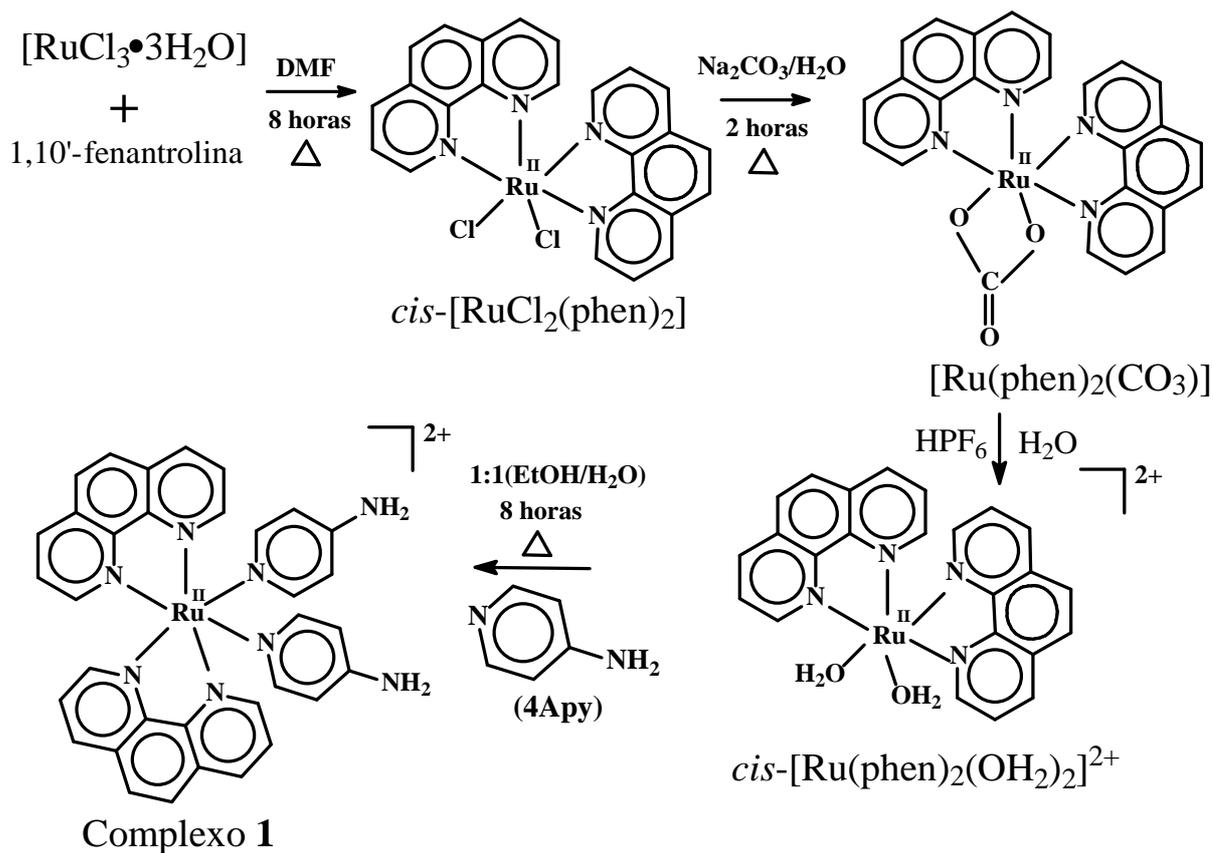
4.1.2.3. SÍNTESE DE *cis*-[Ru(*bpy*)₂(*4Apy*)₂](PF₆)₂•2H₂O (complexo 3)

O complexo **3** foi obtido a partir do complexo *cis*-[Ru(*bpy*)₂(OH₂)₂]²⁺ com 81% de rendimento após 8 horas de refluxo numa mistura 1:1 de etanol/água, sob atmosfera inerte. Valores calculados para $\text{RuC}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{P}_2\text{F}_{12}\text{O}_2$: C, 38,84%, N, 12,08%; H, 3,48%. Valores encontrados: C, 38,70%; N, 11,80%; H, 3,64%.

4.1.2.4. SÍNTESE DE *cis*-[Ru(*Me*₂*bpy*)₂(*4Apy*)₂](PF₆)₂•2H₂O (complexo 4)

O complexo **4** foi obtido a partir do complexo *cis*-[Ru(*Me*₂*bpy*)₂(OH₂)₂]²⁺ com 82% de rendimento após 8 horas de refluxo numa mistura 1:1 de etanol/água, sob atmosfera inerte. Valores calculados para $\text{RuC}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_8\text{P}_2\text{F}_{12}\text{O}_2$: C, 41,51%, N, 11,39%; H, 4,10%. Valores encontrados: C, 41,56%; N, 10,97%; H, 4,24%.

O Esquema 1 mostra a via de síntese para obtenção do complexo **1**.



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

4.2. MÉTODOS E EQUIPAMENTOS

4.2.1. Atmosfera inerte

As sínteses, os estudos de fotólise contínua (acompanhada pela técnica UV-vis e RMN 1H), espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis) e voltametria cíclica e de pulso diferencial foram realizados sob atmosfera de nitrogênio puro (UP, concentração 99,99%).

4.2.2. 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.

4.2.3. Difração de Raios-X^{81,82,83,84,85,86}

A estrutura do cristal obtida para os complexos **1** e **3** foi resolvida a temperatura ambiente. As intensidades de difração de raios-X foram coletadas usando um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD. A análise estrutural foi feita usando os programas MERCURY e ORTEP-3. O arquivo de informações cristalográficas (documento com extensão *.cif*) foi depositado junto ao banco de dados estruturais CAMBRIDGE sob código de depósito 786215 CCDC (www.ccdc.ac.uk).

4.2.4. Eletroquímica e espectroeletroquímica

As medidas de eletroquímica (voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica) foram realizadas utilizando-se o potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB, modelo Type III, usando cela eletroquímica de vidro, com capacidade para 5 mL, e três eletrodos: um fio de Ag/AgCl armazenado em solução 3,0 mol L⁻¹ de KCl (solução saturada) como eletrodo de pseudo-referência; e os eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de discos de platina (Pt) de 1,5 mm e 4 mm de diâmetro, respectivamente. Usou-se solução 0,1 mol L⁻¹ de TBAPF₆ como eletrólito suporte em solventes orgânicos. As concentrações dos complexos foram de 10⁻³ mol L⁻¹. Ferroceno (C₁₀H₁₀Fe, sigla Fc) de procedência Aldrich foi adicionado como padrão interno nas medidas eletroquímicas em que Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de pseudo-referência⁸⁷. As medidas espectroeletroquímicas foram realizadas em cela eletrolítica de quartzo de 2 mm de espessura usando o μ Autolab no solvente DMF com 0,1 mol L⁻¹ de TBAPF₆ como eletrólito suporte. Esta cela é composta de redes de platina como eletrodos de trabalho e auxiliar e um fio de Ag/AgCl como eletrodo de referência. O eletrodo auxiliar foi separado dos outros dois eletrodos por um compartimento de vidro.

4.2.5. Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro de feixe simples UV-Vis-HP KAIK XA (HP Hewlett Packard 8453). Usou-se celas de quartzo de caminho ótico de 10 mm e 3,5 mL de capacidade. Para os experimentos referentes aos estudos de lipofilicidade usou-se celas de quartzo de 2 mm 0,7 mL de capacidade.

4.2.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

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

4.2.7. Cálculos Computacionais

Estes estudos foram realizados em cooperação com o Professor A. B. Lever da York University, Toronto-ON, Canadá, o qual realiza os cálculos computacionais por um sistema de cluster através do SHARCNET (Shared Hierarchical Academic Research Computing Network, www.sharcnet.ca). Nosso laboratório vem a longo tempo realizando estudos teóricos dos complexos de metais de transição. Atualmente contamos com dois computadores formatados para cálculos teóricos. O método teórico DFT (Teoria do Funcional de Densidade) foi utilizado para analisar a estrutura eletrônica dos complexos **1-4**³⁹. As geometrias dos complexos **1-4** foram otimizadas pelo programa Gaussian 09⁸⁸. Inicialmente foram desenvolvidos cálculos das geometrias no vácuo em nível de teoria DFT utilizando o funcional híbrido B3LYP com o conjunto de base LanL2DZ^{89,90,91,92}. Com as estruturas otimizadas no vácuo, realizaram-se cálculos levando-se em consideração o efeito do solvente acetonitrila. O modelo utilizado foi o modelo de polarização contínua (*Polarized Continuum Model* - PCM)^{93,94}. Esse modelo define a cavidade como a união de uma série de esferas atômicas entrelaçadas. O efeito da polarização do solvente é representado numericamente e computado por uma

integração numérica. Os cálculos teóricos foram realizados sem imposição de simetria. Para os estudos de estado excitado foram utilizadas as estruturas geométricas otimizadas com o efeito do solvente. Cabe salientar que apesar de não dominarmos a metodologia DFT toda a análise dos resultados obtidos foram realizados em nosso laboratório. As energias das transições eletrônicas foram obtidas pelo método TD-DFT (dependente do tempo)^{95,96,97,98,99}. Os perfis de absorção do complexo foi calculado usando o programa SWIZARD¹⁰⁰. Para a análise de decomposição de carga (Extended charge decomposition analysis, ECDA) usou-se o programa AOMIX-CDA¹⁰¹. A análise de população dos orbitais também foi realizada (GaussView 03). Os calculos de NBO (Orbital natural de ligação) foi realizado usando o programa NBO 5.0¹⁰², como implementado no Gaussian 09.

4.2.8. Fotólise contínua

As medidas de fotólise contínua foram realizadas utilizando-se um reator fotoquímico montado em nosso laboratório. Este reator consiste de um sistema carrossel com 8 lâmpadas com irradiação monocromática no comprimento de onda de 420 nm. Acompanhou-se a fotólise pela técnica de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis e luminescência (emissão e excitação), RMN ¹H e HPLC. As soluções dos complexos foram preparadas na concentração 10⁻³ mol L⁻¹ e previamente deaeradas.

4.2.8.1. Actinometria

As intensidades de luz incidente na fotólise a 420 nm foram medidas através da actinometria usando o actinômetro Ferrioxalato de Potássio K₃[Fe(C₂O₄)₃]. O ferrioxalato de potássio é um actinômetro bastante sensível para a faixa de comprimento de ondas de 253 até 577 nm. O actinômetro foi preparado de acordo com Calvert e Pitts¹⁰³. A preparação do sal K₃[Fe(C₂O₄)₃]•3H₂O foi feita pela mistura de três volumes de uma solução de 1,5 mol L⁻¹ de K₂C₂O₄ e um volume de uma solução 1,5 mol L⁻¹ de FeCl₃ sob agitação e na ausência de luz. O precipitado de K₃[Fe(C₂O₄)₃]•3H₂O foi recristalizado em água morna em banho de gelo, seco e

armazenado em um dessecador na ausência de luz. Para a determinação da intensidade de luz na irradiação no comprimento de onda de 420 nm, previamente preparou-se uma solução de 0,006 mol L⁻¹ do actinômetro ferrioxalato de potássio e 0,05 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico. Pipetou-se 3 mL da solução do actinômetro com a concentração adequada para o comprimento de onda de irradiação e a solução foi irradiada em uma cela de 1 cm de caminho ótico por 3 min. Uma alíquota de 2 mL da solução de actinômetro irradiada foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL contendo 2,5 mL de tampão acetato (obtido pela mistura de 600 mL de uma solução 1 mol L⁻¹ de NaCH₃COO e 360 mL de uma solução 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄, e essa mistura foi diluída para o volume final de um litro), e 1 mL de uma solução 0,1% de 1,10'-fenantrolina. A solução foi diluída para 10 mL com água destilada. Preparou-se um branco seguindo o mesmo procedimento, exceto que a solução de actinômetro não foi adicionada. As duas soluções foram mantidas no escuro por uma hora e após esse tempo foram medidas as suas respectivas absorbâncias no comprimento de onda de 510 nm.

A intensidade da luz incidente (I_i) foi calculada pela Equação 1:

$$I_i = \frac{V_1 \times V_3 \times \Delta Abs}{\phi_{Fe^{2+}} \times t \times V_2 \times l \times \epsilon_{Fe^{3+}} \times f} \quad (1)$$

em que,

V₁ = volume da solução de actinômetro irradiada (mL);

V₂ = volume da alíquota de solução de actinômetro irradiada para análise (mL);

V₃ = volume final, ou seja, volume do balão volumétrico o qual V₂ foi diluído (mL);

ΔAbs = diferença da absorbância a 510 nm da solução irradiada e da absorbância a 510 nm da solução não irradiada;

φ_{Fe²⁺} = rendimento quântico de formação de Fe²⁺ no comprimento de onda da luz irradiada (1,11 mol einstein⁻¹);

f = fração da luz absorvida pela solução irradiada no comprimento de onda de irradiação (0,615 a ~420 nm);

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

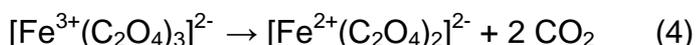
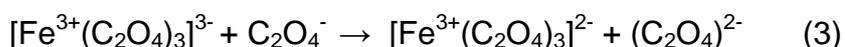
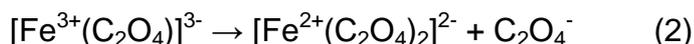
l = caminho ótico da cela fotolisada usada (cm);

ε_{Fe²⁺} = coeficiente de extinção molar do complexo [Fe(phen)₃]²⁺ a 510 nm (1,11 x 10⁴ mol⁻¹ L cm⁻¹);

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

O valor encontrado para a intensidade das lâmpadas usadas nos experimentos de fotólise contínua em solução de CH_3CN para os complexos **1-4** foram: $1,178 \times 10^{-8}$ (complexo **1**), $1,237 \times 10^{-8}$ (complexo **2**), $1,165 \times 10^{-8}$ (complexo **3**) e $1,271 \times 10^{-8}$ einsten s^{-1} (complexo **4**).

Quando a solução de $K_3[Fe(C_2O_4)_3]$ é fotolisada, os íons Fe^{3+} são reduzidos a Fe^{2+} , sofrendo as seguintes reações:



O produto $Fe(C_2O_4)_2$ 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.

4.2.8.2. Rendimento Quântico de Substituição

O rendimento quântico de substituição (ϕ_{subs}) foi calculado pela Equação 5:

$$\phi_{subs} = \frac{\Delta Abs \times V}{I_i \times f \times \Delta t \times \Delta \epsilon} \quad (5)$$

em que,

ΔAbs = variação de absorbância no λ máximo de absorção escolhido para cada complexo;

V = volume da cela espectrofotométrica (3,5 mL)

I_i = intensidade da luz incidente no comprimento de onda de irradiação para cada complexo;

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

Δt = variação do tempo de irradiação (s);

$\Delta\varepsilon$ = diferença do valor de ε (absortividade molar) do foto-produto e do reagente inicial (complexos 1-4) no comprimento de onda de irradiação e assumindo reação 1:1.

4.2.9. Luminescência

4.2.9.1. Estado Estacionário

Os espectros de emissão ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$) foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Shimadzu Modelo RF-5301PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

4.2.9.1.1. Rendimento Quântico de Emissão

O rendimento quântico de emissão (ϕ_{em}) de um composto, é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos por este composto (Equação 6).

$$\phi_{\text{em}} = \frac{\text{Número de fótons emitidos}}{\text{Número de fótons absorvidos}} \quad (6)$$

Pode ser determinado por comparação com uma solução do composto padrão conhecido na literatura¹⁰⁴ $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) num certo solvente $\{\phi_{\text{em}}([\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}) \text{ em } \text{CH}_3\text{CN} = 0,061\}$ usando a Equação 7¹⁰⁵:

$$\phi_{\text{em}} = \phi_{\text{std}} (A_{\text{std}}/A_{\text{comp}})(I_{\text{comp}}/I_{\text{std}})(n/n_{\text{std}})^2 \quad (7)$$

em que A_{std} , A_{comp} são os valores de absorbância do padrão e da amostra do composto de interesse, respectivamente, num mesmo comprimento de onda (436 nm, no caso do uso como padrão o $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$), I_{std} , I_{comp} são as intensidade de emissão integradas do padrão e do composto, respectivamente, e n_{comp} , n_{std} são os índices de refração do solvente usado nas amostras do composto e do padrão,

respectivamente. O termo $(n/n_{\text{std}})^2$ pode ser desprezado quando o solvente usado em ambas as amostras (padrão e composto) é o mesmo.

4.2.9.2. Resolvidas no Tempo¹⁰⁶

Estes estudos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito da FFCLRP/USP – Ribeirão Preto/SP.

4.2.9.3. Tempo de vida de luminescência

A técnica de contagem de fótons individuais com correlação temporal foi usada para determinar o tempo de vida da luminescência. Esta é uma técnica largamente usada e seu princípio baseia-se no conceito de que a distribuição de probabilidade de emissão de um fóton, após o evento de excitação da amostra, é proporcional à distribuição de intensidade de luminescência no tempo para os fótons emitidos como resultado da excitação da amostra.

O decaimento temporal da intensidade de fluorescência pode ser obtido pelo método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (em inglês, *Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC). A amostra é excitada usando uma fonte de luz pulsada. Cada pulso de excitação é opticamente monitorado por uma fotomultiplicadora, para produzir um sinal elétrico de partida, que é usado como gatilho para o disparo de uma rampa de voltagem em um conversor tempo-amplitude (em inglês, *time-amplitude converter*, TAC). A rampa de voltagem é interrompida quando o primeiro fóton fluorescente proveniente da amostra é detectado e o TAC fornece um pulso de saída cuja voltagem é proporcional ao tempo entre os sinais de partida e de interrupção. Um analisador multicanal (MCA) converte essa voltagem para um canal de tempo usando um conversor analógico-digital. Somando sobre vários pulsos, o MCA constrói um histograma de contagens em função do tempo, que representa o decaimento da intensidade da fluorescência. Tipicamente, o experimento transcorre até atingir 10.000 contagens no canal correspondente ao número máximo de contagens.

No laboratório do Grupo de Fotobiofísica da FFCLRP USP, a fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami 3950* (*Spectra Physics*) de titânio-safira

(*Ti:sapphire*) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*), de Nd:YVO₄, que tem saída com potência máxima de 10W no comprimento de onda 532 nm (verde).

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

4.2.10. Fotólise Relâmpago: Espectros de Absorção e Cinética de Decaimento dos Estados Excitados (Absorção Transiente)

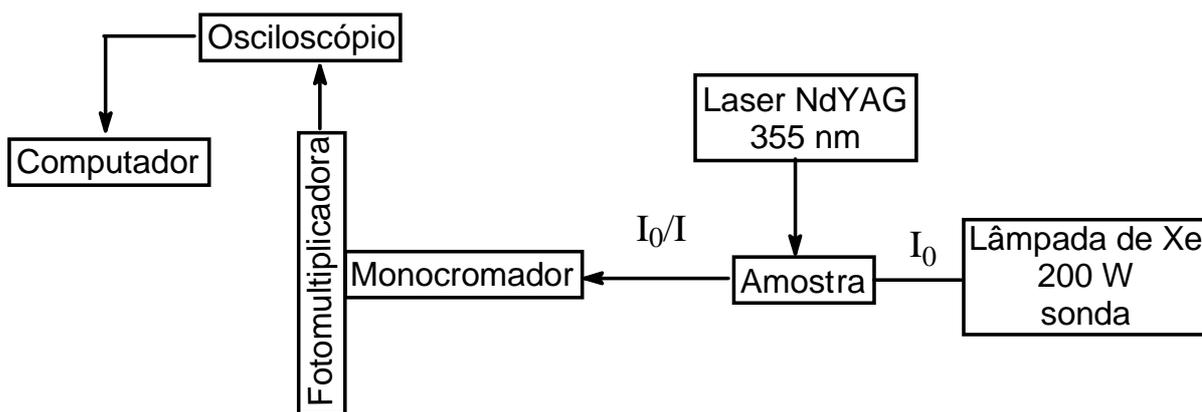
Estes estudos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco da FFCLRP/USP-Ribeirão Preto. É uma técnica de espectroscopia baseada em mudanças da absorção (ΔAbs) com o tempo, em que ΔAbs é a diferença entre a absorção anterior a excitação e a após a excitação de acordo com a Equação 8:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{após}} - \text{Abs}_{\text{anterior}} \quad (8)$$

Esta técnica pode ser usada para medir concentrações do estado excitado e assim as constantes de velocidade para um determinado processo. Experimentos de absorção transiente envolvem a irradiação da amostra com um pulso de luz curto que é usado para criar um estado excitado da molécula estudada seguido por um pulso analisador. A luz de análise que passa pela amostra antes e após a excitação é então usada para calcular o ΔAbs de acordo com a Equação 9, em que I_0 e I são as intensidades de luz de análise passando através da amostra *antes* e *após* a excitação, respectivamente.

$$\Delta\text{Abs} = \log (I_0/I) \quad (9)$$

Os espectros de absorção resolvidos no tempo foram obtidos utilizando o equipamento de fotólise relâmpago compreendendo um sistema Q-switched LASER Nd-YAG da Continuum Laser (Continuum, Santa Clara, CA) com excitação obtida do terceiro harmônico a 355 nm (Esquema 2). O comprimento de pulso foi de 8 ns, o diâmetro do raio incidente sobre a amostra de 6 mm, e velocidade de repetição de 10 Hz. O pulso do Laser foi mantido a 15 mJ (por pulso) medidos com um medidor de energia da Field Master. A fonte de detecção foi uma lâmpada de xenônio de alta pressão (Edimburg Inst) e os traços cinéticos foram medidos de 260 a 800 nm com intervalos de 3 nm para cada medida. Para evitar fotólise durante o tempo de pulso a amostra foi trocada a cada 20 nm. A cinética de decaimento foi medida a um único comprimento de onda utilizando um monocromador (M300 da Bentham), e uma fotomultiplicadora (Hamamatsu, modelo R928P). Os decaimentos dos transientes foram medidos utilizando um osciloscópio digital Tetronix TDS 340. Os decaimentos cinéticos digitalizados foram transferidos para um computador para análise dos dados utilizando o programa fornecido pela Edinburgh Instruments.



Esquema 2: Equipamento de fotólise relâmpago.

4.2.11. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia foi realizada em um equipamento da Shimadzu, com bomba LC-10AD, um injetor Rheodyne modelo 7725i, com amostrador de 20 μL e detector UV-vis, modelo SPD-M10A. Utilizou-se coluna CLC-ODS (4,6 mm x 15 cm) da marca Phenomenex, constituída por partículas de 5 μm e 100 Å de diâmetro às quais está ligada uma cadeia octadecil. A eluição da fase móvel foi do tipo isocrática e o fluxo foi mantido em 0,3 mL min^{-1} . As amostras foram dissolvidas na própria fase móvel, filtradas numa pipeta de pasteur com um pedaço de algodão e injetadas em volumes de 20 μL usando uma seringa de capacidade 25 μL (Agilent Technologies). Para as análises de lipofilicidade foi utilizada a fase móvel composta da mistura de metanol HPLC (MeOH) e água Milli-Q em diferentes proporções. Para os estudos fotoquímicos utilizou-se a fase móvel composta de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50% v/v) com 0,01% HTFA (ácido trifluoracético), pH 3,0. Estes experimentos foram realizados na **Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI)** no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC/USP) sob supervisão do professor Dr. Benedito dos Santos Lima Neto.

4.2.12. Espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração radial – ICP-OES

Os experimentos para determinação da concentração de metal (rutênio) em amostras de *Shake-flask* (octanol/água, amostras feitas em duplicata) para o complexo **1** foram realizados em um ICP-OES com configuração radial (Perkin Elmer Optima 3000DV) localizado na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) no Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP). As condições operacionais para a determinação da concentração de rutênio foram: a) potência aplicada: 1,3 kW; b) vazão do gás do plasma: 15 L min⁻¹; c) vazão do gás auxiliar: 0,5 L min⁻¹; d) vazão do gás de nebulização: 0,6 L min⁻¹. Para a quantificação das amostras do *Shake-flask* contendo o metal de interesse adotou-se o método de calibração por padrão. Para isto, soluções de quantidades conhecidas do analito (i.e. rutênio) preparadas a partir de uma solução analítica de referência (metal rutênio, concentração 1000 ppm) foram injetadas para obtenção de uma curva padrão. Estas soluções foram preparadas em cinco concentrações diferentes de metal (0, 1,5, 3,0, 4,5 e 6 ppm), atentando-se para a faixa de concentração de metal esperada ser encontrada nas soluções orgânica (1-octanol) e aquosa (água) do experimento *Shake-flask*. Na etapa de preparo das amostras do complexo **1** foi utilizada a técnica de decomposição de materiais orgânicos por via úmida usando os ácidos nítrico (HNO₃) e perclórico (HClO₄), descrita na literatura¹⁰⁷.

4.2.13. Lipofilicidade

O coeficiente de partição (log P) é um parâmetro físico-químico que pode ser utilizado para estimar a afinidade relativa de uma dada espécie por uma fase lipofílica, como a membrana celular, e uma fase aquosa. Geralmente uma mistura bifásica n-octanol/água é usada para mimetizar a interface membrana/água. Assim, dependendo do equilíbrio de partição de um dado composto neste sistema

bifásico, pode-se inferir a tendência do mesmo em interagir e/ou de se incorporar nas membranas biológicas ou permanecer na fase aquosa.

Os estudos de lipofilicidade envolveram diferentes técnicas: HPLC, *Shake-flask* e ICP-OES. Esta última foi utilizada para se encontrar a concentração de metal (para o complexo **1**) nas amostras de *Shake-flask*. Um guia para os experimentos com o HPLC também foi utilizado¹⁰⁸. Para a determinação do log P para o complexo **1**, foi usado o método convencional, denominado de “*Shake-flask*”, por ser simples e válido numa ampla faixa de valores ($-4 < \log P < 4$) e pelo fato de poder ser realizado com equipamentos comuns do laboratório, como um espectrofotômetro e uma centrífuga. Nos dias atuais, a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)¹⁰⁹ está sendo utilizada como uma alternativa para o método de *Shake-flask*. Isto, desde que os valores dos parâmetros de retenção log k_w (parâmetro de retenção extrapolando-se a 100% de fase aquosa, $w = \text{water}$) obtidos possam ser corroborados com os valores de log P (por exemplo, obtidos por *Shake-flask* e/ou calculados computacionalmente com o programa ACD/Labs). Neste contexto, usou-se compostos padrões tais como ciclohexanona, álcool benzílico, acetofenona, 2-nitrofenol e p-Cl-fenol para construir uma curva padrão e usá-la tanto para encontrar o valor de log P (usando os valores de log k_w obtidos por HPLC) para os compostos de interesse como para comprovar o método de cálculo de log P usando o programa ACD/Labs (Advanced Chemistry Development Software V8.14, ©1994-2010).

4.2.13.1. Determinação dos valores do coeficiente de partição por *Shake-flask*

Como parâmetro lipofílico, foram determinados os valores de coeficiente de partição do complexo **1** e de vários padrões (ciclohexanona, álcool benzílico, acetofenona, 2-nitrofenol e p-Cl-fenol) pelo método de *Shake-flask*, utilizando-se n-octanol como fase orgânica e água como fase aquosa, procedendo-se de acordo com a literatura¹¹⁰ (Equação 10). Cabe ressaltar, que encontrou-se os valores dos coeficientes de absorvidade molar em n-octanol e água para os

padrões para então encontrarmos os valores de log P. Os valores de ϵ (absortividade molar, $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$) foram obtidos preparando-se cinco soluções de concentrações conhecidas do determinado composto padrão e fazendo-se um gráfico de Abs *versus* b[padrão] {Lei de Beer¹¹¹ **Abs** = ϵbc , em que Abs = valor de absorção num determinado comprimento de onda (λ), b = caminho óptico da cela utilizada (no caso foi de 1 cm) e c é o valor da concentração da solução preparada em mol L^{-1} }. O valor de log P para o complexo **1** foi encontrado de acordo com os dados de concentração obtidos pela técnica ICP-OES de amostras em duplicata de *Shake-flask*.

$$\log P = \log \frac{C_{\text{oct}}}{C_{\text{água}}} \quad (10)$$

em que, C_{oct} é a concentração do composto na fase orgânica (1-octanol) e $C_{\text{água}}$ é a concentração do composto na fase aquosa (água).

4.2.13.2. Determinação dos valores do coeficiente de partição por HPLC

Apesar da grande vantagem da técnica de HPLC e a possibilidade de se encontrar melhores modelos para partições biológicas, a lipofilicidade baseada nesta técnica não pode ser generalizada¹¹². O grande problema reside na criação de uma medida alternativa em relação ao coeficiente de partição octanol-água na variedade de fases estacionárias disponíveis no mercado, isto é, as colunas cromatográficas e da falta de padronização quando se quer realizar comparações inter-laboratoriais dos dados. Para superar estas dificuldades, o sistema cromatográfico necessita ser calibrado usando padrões conhecidos que também permitem os dados de retenção cromatográficos serem convertidos em coeficientes de partição. A reprodutibilidade das várias fases estacionárias comercialmente conhecida, de automação e confiabilidade da instrumentação do HPLC moderno tornam possível explorar plenamente as vantagens da técnica para reunir uma grande quantidade de dados de lipofilicidade de uma forma reprodutível. No entanto, isto também requer um consenso para a normalização¹¹².

A coluna cromatográfica usada foi C-18 (Phenomenex) e a fase móvel foi metanol/água em diversas proporções com 0,01% de HTFA (ácido trifluoracético, Aldrich) em ambas as fases. A proporção de metanol na fase móvel foi variada na faixa de 50 a 90% v/v para a investigação dos tempos de retenção dos padrões e do complexo **1**. O fluxo da fase móvel foi mantido a 0,3 mL min⁻¹, cada injeção envolveu 20 µL de amostra (compostos dissolvidos na mesma fase móvel) e todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente (~22 °C). O fator de retenção, k , foi calculado por:

$$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad (11)$$

em que, k é o fator de retenção, t_r é o tempo de retenção da amostra e t_0 é o tempo morto da coluna obtido pela injeção do composto tirosina ($t_0 = 1,75$ min). Vale ressaltar que cada valor de t_r foi obtido em duplicada.

4.2.13.3. Determinação de log k_w

As investigações da retenção cromatográfica em eluente que contenha diferentes concentrações permitem obter parâmetros que indiquem as diferenças em estrutura de diferentes compostos e especialmente a hidrofobicidade dos mesmos¹¹³. A dependência da retenção cromatográfica representada por log k com o volume da fração do solvente orgânico usado na fase móvel é frequentemente descrito por uma equação linear:

$$\log k = \log k_w - S \cdot \varphi \quad (12)$$

em que, log k_w é o fator de retenção do composto em água pura (100% água) obtido pela extrapolação da curva de regressão (coeficiente linear), S é o valor do coeficiente angular da curva de regressão e φ é a fração em volume de metanol na fase móvel. O valor de log k_w é amplamente usado como parâmetro de hidrofobicidade cromatográfico.

4.2.14. Estudos de citotoxicidade em células

Estes estudos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco da FFCLRP/USP-Ribeirão Preto. Os estudos envolvendo cultura de células foram realizados com a linhagem neoplásica de macrófagos J774-A1 (American Type Culture Collection, ATCC). Este tipo de células plasmáticas linfóticas foi obtido originalmente de ratos DBA/2. A indução deste tipo de neoplasma (câncer linfótico) é feita, normalmente, pela injeção de metilcolantreno na cavidade torácica de ratos. A remoção do fluido, presente na cavidade após dois dias e a transfusão para outros animais, garante a proliferação deste tipo de células. Os estoques primários cultivados em laboratório, a partir das matrizes animais, foram analisados e comercializados pela ATCC.

Para o cultivo da linhagem J774-A1 foi utilizado o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 1X alta glucose (Gibco®) com glutamina, suplementado com soro fetal bovino (BSA) inativado estéril (Cultilab) a 10 %, Penicilina/Estreptomicina a 1 % (Cultilab), anfotericina (Cultilab) a 1.0 %. Ao final da adição de todos os componentes, esse meio foi filtrado, utilizando-se uma membrana de 0,22 µm em capela de fluxo e posteriormente distribuído em garrafas de vidro estéreis, contendo cada uma 90,0 mL de DMEM, sendo que, antes da sua utilização, o meio de cultura foi enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL).

A solução de soro bovino fetal foi pré-aquecida a 56°C, para inativação das enzimas. Em seguida foi 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.

4.2.14.1. Diagrama de crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas

A cultura celular de macrófagos neoplásicos J774-A1 foi estabelecida em garrafas para cultura celular de 75 cm² (Corning), utilizando-se meio DMEM. As células foram cultivadas até atingirem confluência e retiradas das garrafas de cultura com auxílio de rodilho sob tampão Hank's 1X (Cultilab). As mesmas foram ressuspensas em meio de cultura e replaqueadas. O meio foi suplementado de duas a três vezes por semana.

Após esta etapa, o meio contendo as células foi adicionado em um tubo Falcon e centrifugado a 25°C com rotação constante de 400 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso com 10,0 mL de meio completo; as células, então, foram distribuídas em placas de cultura.

A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário. Quando o número médio de células atingia $1,5 \times 10^6$ células mL⁻¹, ou preparava-se uma nova subcultura de células ($0,5 \times 10^6$ células mL⁻¹) ou congelava-se as mesmas.

Fez-se os estudos com os complexos em estudo em triplicata. Para isso, preparou-se uma solução de cada um dos complexos em tampão de potássio-hidróxido de sódio (H₂KPO₄ e NaOH) pH 7,0 na concentração de 0,1 mM. Porém, para as análises de citotoxicidade nas células utilizou-se concentrações de 1,0 μmol L⁻¹ e 5,0 μmol L⁻¹ partindo-se da solução do complexo anteriormente descrita (de 0,1 mM).

4.2.14.2. Aparelhagem

Os trabalhos rotineiros com culturas celulares foram realizados numa capela de fluxo laminar vertical Pachane esterilizada com radiação germicida ultravioleta e fluxo contínuo de ar. Também se utilizou os seguintes aparelhos nos

estudos de cultura e crescimento celular: para o monitoramento celular foi empregado um microscópico óptico Axiovert 40 CFL da Zeiss; os estudos de viabilidade celular foram determinados utilizando-se um leitor espectrofotométrico para protocolos de ELISA, Safire (TEKAN); como fonte de luz para os experimentos fotoquímicos foi utilizado um fotopolimerizador Dabi Atlante modelo Ultralux adaptado com filtros especiais para irradiação na região de 450 a 600 nm. As doses de energia foram calculadas (3 J/cm^2 e 10 J/cm^2), previamente a aplicação, utilizando-se um power meter digital com cabeça de detecção modelo Field Master da Coherent.

4.2.14.3. Viabilidade Celular – MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio brometo) baseia-se na detecção do crescimento e morte celular, de acordo com a capacidade mitocondrial em converter o sal de tetrazolio MTT em um metabólito de coloração roxa, Formazan, que pode ser detectado espectrofotometricamente com absorção em 570 nm. A estratégia da técnica depende da atividade mitocondrial das células vivas, que está diretamente relacionada com o metabolismo que resulta na produção do Formazan. Depois de estabelecida a fase de confluência (72 horas), as células foram soltas e plaqueadas em placas de 24 poços em DMEM completo, permanecendo-se então em incubadora por 24 horas para adesão. As células foram incubadas por 4 horas (37°C e $5\% \text{ CO}_2$) com os complexos em DMEM, avaliando-se as concentrações de $1,0$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Após a etapa de incubação, o meio de cultura foi descartado e as células cuidadosamente lavadas com solução de Hank's (1 ml/poço). Na seqüência, foram adicionados $250 \mu\text{L/poço}$ de solução de MTT ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ previamente dissolvidos em Hank's), sendo incubadas por 4 horas. Após este período foram adicionados $750 \mu\text{L}$ de isopropanol para dissolução total do Formazan formado. Em seguida, as placas de 24 poços foram lidas em leitor do tipo ELISA (Safire – Tekan) em 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a relação: $\% \text{ células viáveis} = (\text{D.O.}_{\text{amostra}}/\text{D.O.}_{\text{controle}}) \times 100\%$, sendo $\text{D.O.}_{\text{amostra}}$ = a absorbância do Formazan em 570 nm; $\text{D.O.}_{\text{controle}}$ = a absorbância do controle (células em meio de cultura sem adição de formulação).

Os resultados foram realizados em triplicada ($n = 3$), como já dito anteriormente, e as variáveis estatísticas foram calculadas e analisadas diretamente no programa *Prism 3.0* através dos testes de análise de variância (*One-way Anova*) sendo *Turkey* o pós-teste aplicado.

A Figura 1 mostra uma foto do experimento realizado usando o polimerizador como fonte de luz.

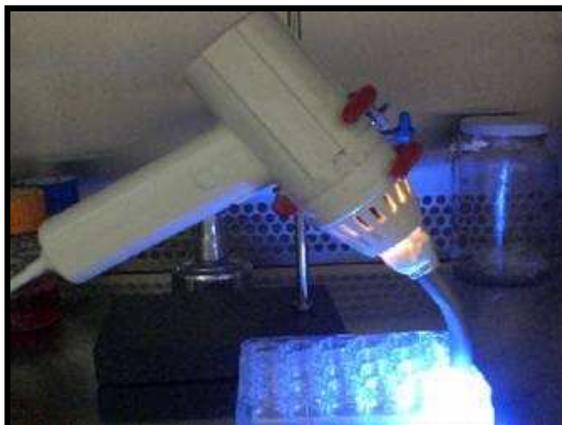


Figura 1: Ilustração do experimento com células J774-A1, em destaque o polimerizador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

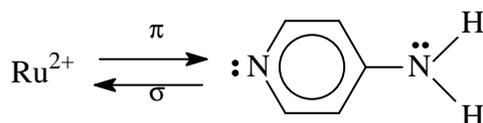
5.1. Preparação e caracterização dos complexos polipiridínicos de Ru(II)

5.1.1. Sínteses

O Esquema 1 mostra as etapas de preparação do complexo **1** [(α -diimina) = phen)]. Para os complexos **2-4** seguiu-se o mesmo procedimento, com os respectivos ligantes (α -diimina) = Ph₂phen (Complexo **2**), bpy (Complexo **3**) e Me₂bpy (complexo **4**).

5.1.1.1. A ligação Ru—N: Ru—NH₂ ou Ru—(N—heterocíclico)?

Segundo a teoria ácido-base de Lewis, Ru(II) é deficiente de elétrons, portanto um grupo ácido¹¹⁴. Então, a sua coordenação preferencial seria por ligantes básicos (doadores de elétrons). Em princípio seria possível dois tipos de ligação ao centro metálico: Ru-N_I (N do anel do ligante 4Apy) ou Ru-N_{II} (N do grupo NH₂). O valor de pK_a¹¹⁵ do N_{II} é 9,4, bastante básico portanto. Por um efeito de ressonância, o N_I localizado na posição 1 do anel seria mais básico e portanto um doador σ mais forte. Ao mesmo tempo, uma vez que N_I está ligado ao anel da 4Apy, terá a possibilidade de retrodoação π com o centro metálico (Esquema 3). Portanto, o metal prefere ligar-se ao N do anel do ligante 4Apy (Ru-N_I).



Esquema 3: Representação da ligação σ e retrodoação π para Ru-N

5.1.1.2. A geometria dos complexos formados: *cis* ou *trans*?

A proposta dos complexos polipiridínicos serem *cis* pode ser explicada pela distribuição de densidade eletrônica na molécula: o ligante 4Apy é um melhor doador σ que os ligantes phen (pK_a = 4,93), Ph₂phen (pK_a = 4,80), bpy (pK_a = 4,40) e Me₂bpy (pK_a = 4,90). Desta forma, a presença de duas moléculas de 4Apy em posição σ resulta numa estabilização σ de densidade eletrônica no centro metálico.

5.2. Investigações Estruturais para os complexos 1 e 3 – Estudos de Difração de Raios-X

Cristais dos complexos **1** e **3** foram obtidos pela evaporação lenta de uma solução concentrada do complexo (**1**, ~5 mg em 1,0 mL de 1:1 EtOH/CH₂Cl₂ e **3**, ~12 mg em 1,0 mL de CD₃CN). Esta composição foi mantida a temperatura

ambiente, no escuro, por cerca de 30 (trinta) dias quando se observou o aparecimento de cristais convenientes para análise de raio-X. A Tabela 1 mostra os comprimentos e ângulos de ligação para os complexos 1 e 3 e também os dados experimentais para o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ em CH_3CN . A Figura 2 mostra as projeções ORTEP para os referidos complexos. Para efeitos de comparação os dados obtidos pelos cálculos computacionais de otimização da geometria destes complexos estão descritos na Tabela 2.

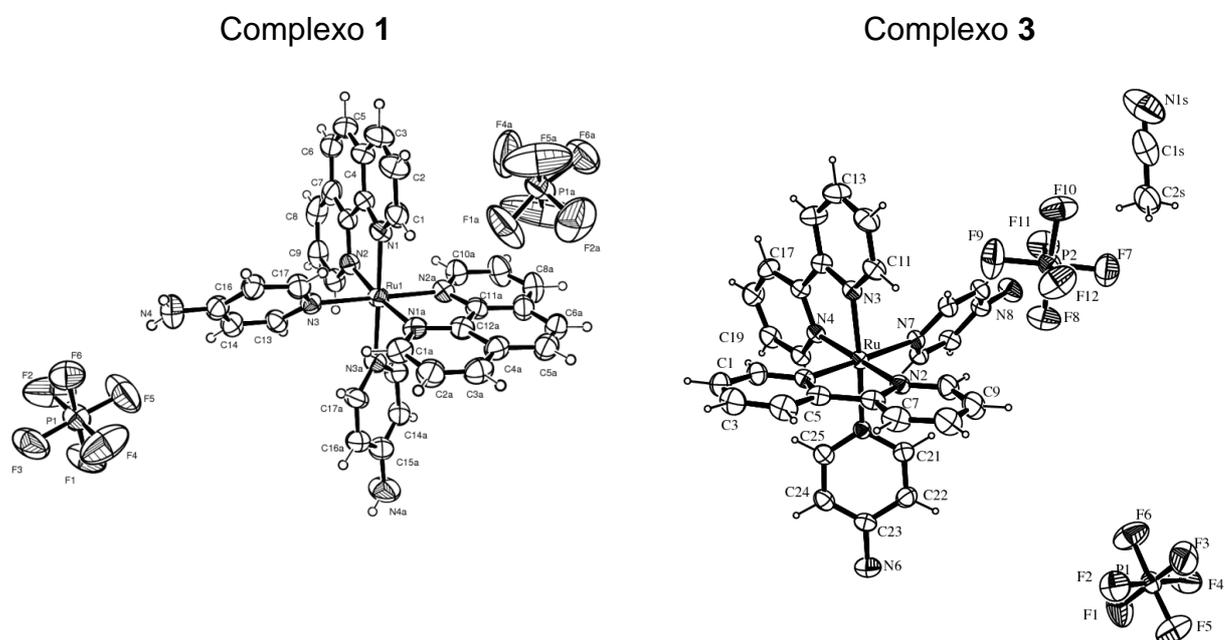


Figura 2: Projeções ORTEP para os complexos 1 e 3.

Tabela 1: Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para os complexos **1** e **3** e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ obtidos de dados experimentais de raio-X.

Complexos				
Comprimento de ligação / Å				
Ligação	$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ^a	<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{4Apy})_2]^{2+}$	<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{4Apy})_2]^{2+}$	
Ru–N(L)*	2,056(2)	2,046(3)	2,065(5)	Ru–N2A
		2,059(3)	2,087(5)	Ru–N1A
		2,059(3)	2,082(5)	Ru–N2
		2,062(3)	2,054(5)	Ru–N1
Ru–N(L')**	–	2,120(3)	2,117(5)	Ru–N3
		2,105(3)	2,103(4)	Ru–N3A
C(L')–N(NH ₂)	–	1,385(6)	1,352(9)	C15A–N4A
		1,355(6)	1,340(1)	C15–N4
Ângulos de ligação / °				
(L)–Ru–N(L) ligante <i>trans</i>	173,0(1)	173,56(13)	173,8(2)	N1A–Ru–N2
(L)–Ru–N(L) mesmo ligante	78,7(1)	79,23(13)	79,4(2)	N1A–Ru–N2A
		78,93(13)	79,6(2)	N1–Ru–N2
(L)–Ru–N(L) ligantes diferentes	89,1(1)	87,76(13)	89,9(2)	N1–Ru–N2A
(L)–Ru–N(L') posição <i>cis</i>	–	86,81(12)	85,8(2)	N1A–Ru–N3A
(L)–Ru–N(L') posição <i>trans</i>	–	175,53(12)	176,7(2)	N2A–Ru–N3
(L')–Ru–N(L')	–	91,75(12)	91,8(2)	N3A–Ru–N3
Ângulo Diedral [#] / °				
Ligante		<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{4Apy})_2]^{2+}$	<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{4Apy})_2]^{2+}$	
(L)*–(L)*		88,39	87,59	
(L')**–(L')**		53,61	59,47	
(L1)*–(L'1)**		88,46	82,37	
(L1)*–(L'2)**		53,19	56,38	
(L2)*–(L'1)**		52,90	56,37	
(L2)*–(L'2)**		88,38	82,37	

* (L) = Nitrogênio do anel do ligante 2,2'-bipiridina ou 1,10'-fenantrolina.

** (L') = Nitrogênio do anel do ligante 4-aminopiridina.

[#] Ângulo Diedral obtido a partir da estrutura otimizada em CH₃CN (DFT, B3LYP/LanL2DZ).

^a STOYANOV, S. R.; VILLEGAS, J. M.; RILLEMA, D. P. "Density Functional Theory Calculations of Selected Ru(II) Two Ring Diimine Complex Dications". *Inorganic Chemistry*, **41** (11), 2941-2945, 2002.

Os complexos, **1** e **3**, possuem arranjos geométricos bastante similares. Cada complexo apresenta o átomo de Ru ligado a duas moléculas do ligante α -diimina na configuração *cis* juntamente com os ligantes 4Apy. Para o complexo **1**, a molécula α -diimina1 (caracterizada pelo N1A_{eq} and N2A_{eq}, eq = posição equatorial), um átomo de nitrogênio piridínico do ligante α -diimina2 (N2_{eq}), um átomo de nitrogênio piridínico do ligante 4Apy (N3_{eq}) e o átomo de Ru estão no plano equatorial. O outro nitrogênio piridínico do ligante 4Apy (N3A_{ax}, ax = posição axial) está *trans* a unidade piridínica do ligante α -diimina2 (N1_{ax}) localizado na posição axial. Os complexos são caracterizados por simetria C₁.

A coordenação nos complexos corresponde a um arranjo octaédrico dos ligantes na esfera de coordenação do metal. Para o complexo **3**, o arranjo é um pouco distorcido, possuindo o ângulo N1_{eq}(bpy1)-Ru-N7_{eq}(4Apy) (posição *trans*) igual a 176,41°. Comparando-se os complexos **1** e **3**, as distâncias de ligação Ru–N(phen) (complexo **1**), 2.065, 2.087, 2.082 and 2.054 Å são relativamente mais longas em relação às ligações Ru–N(bpy) (complexo **3**).

Nas estruturas dos complexos, os ligantes α -diimina coordenados são aproximadamente planares; os desvios das posições atômicas no plano são todas menos que 2°. As duas moléculas de α -diimina estão quase perpendiculares entre si, como indicado pelos ângulos diedrais (87,59° no complexo **1** e 88,39° no complexo **3**). No complexo **3** cada subunidade piridina para cada ligante bpy é distorcido de 1,20° e 1,51°.

Os ângulos diedrais mostrados na Tabela 1 não levam a distorções significativas nas estruturas dos complexos de forma a minimizar o efeito estérico do ligante phen. A Figura 2 mostra uma leve rotação dos ligantes 4Apy em relação aos planos do ligante do ligante bpy. Efeito similar também foi observado para o complexo com o ligante phen.

Estes resultados mostram que as estruturas cristalográficas dos complexos **1** e **3** são similares.

Os comprimentos e ângulos de ligação obtidos por cálculos computacionais (Tabela 2) são concordantes com os dados experimentais validando a metodologia computacional usada.

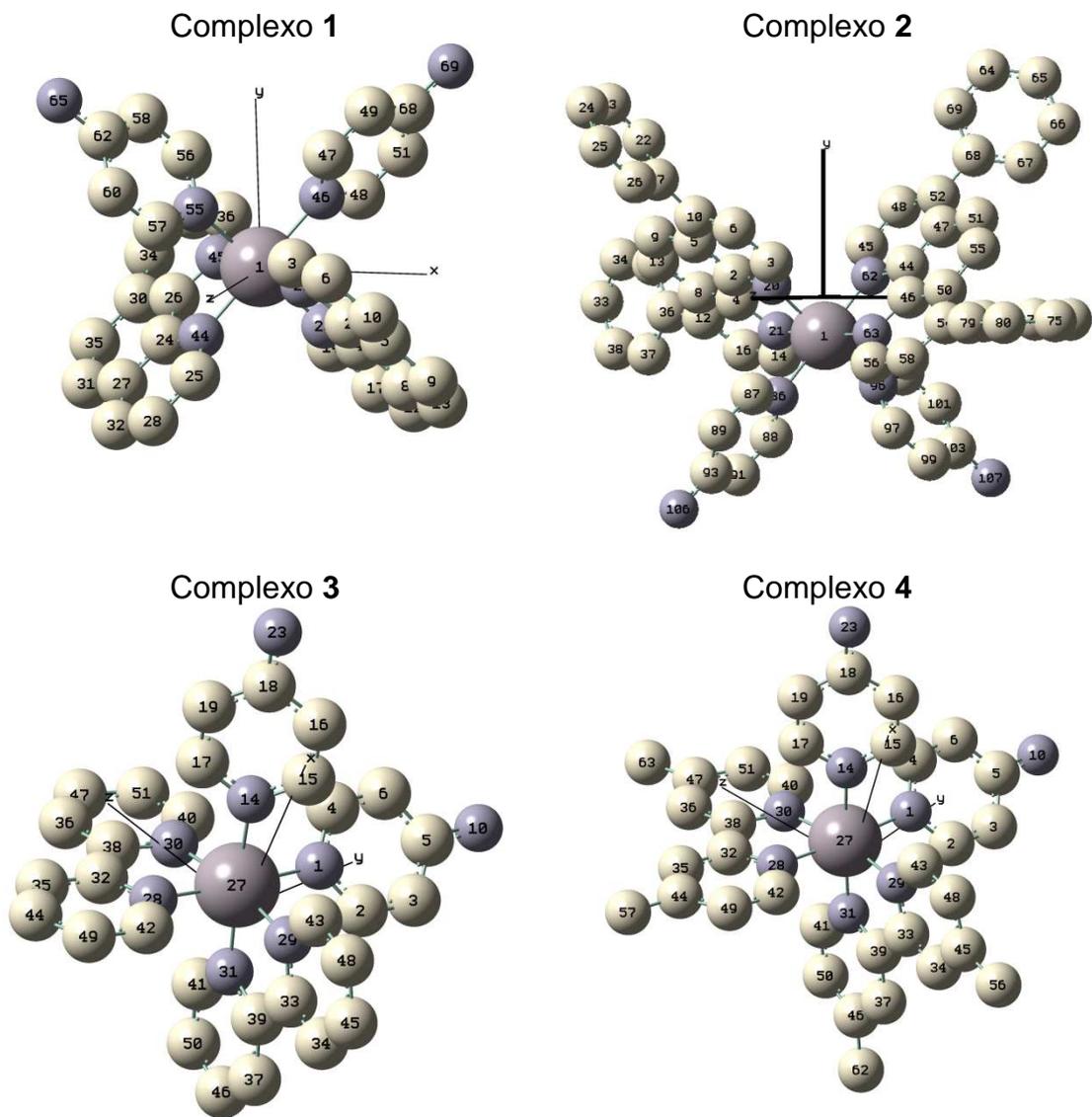


Figura 3: Geometrias otimizadas dos complexos 1-4 em CH_3CN (DFT, B3LYP/LanL2DZ) (os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza).

Tabela 2: Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para os complexos **1-4** obtidos de cálculos computacionais (geometria otimizada) em CH₃CN.

Complexo				
Ligação	Comprimento de ligação / Å			
	1	2	3	4
Ru–N(L)*	2,1077	2,1002	2,0907	2,0901
	2,0972	2,0866	2,1098	2,1105
	2,0972	2,1019	2,0900	2,0892
	2,1077	2,0875	2,1082	2,1090
Ru–N(L')**	2,1449	2,1475	2,1588	2,1596
	2,1448	2,1494	2,1597	2,1581
C(L')–N(NH ₂)	1,3698	1,3699	1,3695	1,3702
	1,3698	1,3698	1,3695	1,3703
Ângulos de ligação / °				
(L1)*–Ru–N(L2)* ligante <i>trans</i>	174,44	174,35	169,31	169,08
(L1)*–Ru–N(L1)* mesmo ligante	79,45	78,92	78,53	78,40
	79,45	78,90	78,50	78,36
(L1)*–Ru–N(L2)* ligante diferente	96,52	97,04	93,82	93,79
	88,33	88,48	89,78	89,62
(L1)*–Ru–N(L')** posição <i>cis</i>	86,64	86,53	91,11	91,09
	90,09	89,94	91,06	91,07
(L2)*–Ru–N(L')** posição <i>cis</i>	90,09	89,99	91,19	90,98
	86,64	86,41	91,02	91,14
(L)*–Ru–N(L')** posição <i>trans</i>	176,15	175,88	175,00	175,07
	176,15	175,85	174,99	175,05
(L')**–Ru–N(L')**	91,70	91,84	88,58	88,75

* (L) = Nitrogênio do anel dos ligantes 1,10'-fenantrolina, 4,7-difenil-1,10'-fenantrolina, 2,2'-bipiridina ou 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina;

** (L') = Nitrogênio do anel do ligante 4-aminopiridina.

5.3. Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-vis

Os espectros de absorção eletrônica UV-vis para os complexos **1 a 4** (Figura 4) mostram dois conjuntos de absorções distintos, um na região de 210-230 nm (não mostrado na Figura 4) e outro na região de 400-600 nm.

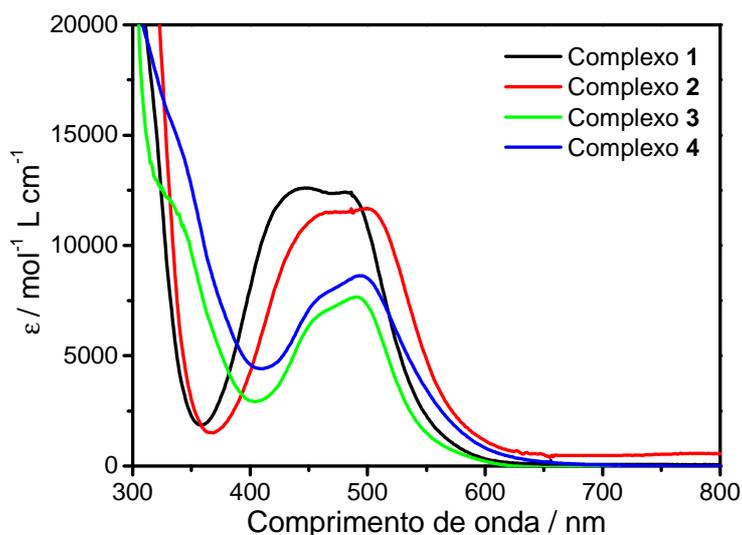


Figura 4: Espectros de absorção eletrônica dos complexos **1**, **2**, **3** e **4** em CH₃CN.

De acordo com os dados experimentais (Figura 4), na região do visível, os complexos com o ligante phen e Ph₂phen, complexos **1** e **2**, apresentam uma banda intensa com $\lambda_{\text{máx}}$ 480 e 500 nm, respectivamente, enquanto que os complexos com o ligante bpy e Me₂bpy, complexos **3** e **4**, apresentam uma banda similar a 490 nm. Essas bandas são moderadamente sensíveis ao solvente. Para ambos os complexos com os ligantes bpy e phen, um deslocamento para a região do vermelho com o aumento da contribuição eletrônica do substituinte (Me- < H- < Ph-) é observado. O deslocamento para o vermelho é devido a organização estrutural do ligante phen quando se compara o mesmo com o ligante bpy, o qual é uma molécula com menor rigidez e a maior força do campo ligante do ligante phen em relação a bpy. Este resultado é consistente com a redução do valor do GAP de energia HOMO-LUMO para o ligante bpy quando comparado com a phen (item 5.8).

Em relação aos espectros para os complexos **3** e **4**, há um fraco efeito do substituinte na região da posição do visível no espectro: o espectro do complexo **3** é praticamente idêntico ao do complexo **4**.

5.4. Experimentos de Fotólise Relâmpago

Os espectros de absorção transiente/intermediários (Figura 5) dos estados excitados obtidos para os complexos **1** a **4** em acetonitrila com excitação com pulsos de laser de 8 ns a 355 nm são similares aos respectivos complexos $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_3]^{2+}$ relatados na literatura. Para o complexo **1**, por exemplo, as medidas de absorção de transiente resultaram no decaimento da absorção na região de 480 nm ($\lambda_{\text{máx}}$) e a formação de uma absorção na região de 370 nm e 555 nm consistente com a formação do estado excitado do tipo MLCT (Ru→phen ou Ru→bpy). O estado excitado ao redor de 600-700 nm corresponde a emissão de luz a partir da relaxação do estado excitado para o estado fundamental¹¹⁶. O decaimento bi-exponencial observado para estes transientes é concordante com os dois tempos de vida de emissão obtidos (discussão no item 5.5.) confirmando que estas emissões surgem de transições eletrônicas do tipo ³MLCT (Ru→phen ou Ru→bpy).

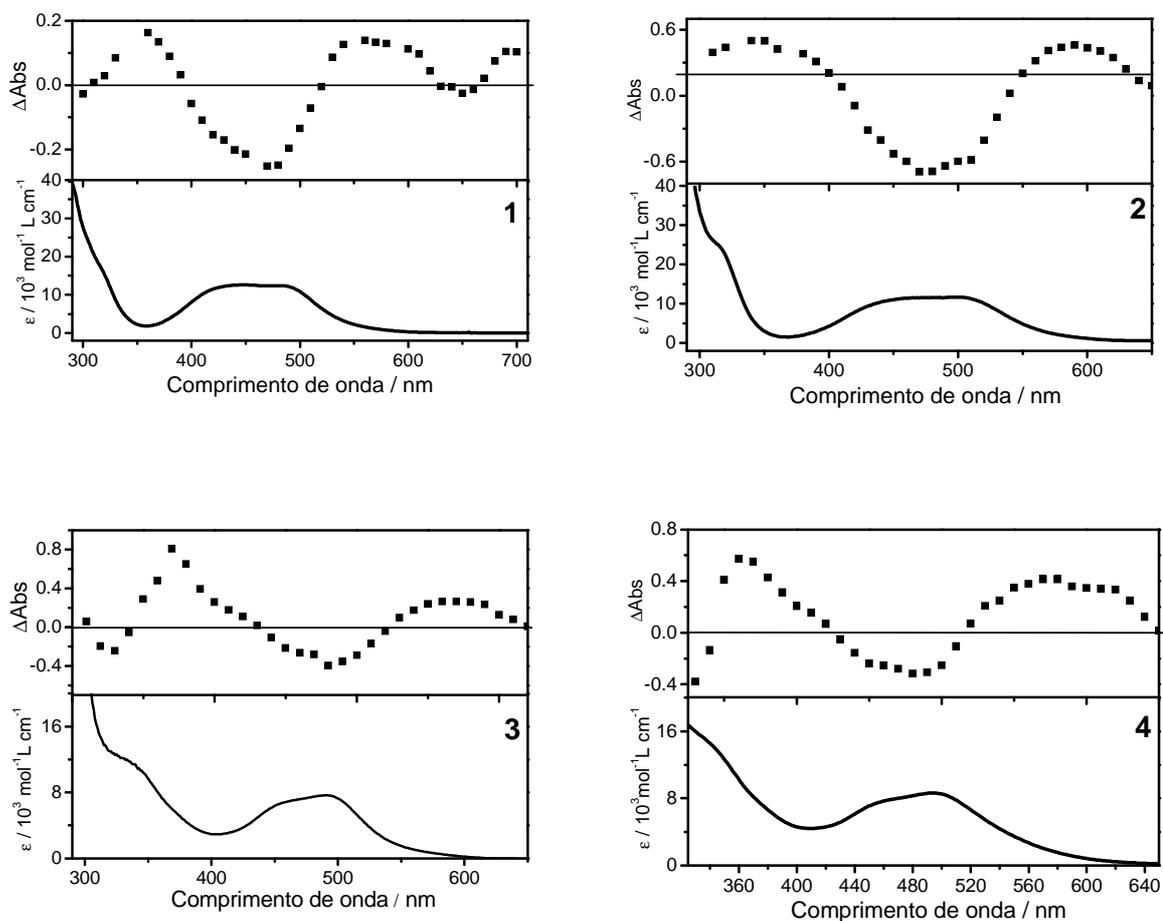


Figura 5: Espectro de absorção no estado excitado (acima) e fundamental (abaixo) para os complexos **1-4** em CH_3CN .

5.5. Luminescência:

5.5.1. Estado Estacionário

Os complexos de **1** a **4** quando excitados a 500 nm (λ_{exc}) apresentam uma banda de emissão intensa e larga com um máximo ao redor de 660 nm (Figura 6). O espectro de excitação para os quatro complexos ($\lambda_{\text{em}} = 650$ nm, Figura 6 inserido) são similares ao espectro de absorção dos mesmos (Figura 4) indicando que as emissões observadas são originárias de um mesmo estado excitado. Apesar dos espectros de emissão serem independentes do comprimento de onda de

excitação (350 a 500 nm), a emissão é mais intensa quando se excita na região do visível sugerindo que a emissão ocorre de um estado excitado de menor energia com características MLCT, populado por excitação direta ou por conversão interna a partir do estado excitado de menor energia.

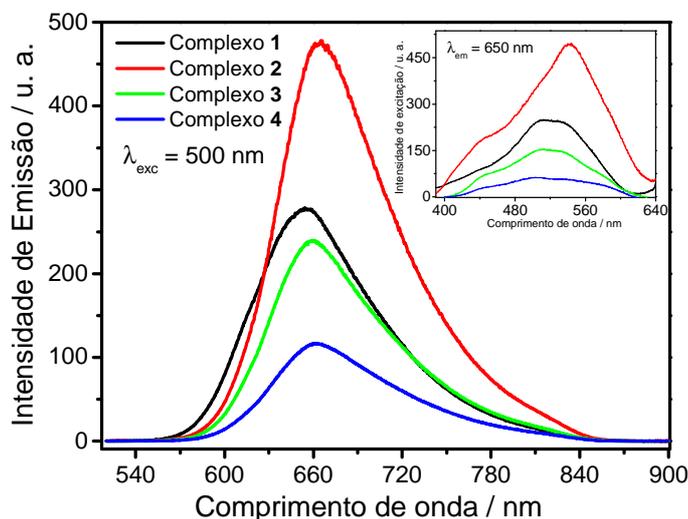


Figura 6: Espectros de emissão e excitação (inserido) dos complexos **1** a **4** obtidos em CH₃CN.

5.5.2. Rendimento Quântico de Emissão:

Usando a Equação 7 calculou-se os valores de rendimento quântico de emissão (ϕ_{em}) para os complexos estudados em CH₃CN. Os valores são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de rendimento quântico de emissão (ϕ_{em}) dos complexos **1-4** obtidos em CH₃CN.

Complexo	ϕ_{em}
(1) <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4Apy) ₂] ²⁺	0,032
(2) <i>cis</i> -[Ru(Ph ₂ phen) ₂ (4Apy) ₂] ²⁺	0,046
(3) <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (4Apy) ₂] ²⁺	0,051
(4) <i>cis</i> -[Ru(Me ₂ bpy) ₂ (4Apy) ₂] ²⁺	0,072

O complexo **2** exibe uma banda de emissão larga e um deslocamento no máximo de emissão para maior comprimento de onda em relação aos outros compostos (Figura 6). Para os complexos em estudo, os valores de ϕ_{em} seguem a ordem: phen (0,032), Ph₂phen (0,046), bpy (0,051), Me₂bpy (0,072) em solução de CH₃CN a temperatura ambiente.

5.5.3. Tempo de vida de luminescência

O perfil do decaimento de emissão ($\lambda_{exc} = 460$ nm e $\lambda_{em} = 660$ nm) em solução de CH₃CN e DMF em temperatura ambiente para os complexos **1-4** foi obtido após um ajuste bi-exponencial, refletindo numa distribuição de dois processos emissivos. Os valores de tempo de vida (em ns) encontrados são mais curtos quando comparados com o do complexo [Ru(phen)₃]²⁺ (500 ns) (Tabela 4, Equação 13, Figura 7).

As curvas de decaimento foram ajustadas por uma soma de exponenciais (Equação 13).

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (13)$$

em que, τ_i é o tempo de vida da componente i do decaimento, e α_i é o correspondente fator pré-exponencial.

Considerando-se o perfil do pulso de excitação, foi feita a deconvolução. A qualidade do ajuste baseou-se no valor de χ^2 : esse valor deve estar próximo de 1,0.

Tabela 4: Valores de tempo de vida (τ / ns) e fator pré-exponencial normalizado (α_i) encontrados para os complexos **1-4** em CH₃CN e DMF ([complexos] = 2,0x10⁻⁵ mol L⁻¹) usando a Equação 13.

Solvente	Complexo	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns	χ^2
CH₃CN	(1)	75,23±0,10	15,6±0,6	-	1,053
	(2)	107,47±5,49	11,25±1,42	665,78±0,63	1,176
	(3)	73,95±0,08	13,8±0,03	-	1,137
	(4)	54,44±0,10	14,5±0,39	-	1,138
DMF	(1)	140,99±0,18	22,84±1,32	-	1,041
	(2)	183,45±15,99	4,27±1,02	949,65±1,17	1,186
	(3)	107,54±0,11	18,55±1,83	-	1,019
	(4)	92,74±0,15	26,5±2,27	-	1,028

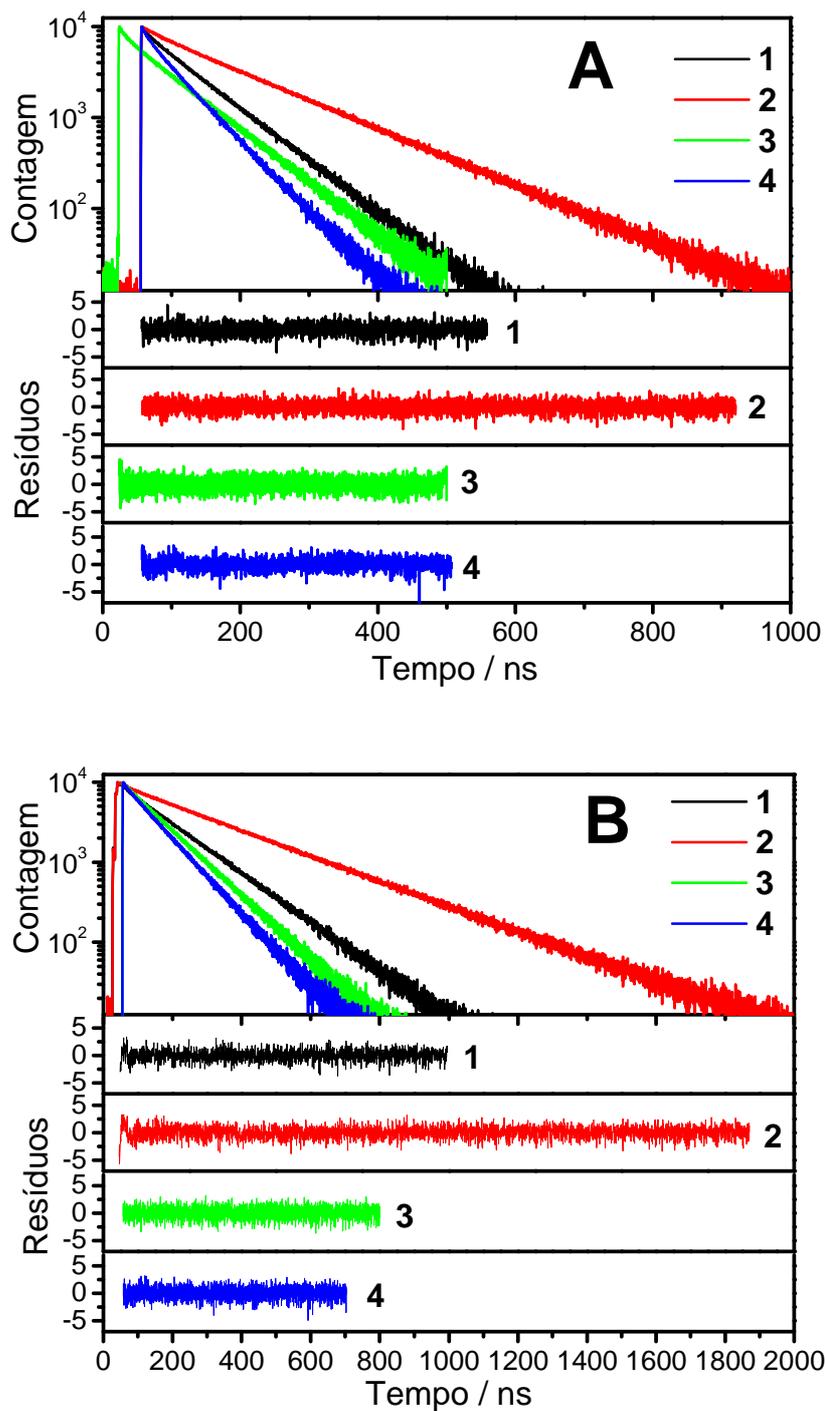


Figura 7: Curvas de decaimento de emissão para os complexos 1-4 em (A) CH₃CN e (B) DMF a 22 °C; $\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$. As curvas de decaimento foram obtidas após um ajuste bi-exponencial (dados na Tabela 4). A qualidade do ajuste está indicada pelos gráficos de resíduos mostrados abaixo das curvas de decaimento.

O tempo de vida de emissão do complexo **2** foi significativamente mais alto que os observados para os outros complexos. Além disso, devido a estes valores, não é possível se obter uma correlação entre os valores de rendimento quântico de emissão e tempos de vida de emissão. Este comportamento sugere a presença de estados excitados de menor energia de característica centrada no ligante ($\pi \rightarrow \pi^*$) próximas aos estados de MC/MLCT. Estes resultados são confirmados pelos cálculos computacionais (item 5.8.) que mostram a presença de uma transição eletrônica centrada no ligante (LLCT, a 3,59 eV) próximo em energia aos estados excitados de MC/MLCT (3,70 eV).

5.6. Eletroquímica e Espectroeletroquímica

Para os complexos **1** e **2** a oxidação do metal ocorre a +1,19 V e +1,17 V vs eletrodo de Ag/AgCl, respectivamente (Figura 8). A oxidação do metal no complexo **3** ocorre a 1,21 V e o complexo **4** a 1,14 V.

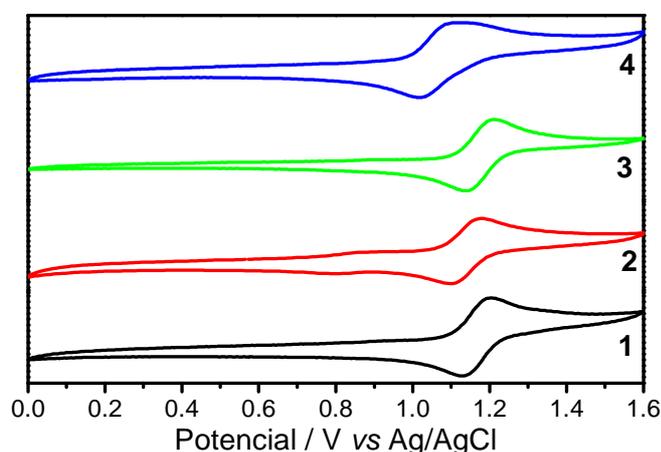


Figura 8: Voltamogramas cíclicos obtidos dos complexos **1-4** em CH_3CN (TBAPF_6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{complexos}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/AgCl).

Os voltamogramas cíclicos de cada complexo mostram um par redox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ (vide Figura 8) e processos de redução do ligante α -diimina (não mostrados na Figura 8), os quais podem ser comparados com resultados obtidos de

complexos análogos de Ru(II)–(α -diimina). Os valores para o par redox Ru^{III}/Ru^{II} são menos positivos em relação aos seus análogos [Ru(II)(α -diimina)₃]²⁺, o que reflete, como esperado, níveis de energia t_{2g} mais elevados.

Com a finalidade de obter mais informações sobre as características das ligações químicas nos complexos de Ru(II) estudados neste trabalho, realizamos experimentos espectroeletróquímicos. Estas medidas confirmaram que a redução do Ru^{III} e oxidação do Ru^{II} revela um processo totalmente reversível.

Para os complexos de Ru(II) aplicou-se potencial constante de 1,3 V numa solução contendo o complexo e o eletrólito de suporte (TBAPF₆). A oxidação do complexo {Ru(II) → Ru(III)} foi monitorada por espectroscopia de UV-vis. Os espectros obtidos durante o decorrer da oxidação dos complexos **1-4** são mostrados na Figuras 9A e 10A. Para o complexo **1**, por exemplo, houve um rápido desaparecimento da banda de MLCT a $\lambda = 490$ e 440 nm e o surgimento de uma banda em 770 nm (334 nm, ombro). Observou-se também a formação de pontos isosbéticos a 570, 383 e 323 nm.

Para todos os complexos estudados, obteve-se pontos isosbéticos sugerindo que a oxidação do metal resulta na formação de apenas uma espécie: [Ru^{III}(α -diimine^{*})₂(4Apy)]²⁺. Após 34 minutos de eletrólise a potencial constante de 1,3 V, o mesmo foi alterado para 0 V a fim de reduzir todo o metal que havia sido oxidado em solução, retornando, desta maneira, para o complexo de partida no estado de oxidação original (+2) (Figuras 9B e 10B). Este procedimento resultou em uma reversão nas alterações espectrais até que o espectro final coincidissem com o inicial e isto foi observado para todos os complexos. Como consequência disto, em relação ao complexo **1**, houve o desaparecimento da banda em 770 nm e crescimento da banda em $\lambda_{\text{máx}} = 490$ nm.

Em relação ao complexo **3**, por exemplo, o espectro de absorção do produto gerado (Ru^{III}) (Figura 10A) durante a aplicação do potencial de 1,3 V possui duas bandas na região do ultravioleta, na região de 280 nm e 360 nm e uma banda intensa na região do visível a 770 nm. Esta observação é compatível com a situação em que o ligante α -diimina perde um elétron: $\lambda_{\text{máx}}$ (bpy-•): 882, 582, 397 nm (máximos das bandas em DMF)¹¹⁷. Estas características se assemelham à absorção do ligante α -diimina: $\pi \rightarrow \pi^*$ a ~800 nm. A absorção de intensidade baixa na região

do visível é atribuída a transição de LMCT (transferência de carga do ligante para o metal)^{118,119,120}: α -diimina \rightarrow Ru(III); $\pi \rightarrow t_{2g}$.

As reações químicas envolvidas nos estudos espectroeletroquímicos no solvente DMF, para todos os complexos, podem ser representadas pela equação:

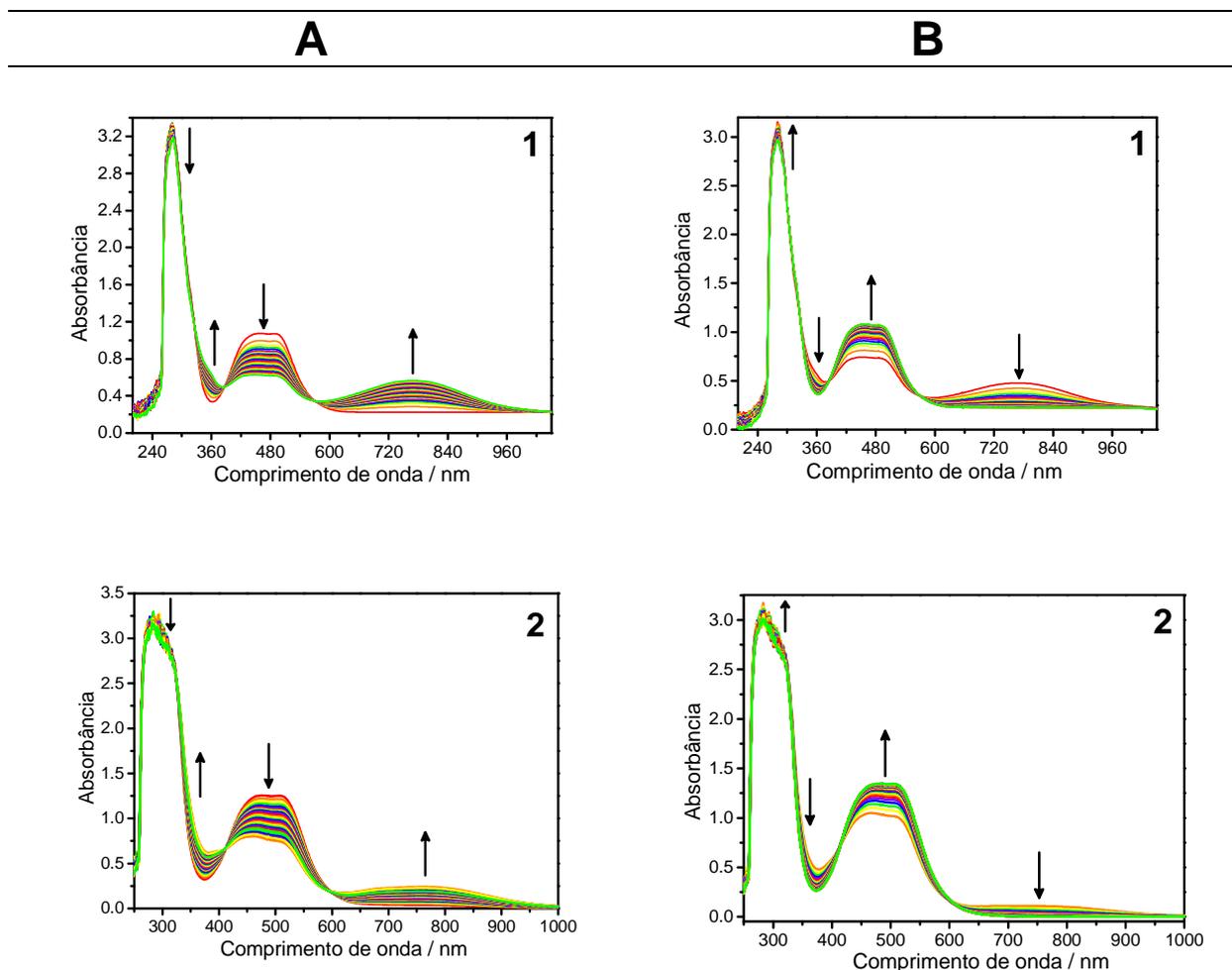
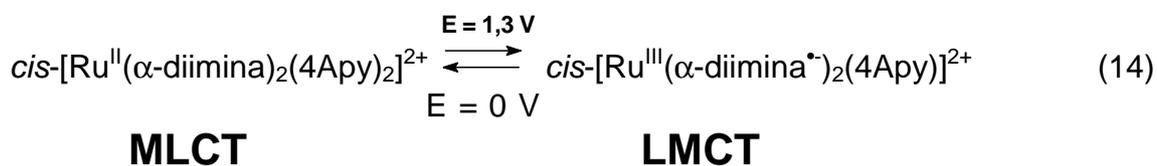


Figura 9: Espectroeletroquímica dos complexos **1** e **2** em DMF ([complexo] = 0,22 mM, 0,1 mol L⁻¹ TBAPF₆): **(A)** oxidação, E_{aplicado} = 1,3 V, t = 0 a 34 min; **(B)** redução, E_{aplicado} = 0 V, t = 0 a 34 min.

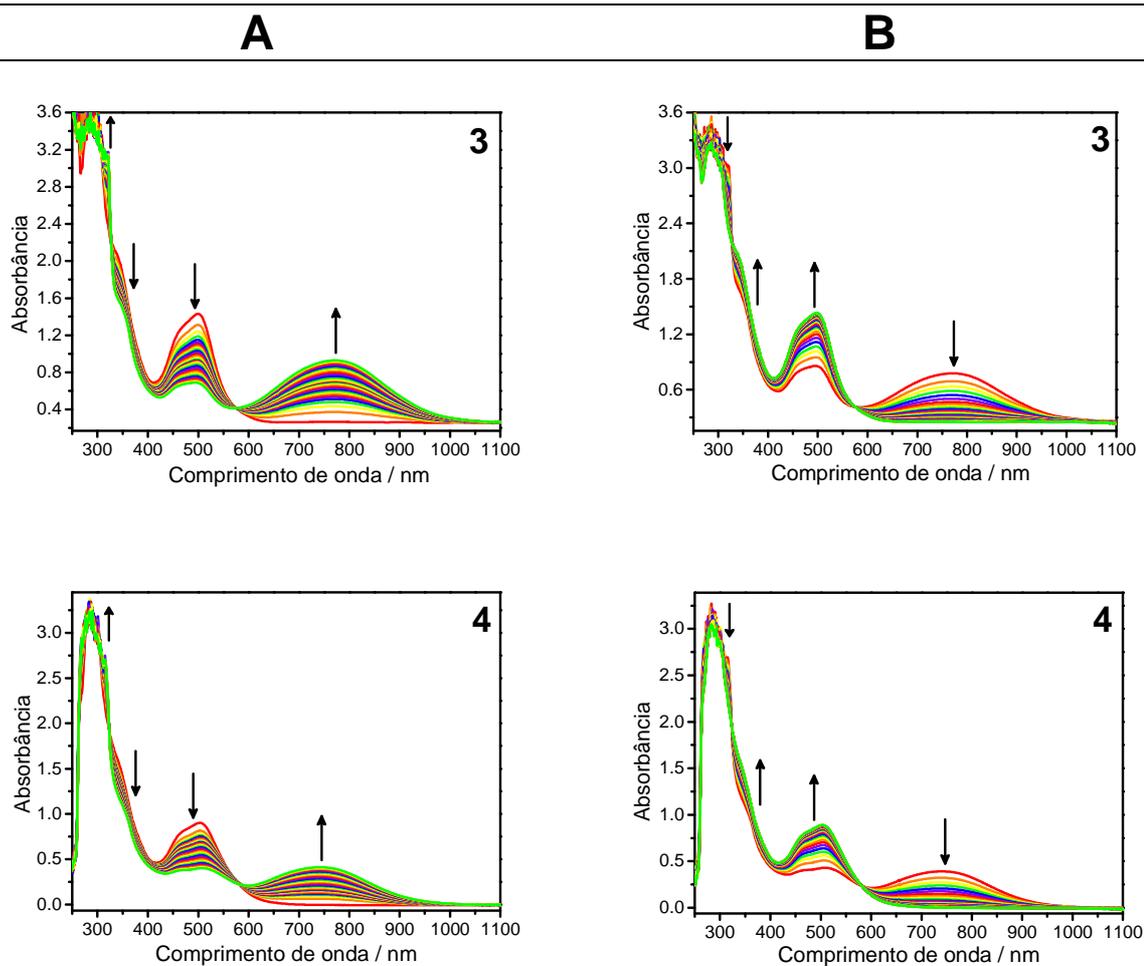


Figura 10: Espectroeletróquímica dos complexos **3** e **4** em DMF ($[\text{complexo}] = 0,22 \text{ mM}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ TBAPF}_6$): **(A)** oxidação, $E_{\text{aplicado}} = 1,3 \text{ V}$, $t = 0$ a 34 min ; **(B)** redução, $E_{\text{aplicado}} = 0 \text{ V}$, $t = 0$ a 34 min .

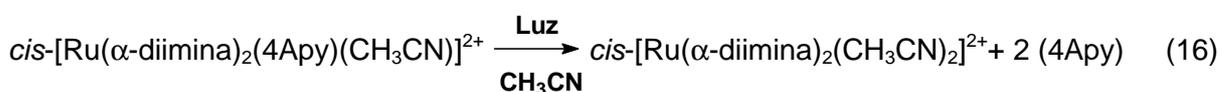
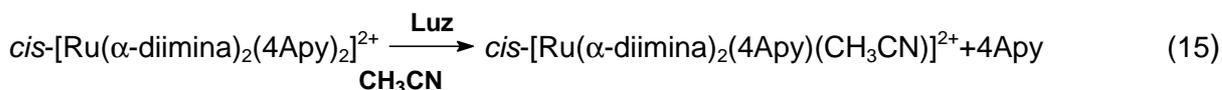
5.7. Comportamento Fotoquímico

5.7.1. Fotólises contínuas

5.7.1.1. Fotólise contínua acompanhada pela técnica de UV-vis e luminescência

Os complexos **1** a **4** são termicamente estáveis em soluções aquosas e não aquosas, porém são fotoreativos. A reatividade fotoquímica é dependente somente do ligante α -diimina.

Quando soluções dos complexos **2** a **4** em CH_3CN foram submetidas a fotólise contínua e o acompanhamento realizado por espectroscopia de absorção UV-vis, o resultado forneceu mudanças espectrais que foram consistentes com a substituição de somente uma molécula do ligante 4Apy por uma molécula de solvente (Equação 15)Error! Reference source not found..



A Figura 11 ilustra as mudanças espectrais obtidas quando soluções dos complexos **2-4** em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram irradiadas com luz de 420 nm, $I_i = 1,24 \times 10^{-8} \text{ einstein s}^{-1}$. Por exemplo, para o complexo **2**, o espectro mostra um decaimento progressivo da banda característica de absorção a 500 nm concomitantemente com um deslocamento para a região do azul a 440 nm (Figura 11). Fotólise exaustiva leva a um espectro estável no final. Com base no pressuposto de que um único produto foi formado (veja abaixo), o coeficiente de extinção molar de sua banda característica foi calculado e obteve-se o valor de $5,77 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Bandas similares a 440 nm foram relatadas previamente para complexos de Ru(II)–(4Apy). Vale ressaltar que a reação não volta ao reagente inicial quando a solução deixa de ser irradiada.

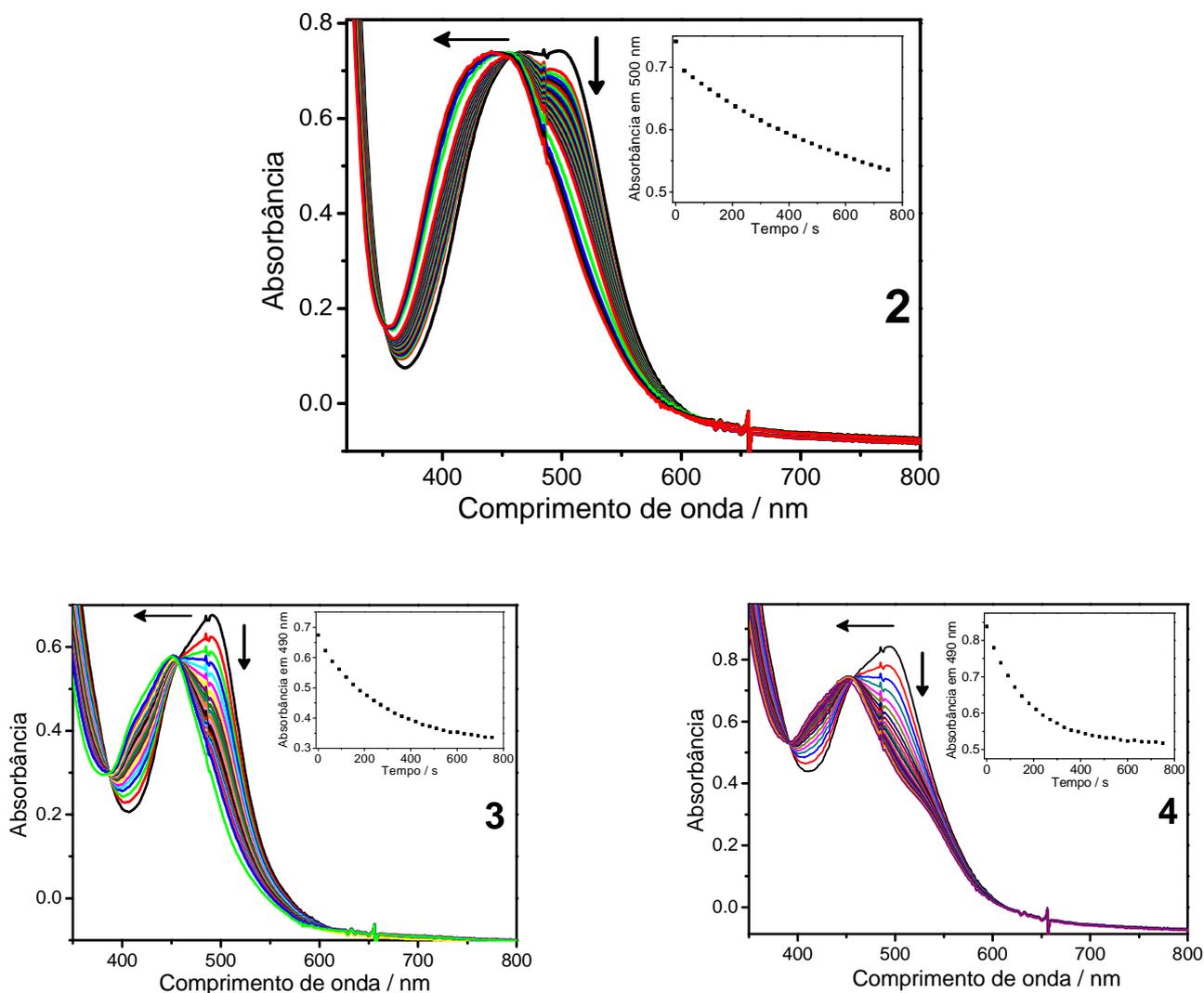


Figura 11: Espectros de absorção eletrônica UV-vis obtidos durante fotólise contínua em 420 nm para os complexos **2-4** em solução de CH₃CN (inserido: gráficos de Abs_{λ_{máx}} vs tempo).

Quando soluções análogas irradiadas a 420 nm foram monitoradas por espectroscopia de luminescência, a banda máxima de emissão ao redor de 660 nm desaparece, e nenhuma nova banda aparece na região (Figura 12). As mudanças espectrais de UV-vis destas soluções foram obtidas como descrito acima, e gráficos relacionando as mudanças de intensidade dos espectros óticos versus as mudanças

no máximo de emissão apresentaram aspecto linear (Figura 12 inserido), implicando a correspondência de 1 para 1 na reação fotoquímica observada [$R^2 = 0,997$ (complexo **2**); 0,991 (complexo **3**) e 0,997 (complexo **4**)].

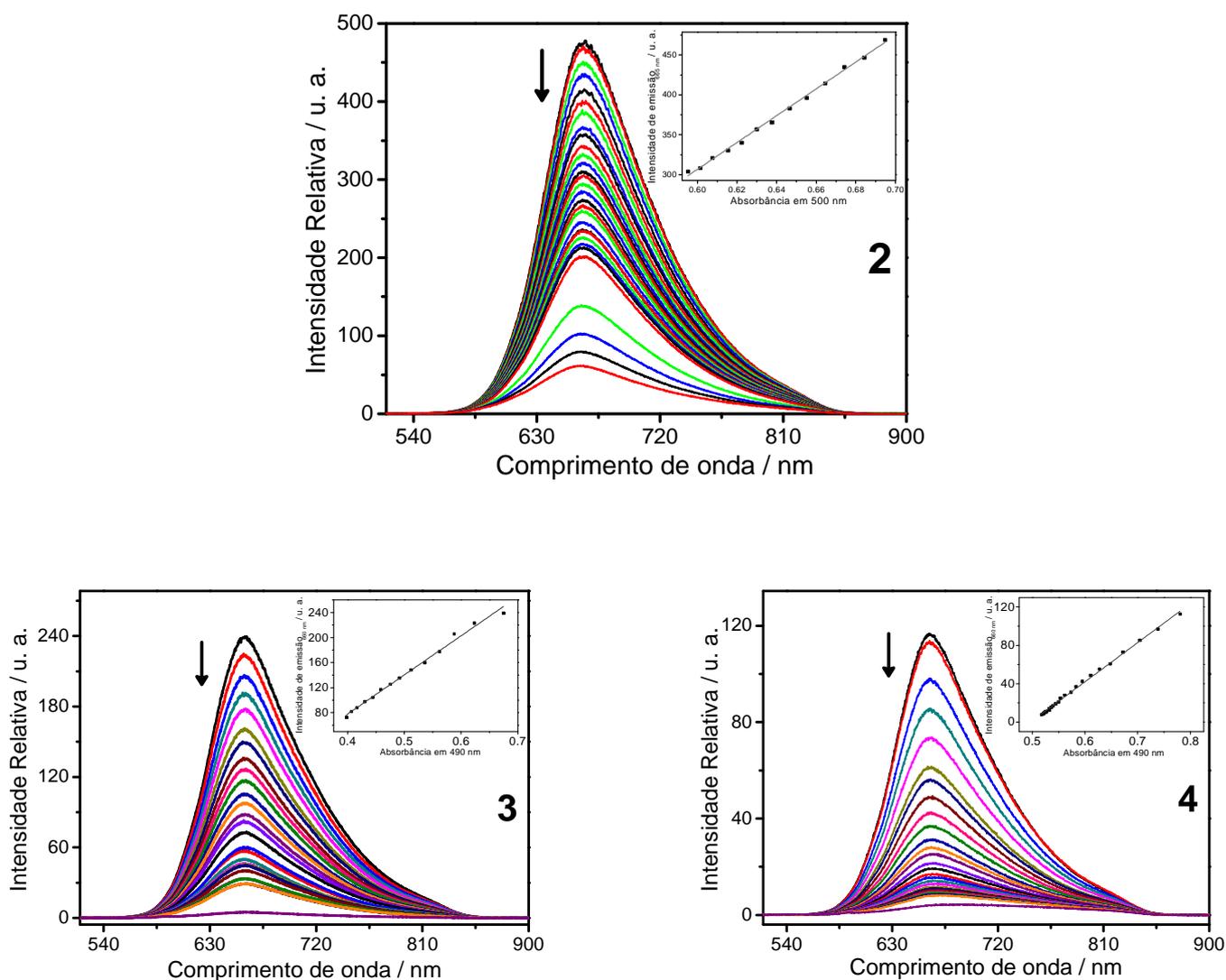
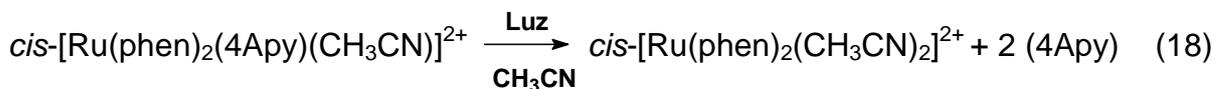


Figura 12: Espectros de emissão em CH_3CN obtidos durante fotólise em 420 nm dos complexos **2-4** em CH_3CN ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) (inserido: gráficos de intensidade de emissão vs absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$).

Uma mudança imprevisível no comportamento fotoquímico para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_2(4\text{Apy})_2]^{2+}$ foi observada quando o ligante quelato usado foi o ligante phen. A fotólise do complexo **1** em CH_3CN difere dos outros complexos

estudados neste trabalho por causa da produção do íon-complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺ como produto final. A fim de melhor compreender este processo fotoquímico, as mudanças no espectro de UV-vis do complexo **1** em solução de CH₃CN durante a fotólise com luz de 420 nm (*I*_i = 1,18 x 10⁻⁸ einstein s⁻¹) foram analisadas (Figura 13A, inserido: gráfico de Abs_{λ_{máx}} vs tempo). A diminuição progressiva da banda larga a 450-480 nm, com concomitante deslocamento para a região do azul a 440 nm (Figura 13B) e então para 420 nm (Figura 13C), resultando num foto-produto final com menor coeficiente de extinção molar quando comparado com o complexo **1**. O espectro de absorção da solução final de fotólise está relacionado ao complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂]²⁺ (λ_{máx} = 420 nm; ε_{máx} = 8 600 mol⁻¹ L cm⁻¹)⁷⁹ sugerindo que a irradiação contínua a 420 nm está relacionada a um sucessivo processo de dissociação, isto é:



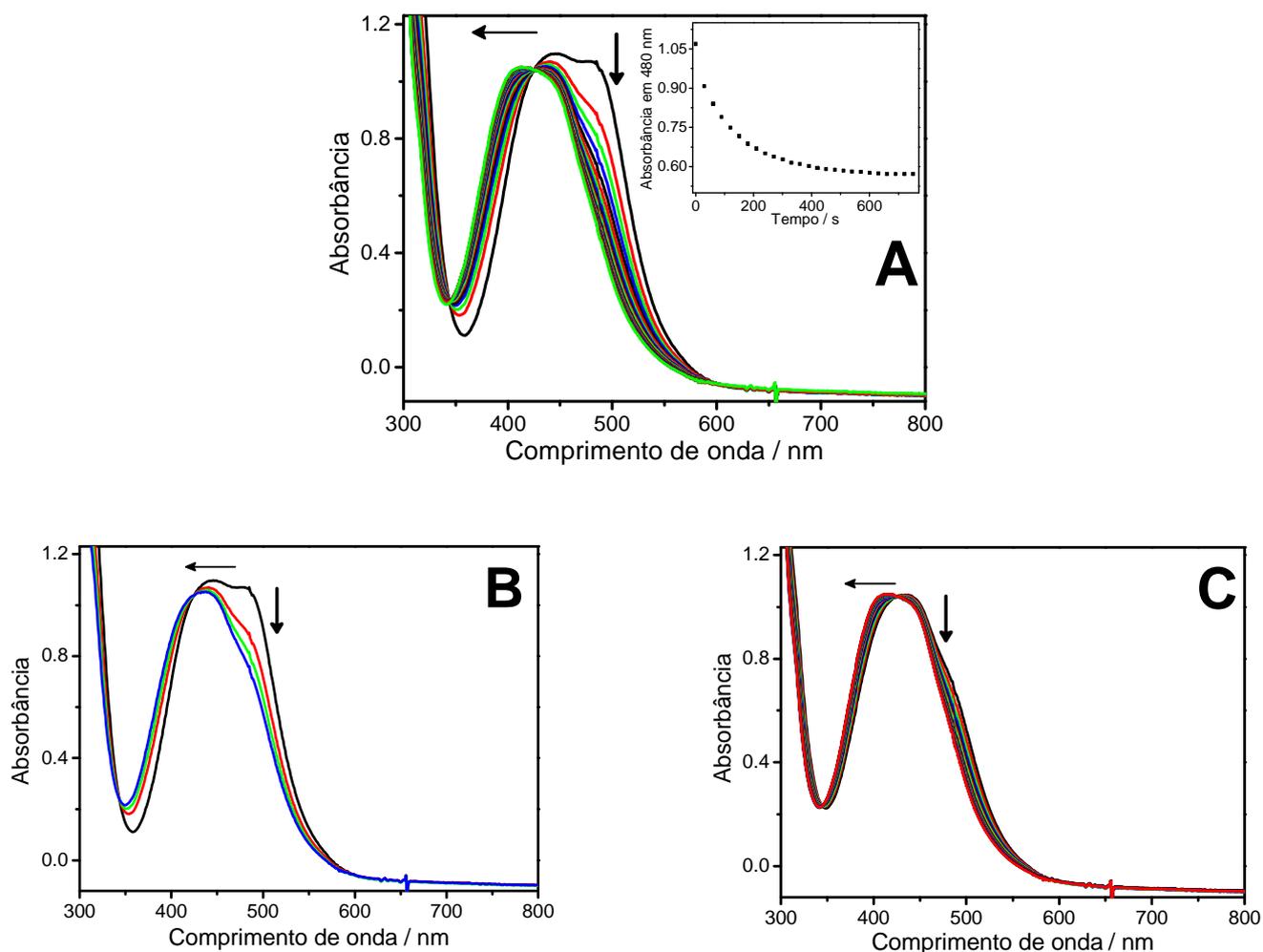


Figura 13: Espectros de absorção eletrônica UV-vis obtidos durante fotólise contínua em 420 nm para o complexo **1** em solução de CH₃CN: (A) fotólise toda (inserido: gráficos de Abs_{λmáx} vs tempo), (B) 0 a 1min e 30 s, (C) 1min e 30 s a 19 min.

A fotólise contínua também foi acompanhada pelas mudanças nos espectros de emissão como já mencionado anteriormente. A Figura 14 mostra o decaimento de emissão para o complexo **1** em CH₃CN durante 19 minutos de fotólise em 420 nm. O complexo *cis*-[Ru(phen)₂(CH₃CN)₂](PF₆)₂ não apresenta luminescência a temperatura ambiente. Assim, a fotossubstituição no complexo **1** envolve a perda de duas moléculas do ligante 4Apy e a entrada de duas moléculas de solvente na esfera de coordenação do metal.

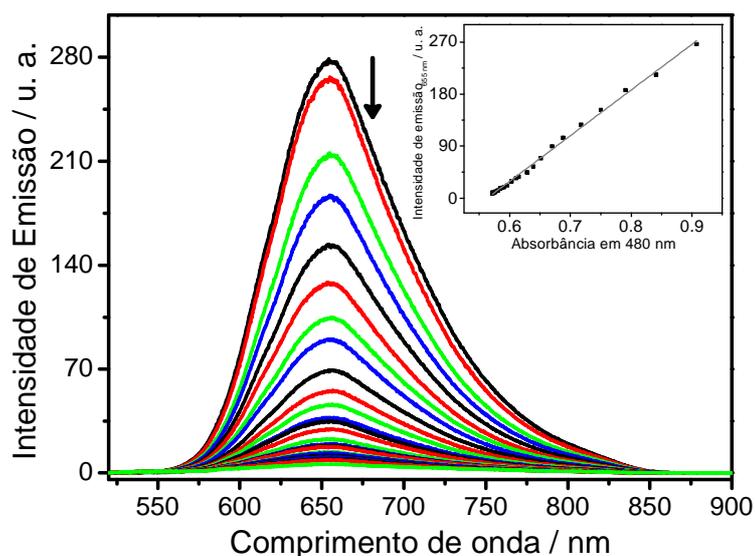


Figura 14: Espectros de emissão em CH₃CN obtidos durante fotólise do complexo **1** em 420 nm (inserido: gráfico de intensidade de emissão vs absorvância no $\lambda_{\text{máx}}$ com $R^2 = 0,997$).

Com a finalidade de melhor caracterizar a fotoreatividade dos complexos de **1** a **4**, calculou-se o rendimento quântico de substituição (ou de fotolabilização) do ligante 4Apy (ϕ_{subs}) a partir das mudanças espectrais (UV-vis) e mudanças nos coeficientes de extinção molar dos produtos e reagentes. Os dados são apresentados posteriormente.

A geração fotoquímica dos compostos *cis*-[Ru(α -diimina)₂(4Apy)(CH₃CN)]²⁺ e *cis*-[Ru(α -diimina)₂(CH₃CN)₂]²⁺ fornece a oportunidade de investigar a cinética e outros detalhes de reações de substituição (equações 15 e 16). Para solventes doadores como é o caso da acetonitrila, os valores de velocidades permitiram o estudo cinético usando técnicas espectrofotométricas convencionais, e as reações fotoquímicas mostraram-se quantitativas para cada sistema investigado. Para os complexos **1-4** os gráficos de $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$ versus tempo são lineares (Figura 15)¹²¹ (em que A_0 , A_∞ e A_t são os valores de absorvância no tempo 0 de irradiação, no tempo infinito e num tempo t qualquer, respectivamente). Cabe ressaltar que para o complexo **1** obteve-se dois gráficos já que a reação fotoquímica ocorreu em 2 etapas: a primeira, com a saída

de uma molécula de 4Apy da esfera de coordenação do metal; a segunda, com a saída da outra molécula 4Apy (Equações 17 e 18).

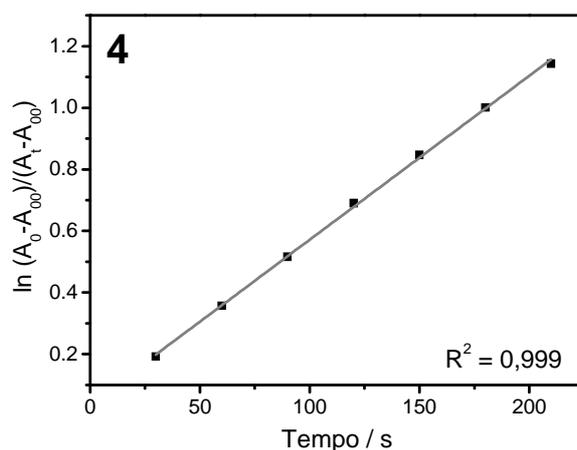
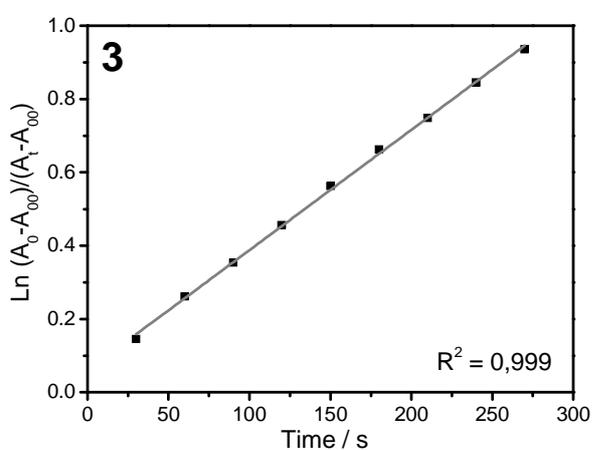
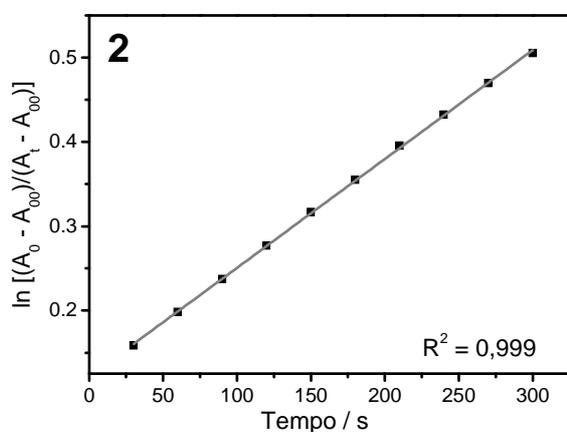
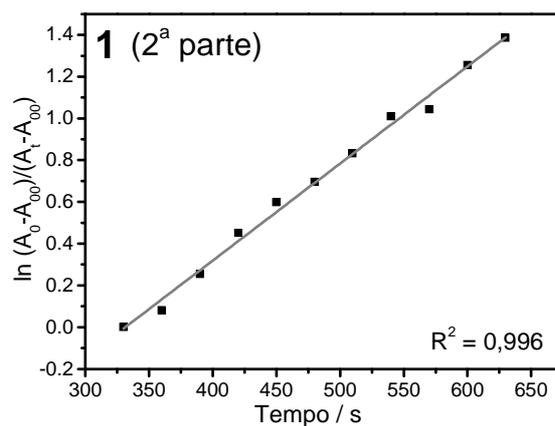
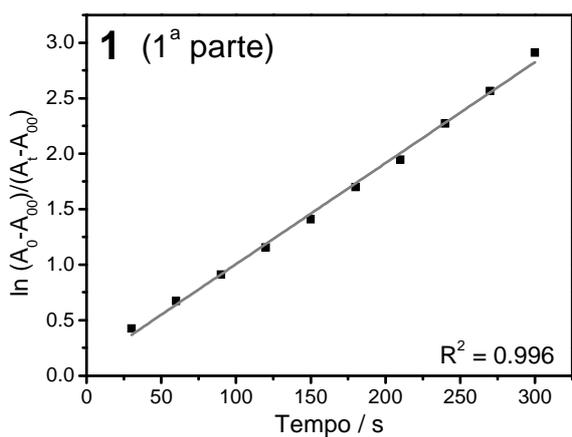


Figura 15: Estudo cinético de fotossubstituição: gráficos de $\ln(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})$ versus tempo para os complexos 1-4.

Os valores obtidos de constantes de velocidades (k_{obs} = coeficiente angular das retas obtidas na Figura 15) observadas em CH₃CN e tempos de meia vida ($t_{1/2}$, obtidos dos gráficos de $\text{Abs}_{\lambda_{\text{máx}}}$ vs tempo) segue a relação esperada da capacidade σ -doadora/receptora do grupo substituinte como mostrado na Tabela 5 (Me₂bpy > bpy > phen (2^a saída da 4Apy) > Ph₂phen).

Tabela 5: Valores de constantes de velocidades (k_{obs}) e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) em CH₃CN para os complexos **1-4**.

Complexo	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{s}$
(1)	0,0091 e 0,0046	115 e 190
(2)	0,0013	245
(3)	0,0033	150
(4)	0,0053	120

Em relação ao complexo **1**, como esperado, observamos dois decaimentos cinéticos: um bastante rápido devido a liberação da primeira molécula do ligante 4Apy ($k_{\text{obs}} = 0,0091 \text{ s}^{-1}$) e o segundo ($k_{\text{obs}} = 0,0046 \text{ s}^{-1}$), mais lento, foi coerente com a ordem σ -doadora/receptora do substituinte como mostrado anteriormente.

Os valores de rendimento quântico de substituição (ϕ_{subs}) em relação aos experimentos fotoquímicos foram calculados de acordo com a Equação 5. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de rendimento quântico de substituição (ϕ_{subs}) para os complexos **1-4** em relação aos experimentos fotoquímicos em CH₃CN.

Complexo	ϕ_{subs}
(1) <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂	0,233 (1ª parte) 0,012 (2ª parte)
(2) <i>cis</i> -[Ru(Ph ₂ phen) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂	0,044
(3) <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂	0,145
(4) <i>cis</i> -[Ru(Me ₂ bpy) ₂ (4Apy) ₂](PF ₆) ₂	0,152

Para o complexo **1** em CH₃CN, o ϕ_{subst} foi de 0,233 e 0,012 para a primeira e segunda fotolabilização do ligante 4Apy, respectivamente. Como esperado, o ϕ_{subs} para o complexo **3** (0,145) apresentou um valor próximo ao do complexo **4** (0,152) e ambos foram maiores que o valor encontrado para o complexo **2** (0,044). Esta mesma ordem pode ser inferida em relação ao k_{obs} em s⁻¹ [**1** (0,0091) >> **3** (0,033) ≈ **4** (0,0053) > **2** (0,0013)] e $t_{1/2}$ em segundos [**1** (115) < **4** (120) < **3** (150) <<< **2** (245)].

5.7.1.2. Fotólise contínua acompanhada pela técnica de RMN ¹H

Para também identificar os foto-produtos das fotólises contínuas dos complexos **1-4** realizou-se experimentos fotoquímicos acompanhados pela técnica de RMN ¹H em soluções de CD₃CN. A Figura 16 apresenta o desenho das moléculas dos complexos **1-4** juntamente com os respectivos códigos. Os espectros de RMN ¹H obtidos das soluções dos complexos **1-4** não irradiadas são mostrados na Figura 17. A Tabela 7 apresenta os dados dos espectros: deslocamento químico (δ_{H}), multiplicidade (mult.) e constante de acoplamento (J).

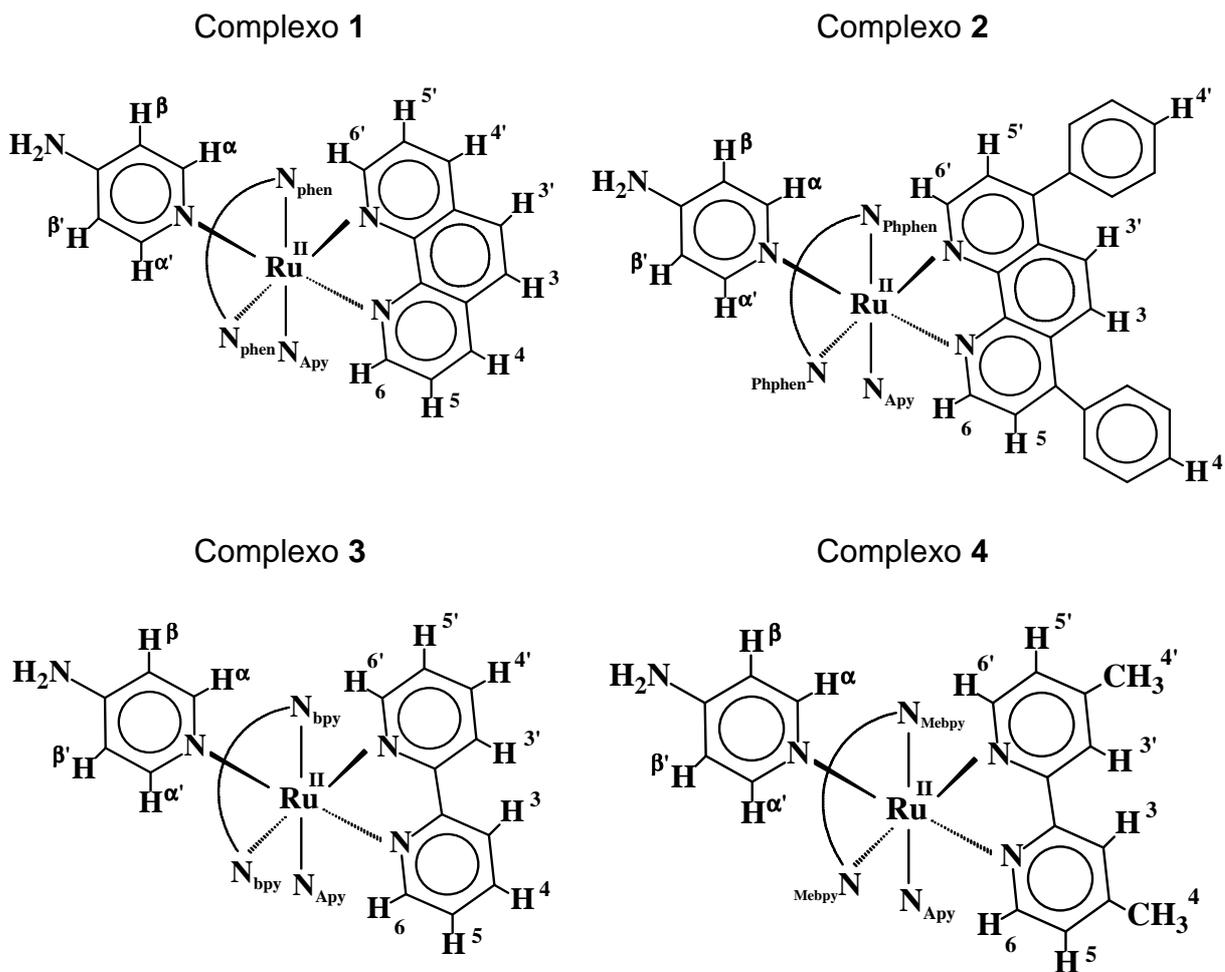


Figura 16: Desenho das moléculas dos complexos 1-4 juntamente com os respectivos códigos.

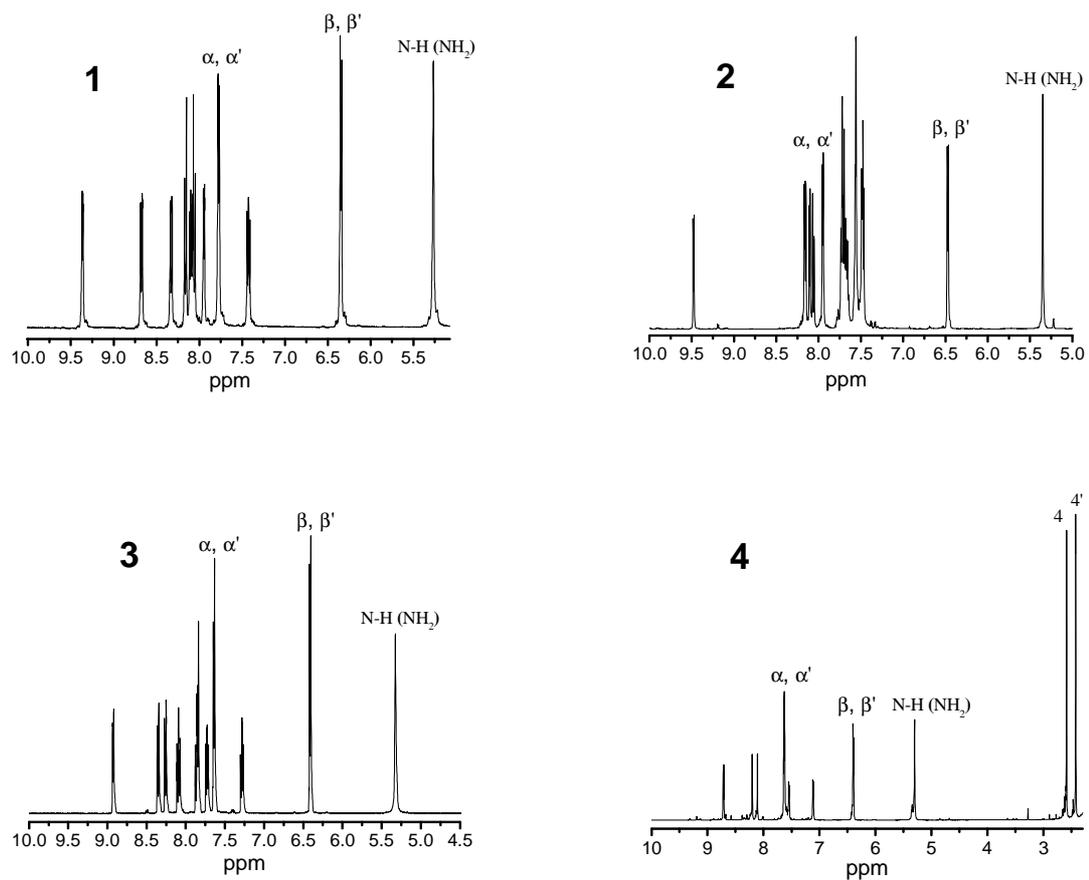


Figura 17: Espectros de RMN ¹H (400 MHz) dos complexos 1-4 obtidos em CD₃CN (soluções não irradiadas).

Tabela 7: Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz) dos complexos **1-4** em CD_3CN [deslocamento químico (δ_{H}), multiplicidade (mult.) e constante de acoplamento (J)].

H	Complexo, δ_{H} (mult., J)			
	1	2	3	4
6	9,35 (<i>dd*</i> ; 5,4/1,1)	9,47 (<i>d</i> ; 5,6)	8,92 (<i>d</i> , 5,7)	8,71 (<i>d</i> ; 5,7)
5	8,09 (<i>m*</i>)	8,16 (<i>m</i>)	8,34 (<i>d</i> , 8,1)	7,54 (<i>d</i> ,5,7)
4	8,67 (<i>dd</i> ; 8,4/1,1)	7,69 (<i>m</i>)	8,08 (<i>m</i>)	2,58 (<i>s</i>)
3	8,15 (<i>d*</i> ; 8,9)	8,15 (<i>d</i> ; 9,4)	7,85 (<i>m</i>)	8,20 (<i>s</i>)
3'	8,05 (<i>d</i> ; 8,9)	8,06 (<i>d</i> ; 9,4)	7,85 (<i>m</i>)	8,10 (<i>s</i>)
4'	8,32 (<i>dd</i> ; 8,4/1,1)	7,69 (<i>m</i>)	7,72 (<i>m</i>)	2,42 (<i>s</i>)
5'	7,42 (<i>m</i>)	7,48 (<i>m</i>)	8,25 (<i>d</i> , 8,1)	7,11 (<i>d</i> ,5,7)
6'	7,94 (<i>dd</i> ; 5,4/1,1)	8,10 (<i>d</i> ; 5,6)	7,84 (<i>m</i>)	7,64 (<i>d</i> ,5,7)
α , α'	7,76 (<i>d</i> ; 7,0)	7,94 (<i>d</i> ; 6,7)	7,63 (<i>dd</i> ; 1,3/5,7)	7,63 (<i>dd</i> ; 1,3/6,9)
β , β'	6,34 (<i>d</i> ; 7,0)	6,47 (<i>d</i> ; 6,7)	6,40 (<i>dd</i> ; 1,3/5,7)	6,39 (<i>dd</i> ; 1,3/6,9)
N–H (NH_2)	5,26 (<i>s*</i>)	5,35 (<i>s</i>)	5,32 (<i>s</i>)	5,30 (<i>s</i>)

**dd* = duplo dubleto; *d* = dubleto; *m* = multipletto; *s* = singleto

A fotólise em 420 nm dos complexos **2-4** resultou em espectros de RMN ^1H consistentes com o produto *cis*- $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})_2(4\text{Apy})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$, isto é, com apenas a saída de um ligante 4Apy da esfera de coordenação do metal (Equação 15). A Figura 18 mostra os espectros obtidos dos referidos complexos após 90 minutos de fotólise em 420 nm.

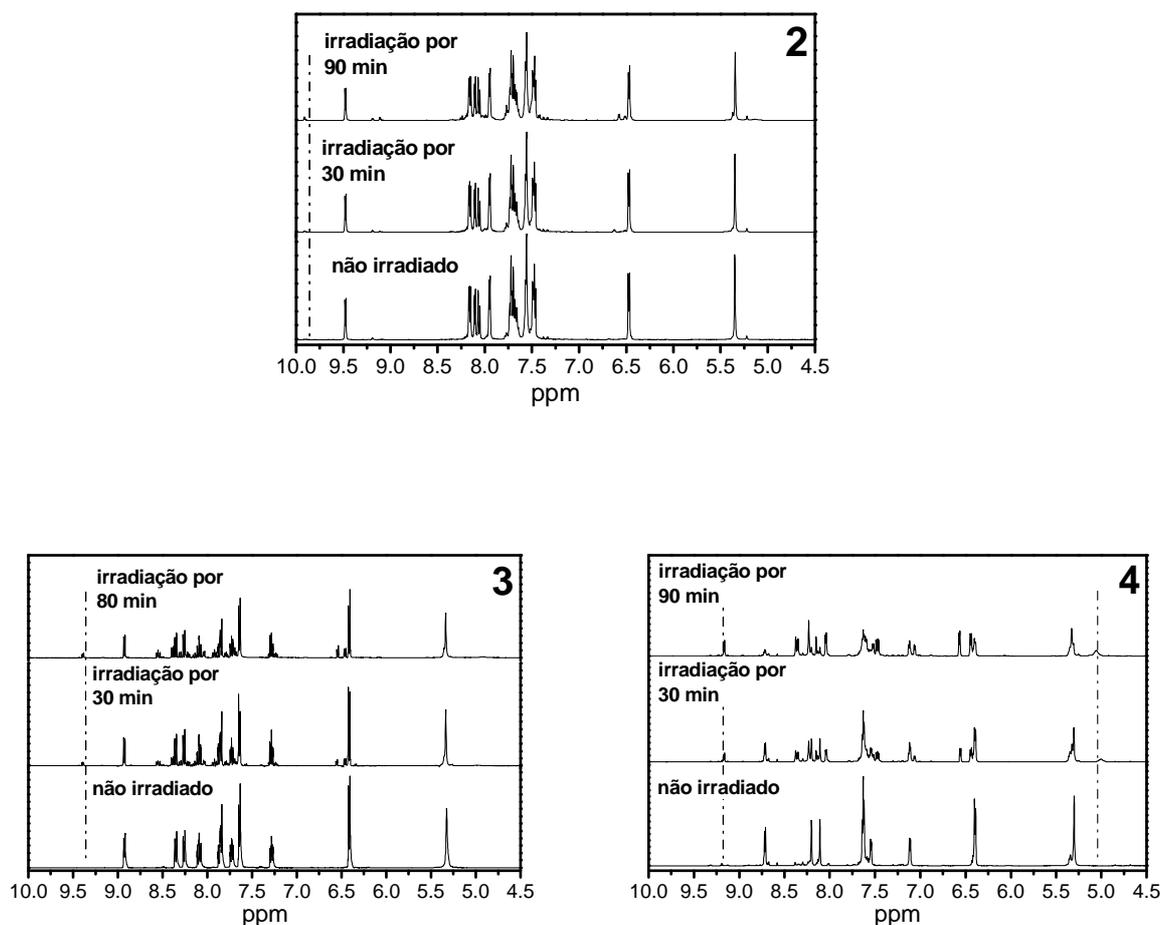


Figura 18: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) obtidos durante fotólise em 420 nm de soluções em CD_3CN dos complexos **2-4**.

Por exemplo, em relação ao complexo **4**, o sinal em 8,71 ppm referente ao H6 do ligante Me_2bpy diminui de intensidade e um novo sinal em 9,16 ppm aparece durante a fotólise indicando a mudança da natureza σ -doadora do ligante *trans*, isto é, do ligante 4Apy versus CD_3CN (melhor visualizado na Figura 19). O sinal em 5,30 ppm referente ao H do grupo NH_2 na posição 4 do ligante 4Apy [$\text{N-H}(\text{NH}_2)$] decresce em intensidade e um novo sinal aparece em 5,05 ppm referente ao ligante livre 4Apy. Isto indica a troca de um ligante 4Apy por uma molécula de solvent (CD_3CN) na esfera de coordenação do metal. Uma análise similar para os

complexos **2** e **3** pode ser feita e a Figura 20 mostra o aparecimento do sinal do H do grupo NH₂ do ligante 4Apy livre em solução.

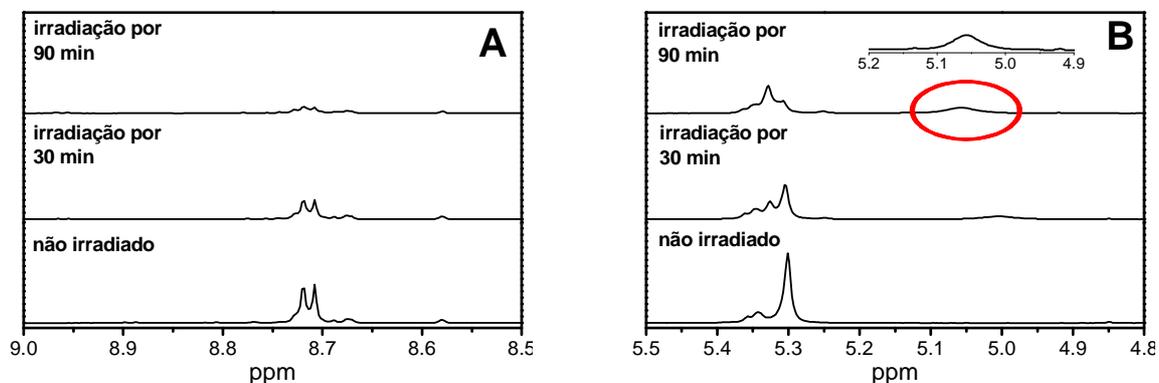


Figura 19: Espectros de RMN ¹H (400 MHz) (ampliados) obtidos durante fotólise em 420 nm de solução em CD₃CN do complexo **4**: (A) região entre 9,0 e 8,5 ppm; (B) região entre 5,5 e 4,8 ppm (o destaque em vermelho está ampliado).

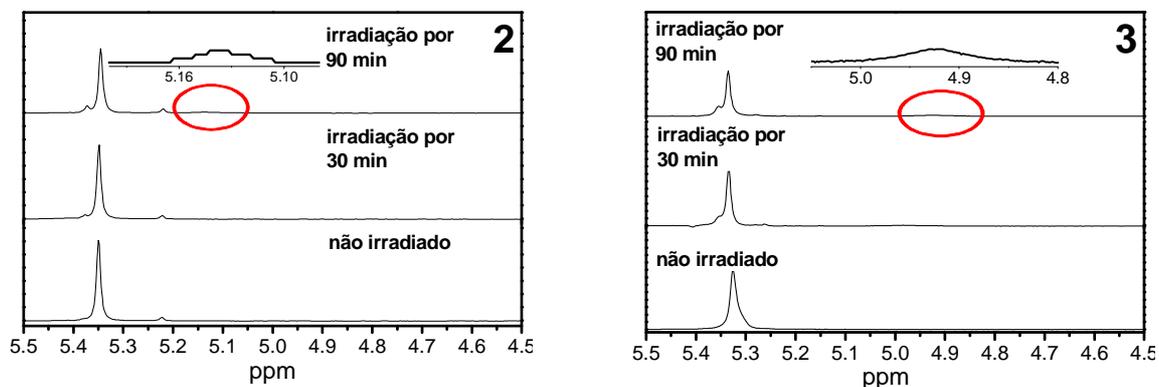


Figura 20: Espectros de RMN ¹H (400 MHz) (ampliados) obtidos durante fotólise em 420 nm de solução em CD₃CN dos complexos **2** e **3**: região entre 5,5 e 4,5 ppm (os destaques em vermelho estão ampliados).

A fotólise em 420 nm do complexo **1** resultou em espectros de RMN ^1H consistentes com o produto *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$ (Equação 18). A Figura 21A mostra os espectros obtidos do referido complexo antes e após 30 minutos de fotólise em 420 nm.

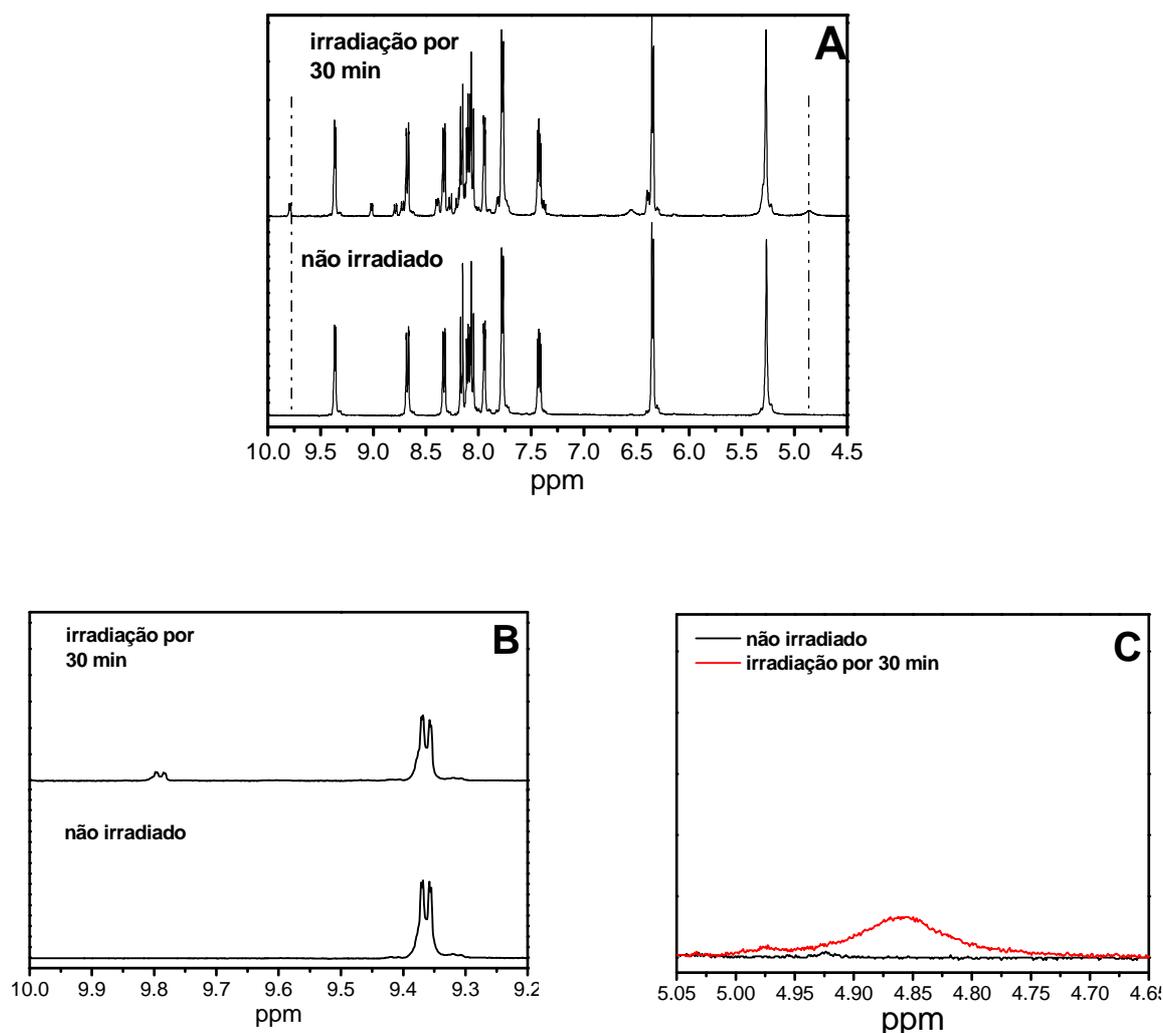


Figura 21: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) obtidos durante fotólise em 420 nm de soluções em CD_3CN do complexo **1**: (A) região entre 4,5 e 10 ppm; (B) região entre 9,2 e 10 ppm e (C) região entre 4,6 e 5,05 ppm.

A presença dos complexos mono e bis-acetonitrila, isto é, os produtos da reação representada pelas Equações 17 e 18, respectivamente, foi observada na

fotólise do complexo **1**. Após a irradiação, o sinal em 9,35 ppm (H6) decresce e o sinal do H do grupo NH₂ do ligante 4Apy livre em solução apareceu em 4,86 ppm (Figura 21B). O espectro de RMN de ¹H final está de acordo com o espectro da espécie *cis*-[Ru(phen)₂(CD₃CN)₂]²⁺¹²², confirmando a atribuição.

5.7.1.3. Fotólise contínua acompanhada pela técnica de HPLC

Os foto-produtos das fotólises em CH₃CN durante 90 minutos de irradiação a 420 nm dos complexos **1**, **3** e **4** foram também avaliados pela técnica de HPLC na fase móvel CH₃CN:H₂O (50% v/v) e fluxo 0,3 mL min⁻¹. Em relação ao complexo **2** esta condição de fase móvel e fluxo não levaram a obtenção de cromatogramas satisfatórios apesar da pureza comprovada do complexo por todas as outras técnicas utilizadas neste trabalho. Esta técnica também foi usada para comprovar a pureza dos compostos, já que nos cromatogramas obtidos das soluções não irradiadas dos complexos observou-se somente um pico.

As Figuras 22A e 22B mostram os cromatogramas obtidos (no comprimento de onda máximo de absorção) durante a fotólise dos complexos **1**, **3** e **4** e os seus respectivos espectros de absorção UV-Vis, respectivamente. No decorrer da irradiação houve o decréscimo de intensidade na absorbância no pico cromatográfico dos complexos, o qual apareceu por volta de 4 minutos para os três complexos.

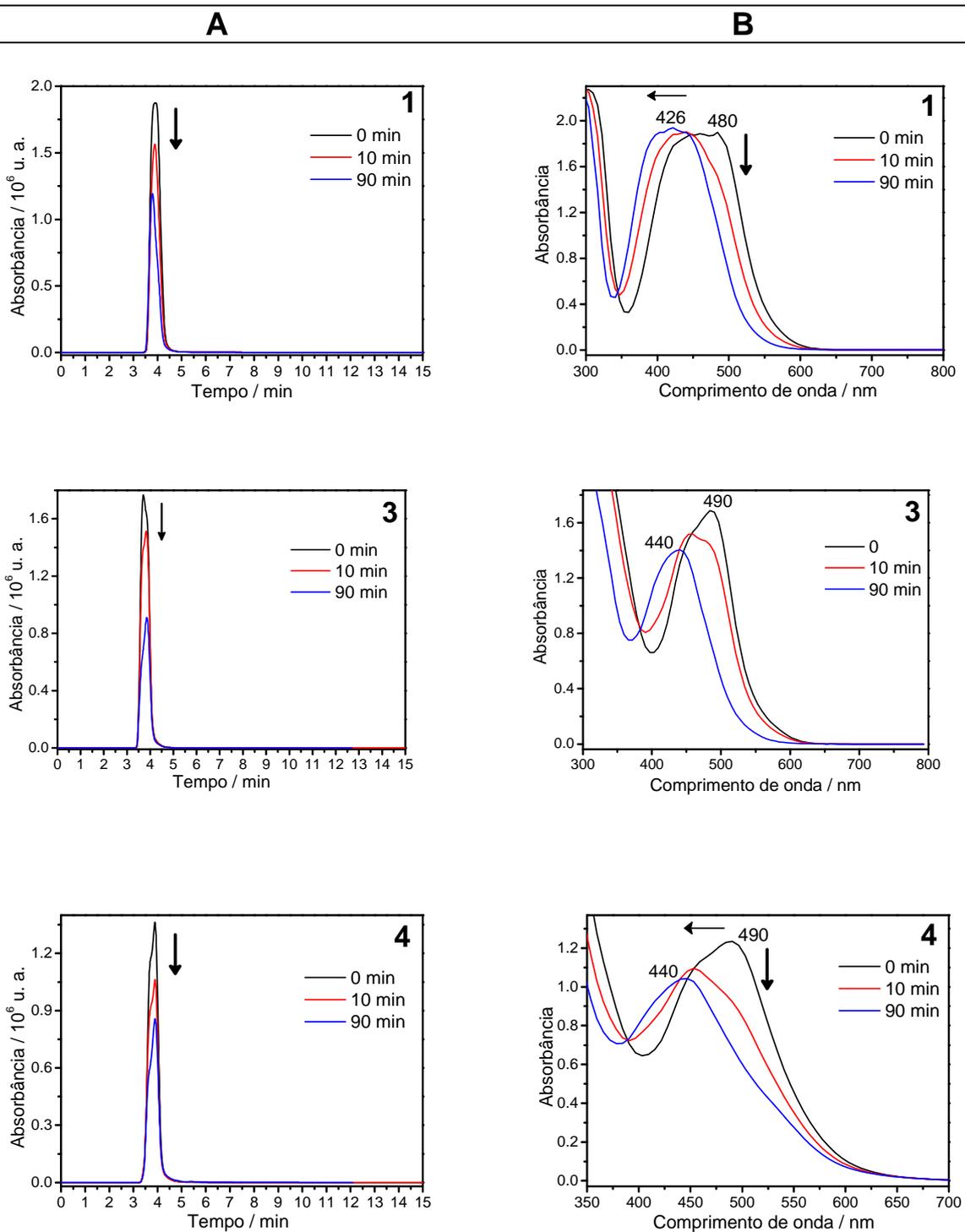


Figura 22: Cromatogramas (A) e respectivos espectros de absorção UV-vis (B) obtidos durante fotólise contínua em 420 nm dos complexos **1**, **3** e **4** em CH_3CN .

De acordo com os espectros de UV-vis observou-se a formação do complexo bis-acetonitrila na reação fotoquímica com o complexo **1** e a formação do mono-complexo na reação com os complexos **3** e **4**. Estes resultados comprovaram os outros estudos fotoquímicos realizados com acompanhamento das técnicas UV-vis e RMN ^1H . Cabe ressaltar que tanto o pico cromatográfico referente ao produto da reação quanto o pico referente ao ligante 4Apy livre apresentaram-se na mesma região do pico do respectivo reagente de partida (por volta de 4 minutos). A Figura 23 mostra o cromatograma e espectro UV-vis (inserido) de uma solução em CH_3CN do ligante 4Apy livre obtidos nas mesmas condições de fase móvel e fluxo das fotólises contínuas.

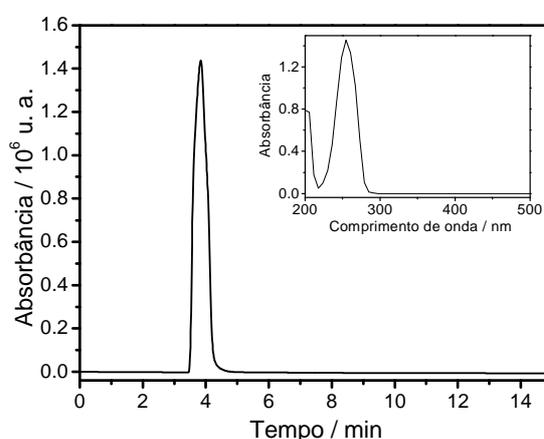


Figura 23: Cromatograma e respectivo espectro de absorção UV-vis (inserido) obtido do ligante 4Apy em CH_3CN .

5.8. Cálculos Computacionais

5.8.1. Orbital molecular e análise de NBO

Para uma melhor interpretação dos resultados fotoquímicos e fotofísicos apresentados para os complexos **1-4**, uma análise do caráter dos orbitais moleculares e a natureza dos estados excitados dos complexos pode ser feita de acordo com os resultados de cálculos computacionais.

As estruturas otimizadas em CH₃CN dos quatro complexos são mostradas na Figura 3. Para avaliar a distribuição de densidade de carga nos quatro complexos realizou-se análise de carga pelo método de NBO (do inglês, *Natural Bond Orbital*) e pelos fragmentos **A** (Ru(α -diimina) e **B** (4Apy) estimou-se a doação e retro-doação de carga entre estes fragmentos. Os dados são apresentados na Tabela 8.

A distribuição de carga calculada mostra que o átomo de rutênio apresenta carga positiva enquanto que os átomos de nitrogênio dos ligantes 4Apy [N(4Apy)] e α -diimina [N(α -diimina)] estão carregados negativamente.

A análise de carga NBO de cada fragmento indica uma diferença significativa na densidade de carga sobre o átomo de Ru para cada um dos complexo estudados: +0,287 (**1**), +0,630 (**2**), +0,647 (**3**) e +0,643 (**4**) enquanto que a densidade de carga sobre cada ligante α -diimina diminui. Para o ligante 4Apy observou-se uma redução de -0,606 do ligante livre para 0,12 (complexo **1**) e aproximadamente 0,071 para os complexos **2**, **3** e **4**. A carga negativa sobre o ligante α -diimina também é reduzida para \sim 0,12 no complexo **1** e levemente reduzida para \sim 0,05 nos complexos **2**, **3** e **4**.

Estes resultados sugerem uma doação σ muito forte e fraca retro-doação no complexo **1** quando comparado com os demais complexos estudados. Como consequência, o campo ligante do complexo **1** diminui, o que leva a uma diminuição nas diferenças de energia entre os orbitais t_{2g} e e_g^* do Ru. Isto é consistente com a localização das transições eletrônicas centradas no metal (MC) mostradas posteriormente.

Desta maneira, os estados excitados de MLCT e MC se aproximam aumentando a viabilidade de fotolabilização do ligante 4Apy no complexo **1**.

Tabela 8: Análise de carga NBO calculada por DFT (B3LYP/LanL2DZ).

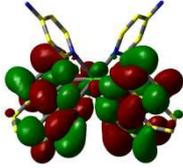
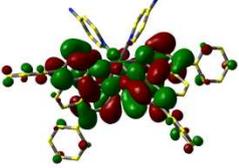
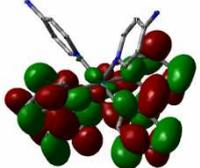
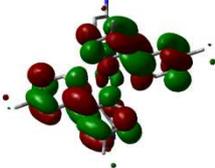
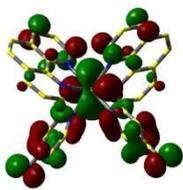
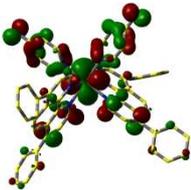
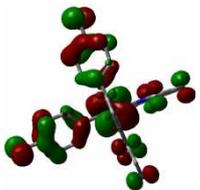
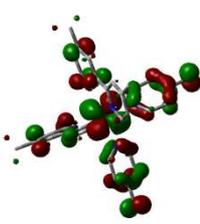
Átomo	Complexo				
	1	2	3	4	
Ru	+0,287	+0,630	+0,647	+0,643	
N1(α -diimina)	-0,422	-0,476	-0,482	-0,487	
N1'(α -diimina)	-0,413	-0,457	-0,464	-0,469	
N3(4Apy1)	-0,486	-0,535	-0,538	-0,536	
	Ligante livre				
	phen	Ph ₂ phen	bpy	Me ₂ bpy	4Apy
N1(α -diimina)	-0,526	-0,540	-0,545	-0,545	
N3(4Apy1)					-0,606
N1'(α -diimina)	-0,534	-0,526	-0,541	-0,545	

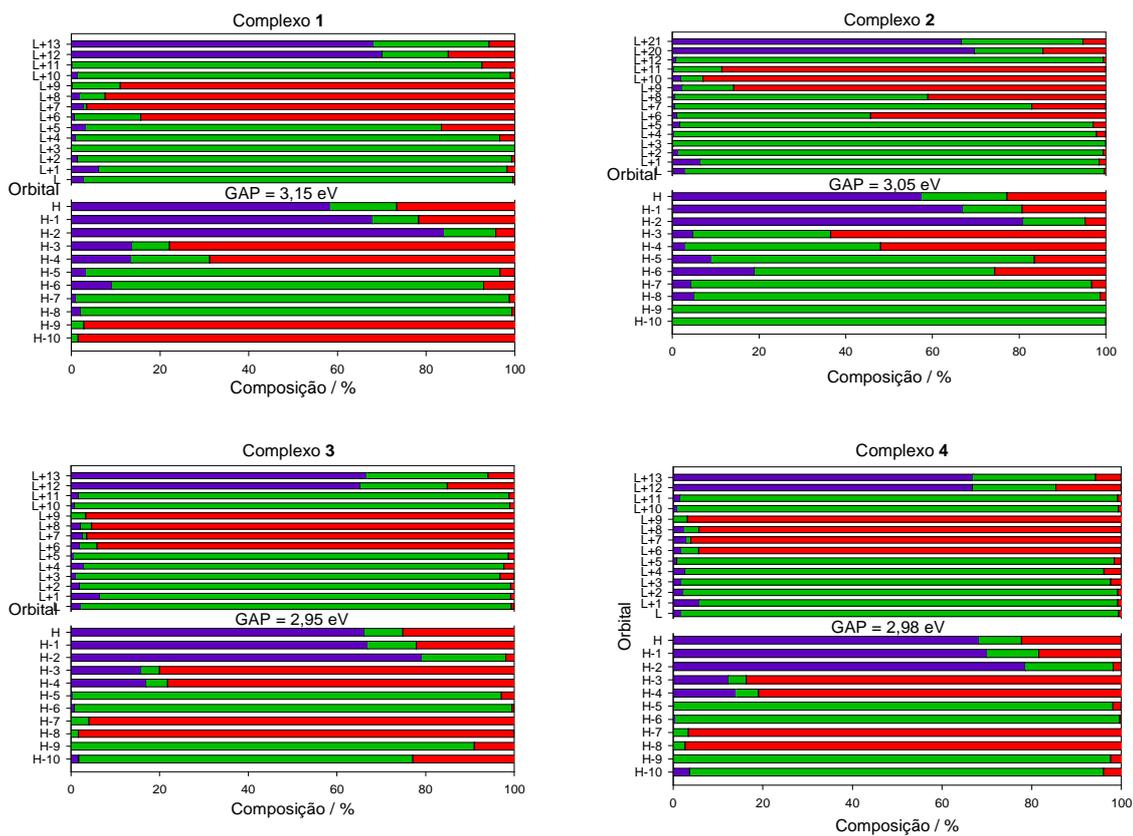
O mapa de contorno e a composição dos orbitais moleculares (OM's) para os quatro complexos considerando o solvente CH₃CN são apresentados na Tabela 9 e Figura 24, respectivamente. Para todos os complexos obteve-se uma mistura significativa entre os orbitais 4d do Ru e os OM's dos ligantes α -diimina e 4Apy. Considerando os orbitais moleculares HOMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*), HOMO-1, HOMO-2 e HOMO-3, o HOMO é o orbital menos puro (maior mistura com os OM dos ligantes 4Apy e α -diimina). O ligante cromofórico define as diferenças no grau de mistura entre os HOMO's para os complexos **1** a **4**. Por exemplo, a porcentagem de Ru(4d) no HOMO segue a ordem: Me₂bpy > bpy > phen > Ph₂phen. O HOMO-3 e HOMO-4 para todos os complexos apresentam a maior proporção do ligante 4Apy enquanto que HOMO-5 e HOMO-6 são localizados predominantemente sobre o ligante α -diimina.

O LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), LUMO+1, LUMO+2 e LUMO+3 dos complexos são OM predominantemente do ligante cromofórico, com uma porcentagem pequena dos orbitais Ru(4d).

Os OM LUMO+12 nos complexos **1**, **3** e **4** e o LUMO+20 no complexo **2** são caracterizados principalmente por orbitais Ru(4d) indicando a possibilidade de transições eletrônicas centradas no metal para os quatro complexos.

Tabela 9: Mapa de contorno para os orbitais moleculares HOMO e LUMO para os complexos 1-4 em CH₃CN.

	Complexo			
	1	2	3	4
LUMO				
GAP	3,15	3,05	2,95	2,98
HOMO				



Legenda:

- Ru s, p, d
- phen, Ph₂phen, bpy ou Me₂bpy
- 4Apy

Figura 24: Composição (em porcentagem) dos orbitais moleculares dos complexos 1-4 (B3LYP/LanL2DZ, cálculo em CH₃CN).

5.8.2. Espectro de Absorção Eletrônica UV-Vis

A Tabela 10 mostra os dados de absorção eletrônica UV-vis e atribuições para as respectivas transições eletrônicas em CH₃CN. Os espectros de absorção eletrônica experimental e por DFT obtidos em acetonitrila são mostrados na Figura 25.

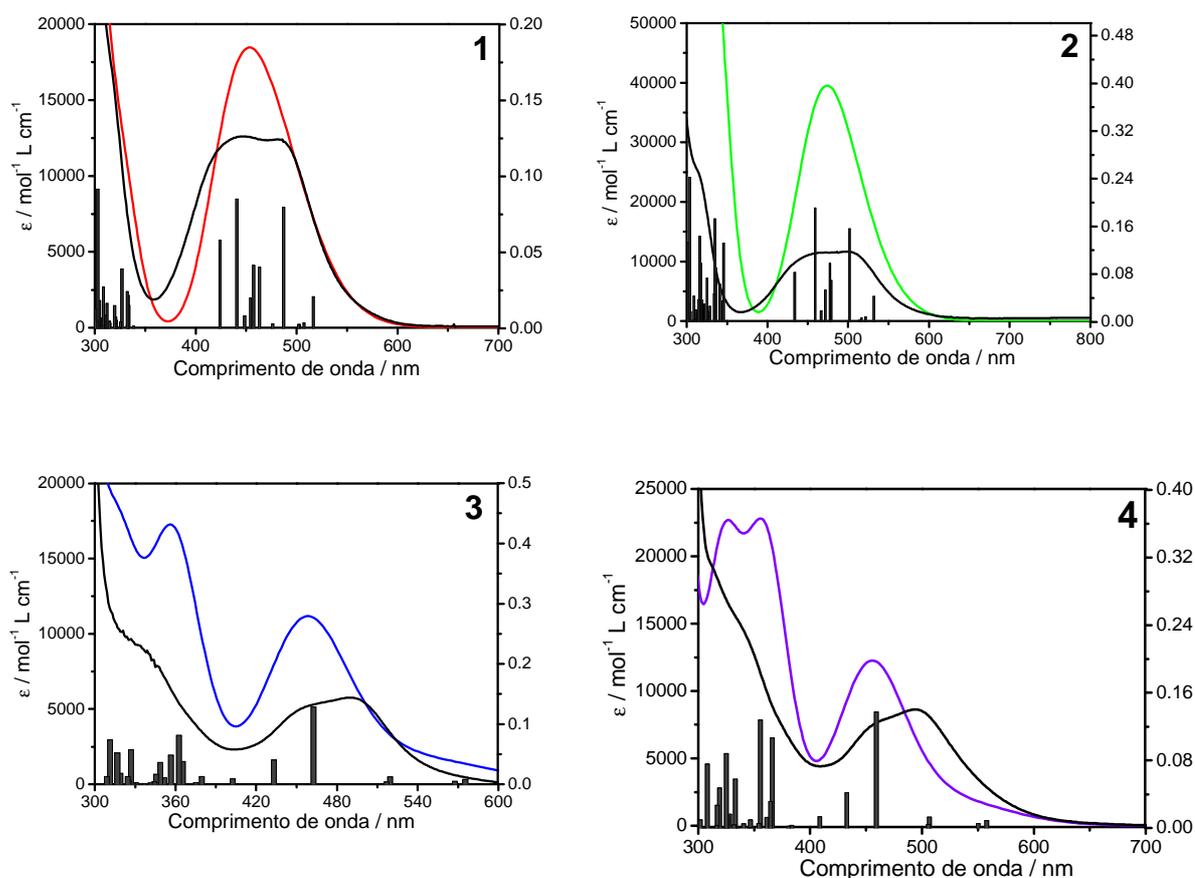


Figura 25: Espectros de absorção eletrônica UV-vis experimental (em preto) e obtidos por DFT (linhas coloridas) para os complexos: **1**, **2**, **3** e **4** em CH₃CN (barras = força do oscilador).

Tabela 10: Dados de absorção eletrônica UV-vis experimental (Exp.) e calculado (Calc.) por TD-DFT para os complexos 1-4 em CH₃CN (f = força do oscilador).

Exp. $\lambda_{\text{máx}} / \text{eV} (\epsilon_{\text{máx}})$	Calc. Energia / eV (f)	Transição eletrônica	Atribuição
Complexo 1			
2,4 (7 700)	2,4 (0,0209)	H→L(67%); H-1→L+1(22%)	MLCT
2,53 (12 200)	2,55 (0,0796)	H-1→L+1(46%); H→L+0(28%)	MLCT
2,68(12 500)	2,68 (0,0402)	H→L+2(62%); H-2→L+2(17%)	MLCT
2,71 (12 500)	2,72 (0,0413)	H→L+3(87%); H-1→L+2(9%)	MLCT
	2,73 (0,0199)	H-1→L+2(78%); H-2→L+3(11%)	MLCT
2,81 (12 100)	2,82 (0,0852)	H-2→L+3(85%); H-1→L+2(10%)	MLCT
	2,93 (0,058)	H-2→L+2(48%); H→L+1(23%)	MLCT
	3,67 (0,0014)	H→L+12(31%); H-2→L+12(31%)	MC
	3,74 (0,0021)	H-2→L+13(56%); H-1→L+12(20%)	MC
	3,74 (0,0242)	H-3→L+1(23%); H-1→L+13(23%)	MC/MLCT
	3,8 (0,0391)	H→L+4(43%); H→L+12(18%)	MLCT/MC
	3,87 (0,0053)	H-1→L+4(42%); H-4→L+1(19%)	MLCT
	3,89 (0,0149)	H-2→L+4(71%); H-3→L+2(19%)	MLCT
3,93 (16 600)	3,95 (0,0032)	H-2→L+5(57%); H-2→L+8(9%)	MLCT
3,99 (19 900)	3,98 (0,0165)	H→L+6(53%); H-4→L+2(15%)	MLCT
	4,01 (0,0086)	H→L+5(21%); H-5→L+0(18%)	LLCT
Complexo 2			
2,47 (13 200)	2,47 (0,1562)	H-1→L+1(44%); H-2→L(25%), H→L(23%)	MLCT
2,59 (13 200)	2,59 (0,0695)	H→L+2(43%); H-2→L+2(27%); H→L+1(15%); H-1→L(7%)	MLCT
2,59 (13 200)	2,59 (0,0980)	H→L+3(88%)	MLCT
	2,70 (0,1912)	H-2→L+3(84%); H-1→L+2(10%)	MLCT
3,60 (6 500)	3,59 (0,1322)	H-4→L(46%); H-3→L+1(42%), H→L+4(6%)	LLCT, L'LCT
3,77 (17 900)	3,70 (0,0607)	H-2→L+20(25%); H→L+20(17%)	MC, MLCT
		H-1→L+21(11%); H→L+4(11%)	
	4,39 (0,0037)	H-1→L+20(17%); H-2→L+21(15%)	MC, ML'CT
		H-1→L+11(16%); H→L+21(17%)	
4,50	4,48 (0,0028)	H-2→L+20(45%); H-1→L+21(18%)	MC
		H→L+20(9%); H-2→L+11(7%)	
	4,50 (0,0282)	H-1→L+20(34%); H→L+21(26%)	MC
		H-1→L+11(5%); H-1→L+7(5%)	
Complexo 3			
2,67 (5 200)	2,68 (0,1281)	H-2→L(91%); H-1→L+1(7%)	MLCT
2,86 (3 400)	2,86 (0,0405)	H-2→L+1(78%); H-1→L(6%)	MLCT
3,39 (4 900)	3,39 (0,0376)	H→L+5(91%)	MLCT
3,42 (7 000)	3,42 (0,0815)	H→L+4(73%); H-1→L+2(8%)	MLCT
3,48 (9 400)	3,47 (0,0481)	H-1→L+3(+82%); H-2→L+2(7%)	MLCT
	3,55 (0,0363)	H-2→L+2(+53%); H-1→L+4(23%); H→L+12(10%); H-1→L+3(9%)	MC/MLCT
	3,60 (0,0043)	H→L+12(+49%); H-1→L+13(29%)	MC
	3,67 (0,0003)	H→L+13(+27%); H-2→L+13(19%);	MC/MLCT
		H→L+12(16%); H-2→L+3(+11%)	
3,80 (9 700)	3,79 (0,0572)	H-2→L+4(41%); H→L+6(23%)	MLCT
	4,39 (0,1198)	H-6→L+1(66%); H-1→L+9(8%)	LL'CT
Complexo 4			
2,7 (8 900)	2,7 (0,1371)	H-2→L (91%); H-1→L+1(7%)	MLCT
2,86 (6 700)	2,86 (0,0415)	H-2→L+1 (80%); H-1→L(6%)	MLCT
3,03 (5 600)	3,03 (0,0135)	H→L+2 (96%)	MLCT
3,38 (9 700)	3,38 (0,1068)	H→L+4 (80%); H-1→L+2(6%)	MLCT
3,48 (12 500)	3,48 (0,1279)	H-2→L+2 (45%); H-1→L+3(32%)	MLCT
3,57 (14 700)	3,58 (0,0007)	H→L+12 (52%); H-1→L+13(29%)	MC
3,71 (17 200)	3,71 (0,0580)	H-2→L+4 (42%); H→L+6(21%)	MLCT/MC
		H→L+13 (13%); H-2→L+13(12%)	
	3,77 (0,0164)	H-3→L (39%); H→L+6(18%)	MLCT
4,27 (68 800)	4,35 (0,0900)	H-5→L (84%); H-6→L+1(6%)	LLCT
4,48 (49 400)	4,48 (0,5327)	H-5→L+1 (38%); H-6→L(24%)	MLCT

Para o complexo **1** observa-se duas transições do tipo MLCT nas regiões de 2,40 e 2,93 eV e 3,74 e 3,98 eV, respectivamente. As transições de MLCT mais intensas são observadas em 2,55 eV ($f = 0,0796$) e 2,82 eV ($f = 0,0852$). Posicionado entre estes dois conjuntos de transições eletrônicas de MLCT encontra-se quatro transições eletrônicas degeneradas na região de 3,67 a 3,8 eV. Duas destas transições eletrônicas possuem características de MC e MLCT (3,74 e 3,80 eV) e duas são transições de MC puras (3,67 e 3,74 eV). A proximidade dos dois estados MC aos dois estados de MLCT facilitam a liberação de duas moléculas do ligante 4Apy pela absorção de luz no visível como observado nos experimentos de fotólise.

O espectro de absorção eletrônica UV-vis calculado para o complexo **2** é similar ao obtido para o complexo **1**. Entretanto, o conjunto de transições eletrônicas de MLCT puras calculadas a 2,47 eV ($f = 0,1562$) e 2,70 eV ($f = 0,1912$) e as duas transições eletrônicas apresentando misturas de MC/MLCT calculadas a 3,70 ($f = 0,0607$) são separados por uma transição eletrônica muito intensa a 3,59 eV ($f = 0,1322$) atribuída a LLCT/L'LCT. A proximidade energética dos estados excitados de LLCT aos de MC/MLCT fazem com que ocorra uma competição pela luz absorvida diminuindo a população dos estados de MLCT (responsáveis pela emissão deste complexo) e MC (responsável pela dissociação do ligante 4Apy). Isto é consistente com a observação experimental dos valores baixos de ϕ_{em} e ϕ_{subs} para este complexo, apesar da característica retiradora de elétrons do ligante Ph₂phen.

Os espectro de absorção eletrônica dos complexos **3** e **4** são similares sendo caracterizados por cinco transições eletrônicas de MLCT entre 2,68 a 3,48 eV, com forças de oscilador maiores que as observadas para o complexo **1**. Para o complexo **3**, o conjunto de transições eletrônicas MC/MLCT calculado a 3,55 eV ($f = 0,0363$) são próximos em energia ao estado MC puro calculado a 3,60 eV ($f = 0,0043$), viabilizando a saída de um ligante 4Apy pela absorção de luz visível. Ainda para este mesmo complexo, é calculado outro estado de MC/MLCT a 3,67 eV ($f = 0,0003$).

Em relação ao complexo **4** é calculado um estado de MC puro a 3,58 ($f = 0,0007$) próximo em energia ao estado de MC/MLCT a 3,71 eV ($f = 0,0580$).

O diagrama de energia qualitativo mostrado no Esquema 4 sumariza a discussão energética já explicitada.

5.9. Estudos de lipofilicidade

Como já explicitado no item 1.6, o comportamento lipofílico das moléculas, principalmente os fármacos, é descrito como “coeficiente de partição” ($\log P$). O valor de $\log P$ para o complexo **1** foi obtido por dois métodos, *Shake-flask* e por HPLC.

5.9.1. Determinação dos valores do coeficiente de partição por *Shake-flask*

A partir dos valores dos coeficientes de absorvidade molar em *n*-octanol e água para os padrões (ciclohexanona, álcool benzílico, acetofenona, 2-nitrofenol e *p*-Cl-fenol) encontrados pelos gráficos de Absorção versus b [padrão] (Figura 26 e 27) encontrou-se os valores de $\log P$ (Equação 10). Para efeitos de comparação obteve-se os valores de $\log P$ para os padrões usando o programa ACD/Labs. Os dados obtidos estão listados na Tabela 11.

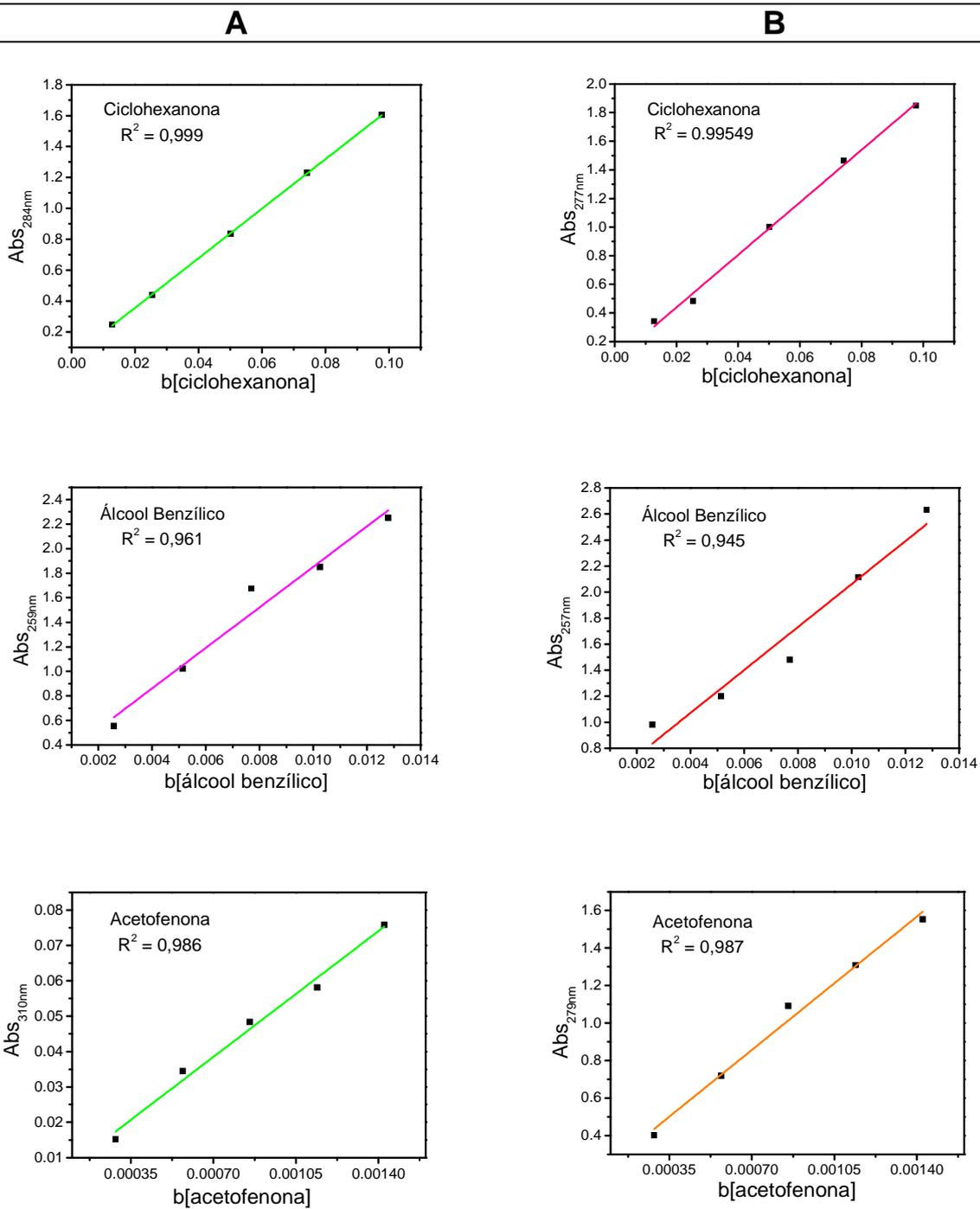


Figura 26: Gráficos de Abs versus b[padrão] para os padrões ciclohexanona, álcool benzílico e acetofenona em (A) octanol e (B) água.

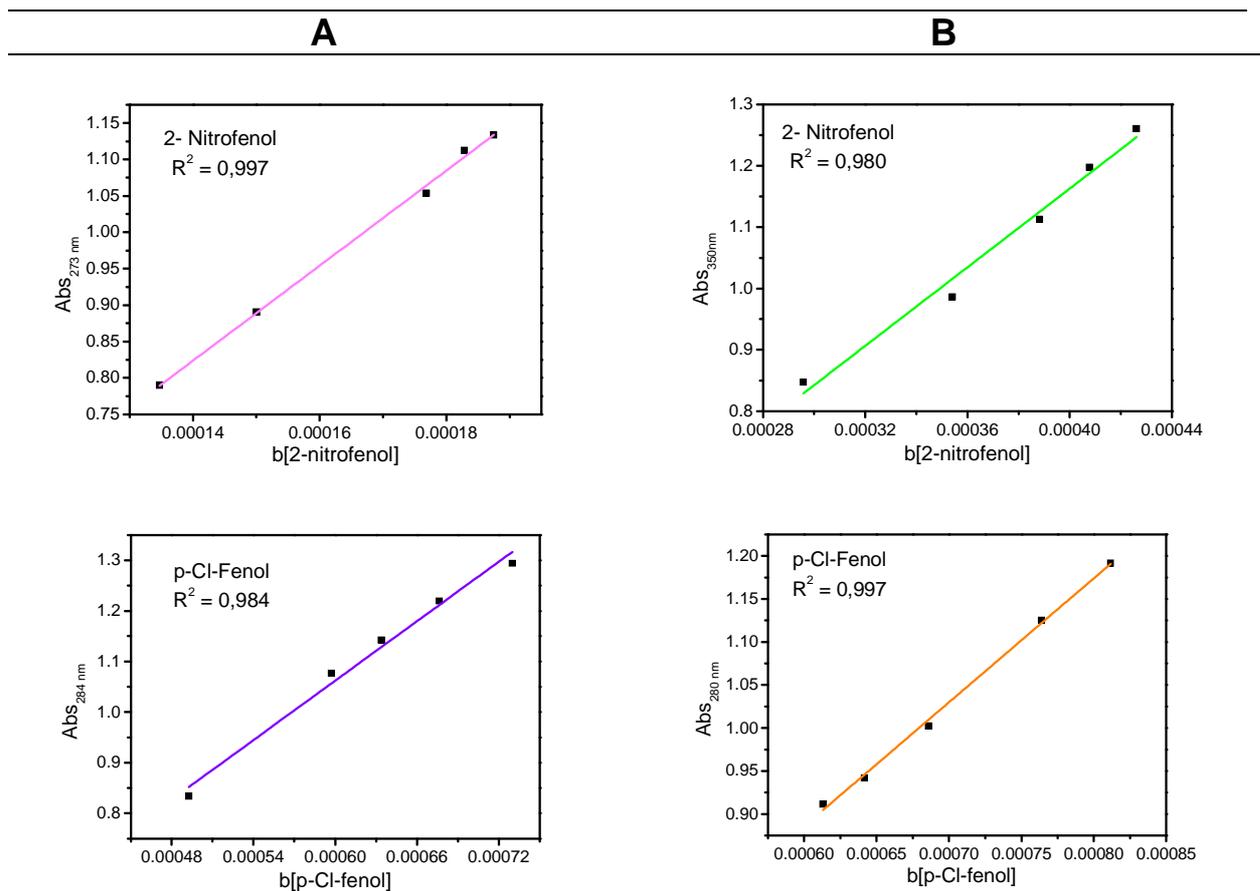


Figura 27: Gráficos de Abs versus b[padrão] para os padrões 2-nitrofenol e p-Cl-fenol em (A) octanol e (B) água.

Tabela 11: Valores de coeficientes de partição (log P) para os compostos padrões obtidos experimentalmente e (valores calculados)*.

Compostos	log P
ciclohexanona	0,782 (0,762±0.251)*
álcool benzílico	1,052 (1,035±0.206)*
acetofenona	1,589 (1,665±0.217)*
2-nitrofenol	1,737 (1,709±0.228)*
p-Cl-fenol	2,441 (2,426±0.218)*

*Valores calculados pelo programa ACD/Labs.

Os valores encontrados experimentalmente e computacionalmente são concordantes (comprovado na Figura 28, com $R^2 = 0,994$) validando a técnica de

Shake-flask. Isto viabiliza as investigações com os complexos de Ru(II) utilizando esta técnica.

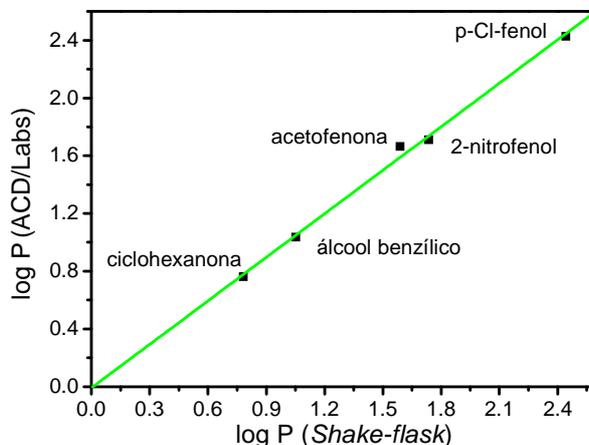


Figura 28: Gráfico de log P (ACD/Labs) vs log P (*Shake-flask*).

Para a obtenção do valor das concentrações do complexo **1** tanto na fase aquosa como na fase orgânica pela técnica de *Shake-flask* realizamos medidas de espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado (ICP-OES). Os valores obtidos foram: fase aquosa: 13,9 mg L⁻¹; fase orgânica: 0,76 mg L⁻¹. Com estes dados obtivemos o valor de log P de -1,26. Utilizamos a técnica de ICP para obtenção dos valores de concentrações de metal uma vez que os valores de coeficiente de extinção molar (ϵ) do complexo **1** pela técnica de espectroscopia de UV-vis foi inviável de ser encontrado devido à sua baixa solubilidade no solvente orgânico usado no experimento de *Shake-flask*.

5.9.2. Determinação dos valores do coeficiente de partição por HPLC

O fator de retenção, k , foi calculado pela Equação 11 usando t_0 (tempo morto) como 1,75 min. O valor de log k_w foi determinado pela Equação 12, isto é, pela extrapolação da curva de regressão log k versus ϕ (fração em volume de

metanol na fase móvel). Exemplos deste gráfico são mostrados na Figura 29. Os valores de $\log k_w$ estão listados na Tabela 12.

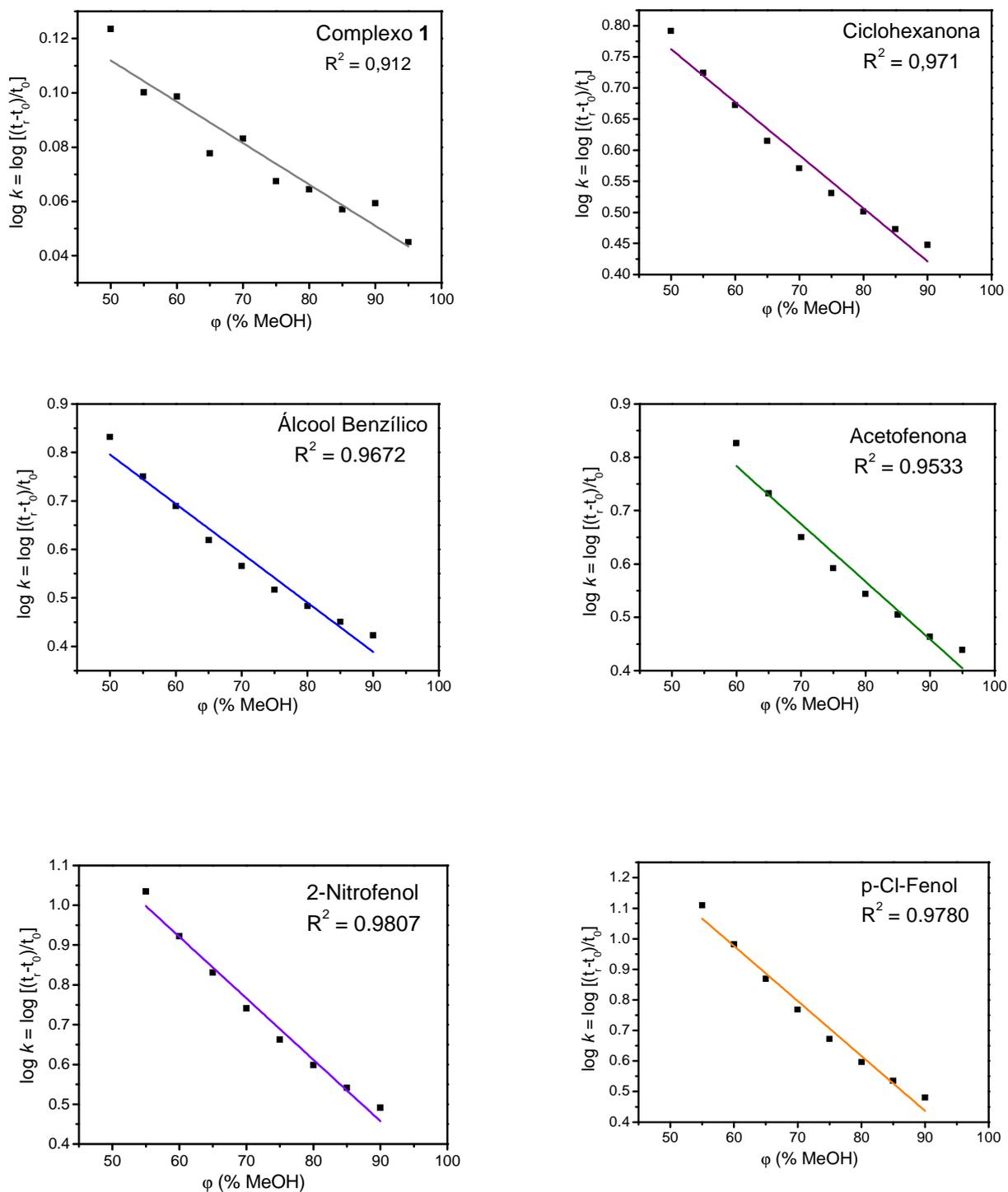


Figura 29: Gráfico de $\log k$ versus ϕ para o complexo 1 e os padrões.

Tabela 12: Valores de $\log k_w$ obtidos por HPLC.

Composto	$\log k_w$
Complexo 1	0,188
4Apy	0,272
ciclohexanona	1,196
álcool benzílico	1,315
acetofenona	1,590
2-nitrofenol	1,705
p-Cl-fenol	2,056

Para se encontrar o valor de $\log P$ por HPLC do complexo 1 podemos usar uma regressão ($R^2 = 0,996$) obtida pela curva de $\log k_w$ encontrados para os padrões versus valores de $\log P$ obtidos pelo método de *Shake-flask* (Figura 30).

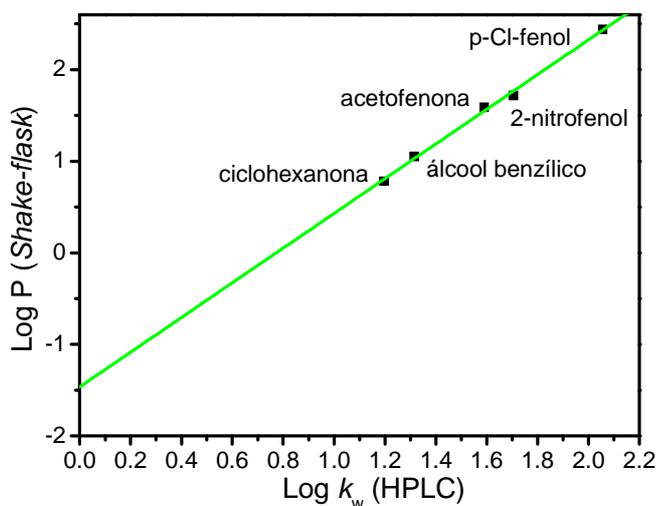


Figura 30: Gráfico de $\log P$ (*Shake-flask*) vs $\log k_w$ (HPLC) $\{R^2 = 0,996\}$.

O valor encontrado de $\log P$ para o complexo 1 pelo gráfico da Figura 30 foi de -1,11, bastante concordante com o valor obtido pelo método de *Shake-flask* (-1,26), validando, portanto, este último método. Para a molécula de 4Apy, o valor encontrado de $\log P$ (usando o HPLC) foi de -0,97. Comparando-se os valores de

log P tanto para o complexo **1** quanto para o ligante 4Apy, podemos inferir que a coordenação da 4Apy ao núcleo $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ não alterou suas características lipofílicas.

5.10. Estudos de citotoxicidade em células do tipo J774-A1

Na discussão e gráficos apresentados a seguir considera-se que **D** = Complexo **1**, **CT** = Controle, **E** = escuro (sem a irradiação com o polimerizador), **1** = concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e **2** = concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

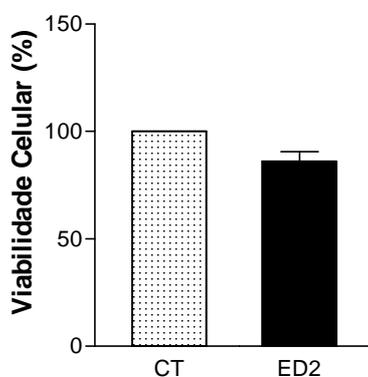


Figura 31: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos neoplásicos J774-A1 na ausência de luz para o complexo **1** na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Diferenças são consideradas significativas com $p < 0.05$ para Tukey como pós-teste para One-Way ANOVA.

Os estudos de citotoxicidade no escuro para o complexo **1** (Figura 31) indicaram que não houve diferença significativa entre eles e o controle (CT), ou seja, o composto utilizado na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e na ausência de luz não apresentou citotoxicidade.

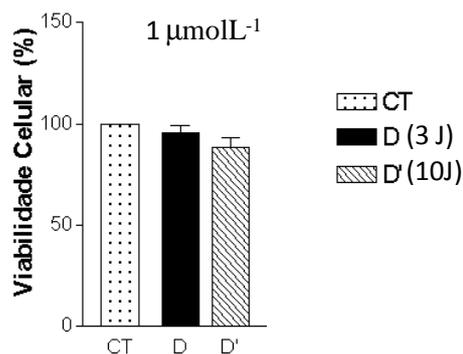


Figura 32: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade em macrófagos neoplásicos J774-A1 na presença de luz nas doses de 3,0 J cm⁻² e 10 J cm⁻² para o complexo **1** na concentração de 1,0 µmol L⁻¹. Diferenças são consideradas significativas com $p < 0.05$ para Tukey como pós-teste para One-Way ANOVA.

Nos estudos na presença de luz e na concentração de 1,0 µmol L⁻¹ (Figura 32) não se observou fototoxicidade do complexo **1**. Também, tal efeito não se mostrou dose dependente em relação à luz uma vez que foram observados resultados semelhantes para ambas as doses de 3,0 J cm⁻² e 10 J cm⁻².

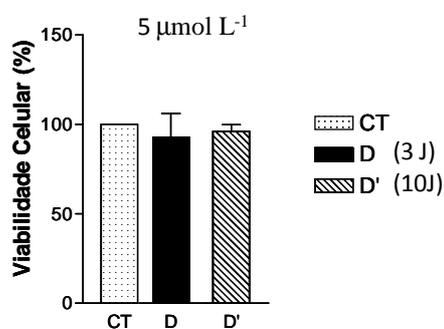


Figura 33: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade em macrófagos neoplásicos J774-A1 na presença de luz nas doses de 3,0 J cm⁻² e 10 J cm⁻² para o complexo **1** na concentração de 5,0 µmol L⁻¹. Diferenças são consideradas significativas com $p < 0.05$ para Tukey como pós-teste para One-Way ANOVA.

Para a concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 33) observa-se que o complexo **1** apresentou um comportamento análogo ao observado para a concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, não se observou fototoxicidade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste projeto foi desenvolver um sistema de entrega fotoquímica do fármaco 4-aminopiridina usando complexos polipiridínicos de Ru(II). Com este interesse obtivemos os seguintes resultados:

1. Os complexos estudados apresentaram solubilidade em meio aquoso e em meio orgânico, o que viabiliza o seu uso no sistema fisiológico.

2. Os complexos apresentaram absorção intensa na região do visível (acima de 450 nm) e luminescência intensa (acima de 600 nm). Estes resultados possibilitam o emprego da técnica fotoquímica para liberação do fármaco já que esta região espectral não causa danos às células. A luminescência observada permite também o uso destes compostos como agentes diagnósticos.

3. Os complexos estudados mostraram-se estáveis termicamente em solução aquosa e orgânica na ausência de luz. Mas mostraram alta reatividade fotoquímica com a liberação quantitativa da molécula de 4Apy quando irradiados com luz visível.

4. A liberação fotoquímica da molécula de 4Apy pode ser acompanhada pela supressão da luminescência do complexo de maneira quantitativa. Este dado é relevante uma vez que permite a sintonia seletiva e controlada de liberação do fármaco no sistema biológico, ou seja, pode-se sintonizar a célula de interesse através da luminescência do complexo de partida e controlar a liberação do fármaco pela intensidade da luz irradiada e concentração do complexo inicial. Estas informações podem ser coletadas externamente de maneira não invasiva pela técnica de luminescência.

5. A coordenação da 4Apy ao núcleo $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ não alterou suas características lipofílicas.

6. Os complexos estudados não apresentaram toxicidade tanto no escuro quanto na presença de luz quando analisados em células do tipo macrófago J774-A1.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que os complexos estudados são candidatos em potencial para aplicação no sistema fisiológico como sistemas de entrega fotoquímica da molécula 4-aminopiridina e como agentes diagnósticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ BARREIRO, E. J. "A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo". *Rev. Virtual Quim.*, **1** (1), p. 26-34, 2009.
- ² AMARAL, A. T. & MONTANARI, C. A. "Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos". *Quim. Nova*, **25** (1), p. 39-44, 2002.
- ³ WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P. & MITSCHER, L. A. "Glossary of terms used in medicinal chemistry". *Pure & Appl. Chem.*, **70** (5), p. 1129-1143, 1998.
- ⁴ ABRAMS, M. J. & MURRER, B.A. "Metal compounds in therapy and diagnosis". *Science*, **261** (6), p. 725-730, 1993.
- ⁵ ALLARDYCE, C. S. & DYSON, P. J. "Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects". *Platinum Metals Rev.*, **45** (2), p. 62-69, 2001.
- ⁶ HANNON, M. J. "Metal-based anticancer drugs: from a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology". *Pure & Appl. Chem.*, **79** (12), p. 2243–2261, 2007.
- ⁷ REISNER, E.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K. & POMBEIRO, A. J. I. "Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs". *Inorg. Chim. Acta*, **361**, p. 1569-1583, 2008.
- ⁸ CLARKE, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord. Chem. Rev.* **236**, p. 209-233, 2003.
- ⁹ STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E. & STASICKA, Z. "Light and metal complexes in medicine". *Coord. Chem. Rev.*, **171**, p. 203-220, 1998.
- ¹⁰ COMBA, P. "Metal ion selectivity and molecular modeling". *Coord. Chem. Rev.*, **185-186**, p. 81-98, 1999.
- ¹¹ SEDDON, E. A. *The Chemistry of Ruthenium*. New York, Elsevier, 1984.
- ¹² JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G. & KEPPLER, B. K. "Antitumor metal compounds: more than theme and variations". *Dalton Trans.*, (2), p. 183-194, 2008.
- ¹³ CAMPAGNA, S.; PUNTORIERO, F.; NASTASI, F.; BERGAMINI, G. & BALZANI, V. "Photochemistry and photophysics of coordination compounds: *Ruthenium*". *Top. Curr. Chem.* **280**, p. 117–214, 2007.

-
- ¹⁴ BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Porto Alegre, Artmed, 2002.
- ¹⁵ SHEPHERD, G. M. *Neurobiology*. Oxford, Oxford University Press, 1994.
- ¹⁶ LIPPARD, S. J. & BERG, J. M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, Mill Valley, Uni. Sci. Books, 1994.
- ¹⁷ COWAN, J. A. *Inorganic Biochemistry: An Introduction*, New York, Wiley-VCH, 1997.
- ¹⁸ WEISZ, C. J. C.; RAIKE, L. E.; SORIA-JASSO, L. E. & HESS, E. J. "Potassium channel blockers inhibit the triggers of attacks in the calcium channel mouse mutant tottering". *J. Neurosci.*, **25**, p. 4141-4145, 2005.
- ¹⁹ BOSTOCK, H.; SHERATT, R. M. & SEARS, T. A. "Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibres by prolonging action potentials". *Nature*, **274**, p. 385-387, 1978.
- ²⁰ BOSTOCK, H.; SEARS, T. A. & SHERATT, R. M. "The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres". *J. Physiol.*, **313**, p. 301-315, 1981.
- ²¹ SHERATT, R. M.; BOSTOCK, H. & SEARS, T. A. "Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres". *Nature*, **283**, p. 570-572, 1980.
- ²² TARG, E. F. & KOCSIS, J. D. "Action potential characteristics of demyelinated rat sciatic nerve following application of 4-aminopyridine". *Brain Research*, **363**, p. 1-9, 1986.
- ²³ MOLGÓ, J.; LEMEIGNAN, M.; PERADEJORDI, F. & LECHAT, P. "Effects presynaptiques des aminopyridines a la jonction neuromusculaire de vertébrés". *J. Pharmacol (Paris)*, **16** (II), p. 109-144, 1985.
- ²⁴ STEFOSKI, D.; DAVIS, F. A.; FAUT, M. & SCHAUF, C. L. "4-Aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis". *Ann. Neurol.*, **21**, p. 71-77, 1987.
- ²⁵ BEVER Jr., C. T. "The current status of studies of aminopyridines in patients with multiple sclerosis". *Ann. Neurol.*, **36** (0), p. 118-121, 1994.
- ²⁶ SEGAL, J. L. & BRUNNEMANN, S. R. "4-Aminopyridine improves pulmonary function in quadriplegic humans with longstanding spinal cord injury". *Pharmacotherapy*, **17** (3), p. 415-423, 1997.
- ²⁷ SCHWID, S. R.; PETRIE, M. D.; McDERMOTT, M. P.; TIERNEY, D. S.; MASON, D. H. & GOODMAN, A. D. "Quantitative assessment of sustained-release 4-aminopyridine for symptomatic treatment of multiple sclerosis". *Neurology*, **48** (4), p. 817-821, 1997.
- ²⁸ SELLIN, L. C. "The action of botulinum toxin at the neuromuscular junction". *Med. Biol.*, **59**, p.11-20, 1981.
- ²⁹ POTTER, P. J.; HAYES, K. C.; HSIEH, J. T. C.; DELANEY, G. A. & SEGAL, J. L. . "Sustained improvements in neurological function in spinal cord injured patients treated with oral 4-Aminopyridine: three cases". *Spinal Cord*, **36**, p. 147-155, 1998.

-
- ³⁰ HAYES, K. C. "The use of 4-Aminopyridine (Fampridine) in demyelinating disorders". *CNS Drug Rev.*, **10** (4), p. 295-316, 2004.
- ³¹ BLIGHT, A. R.; TOOMBS, J. P.; BAUER, M. S. & WIDMER, W. R. "The Effects of 4-Aminopyridine on Neurological Deficits in Chronic Cases of Traumatic Spinal Cord Injury in Dogs: A Phase I Clinical Trial" *J. Neurotrauma*. **8** (2), p. 103-109, 1991.
- ³² van der BRUGGEN, M. A. M.; Huisman, H. B. M.; BECKERMAN, H.; BERTELSMANN, F. W.; POLMAN, C. H. & LANKHORST, G. J. "Randomized trial of 4-aminopyridine in patients with chronic incomplete spinal cord injury". *J. Neurol.*, **248** (8), p. 665-671, 2001.
- ³³ STORK, C. M. & HOFFMAN, R. S. "Characterization of 4-Aminopyridine in overdose". *Clin. Toxicol.* **32** (5), p. 583-587, 1994.
- ³⁴ TACCOLA, G. & NISTRI, A. "Characteristics of the electrical oscillations evoked by 4-aminopyridine on dorsal root fibers and their relation to fictive locomotor patterns in the rat spinal cord in vitro". *Neuroscience*, **132** (4), p. 1187-1197, 2005.
- ³⁵ GUEST, J. D.; HIESTER, E. D. & BUNGE, R. P. "Demyelination and Schwann cell responses adjacent to injury epicenter cavities following chronic human spinal cord injury". *Exp. Neurology*. **192** (2), p. 384-393, 2005.
- ³⁶ PROUS, J. R. "Treatment of neurological disorders". *Drugs Fut.*, **29** (3), p. 253-317, 2004.
- ³⁷ DAVIDSON, E. R. "Computational Transition Metal Chemistry". *Chem. Rev.* **100**, p. 351-352, 2000, and other reviews in the same issue.
- ³⁸ LIN, Z. "Interplay between Theory and Experiment: Computational Organometallic and Transition Metal Chemistry". *Accounts of Chemical Research*. **43**, p. 602-611, 2010.
- ³⁹ GORELSKY, S. I. & LEVER, A. B. P.; "Electronic structure and spectra of ruthenium diimine complexes by density functional theory and INDO/S. Comparison of the two methods". *J. Organom. Chem.* **635**, p. 187-196, 2001.
- ⁴⁰ <<http://www.abraz.com.br/default.aspx>> Acessado em 09/07/2010.
- ⁴¹ <http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1011> Acessado em 16/09/2010; Newsletter n°274 – Ano VI – 24 de Outubro de 2006.
- ⁴² LEO, A.; HANSCH, C. & ELKINS, D. "Partition coefficients and their uses". *Chem. Rev.* **71** (6), p. 525-616, 1971.
- ⁴³ ZHANG, K. Y.; LI, S. P. Y.; ZHU, N.; OR, I. W.; CHEUNG, M. S. H.; LAM, Y. W. & LO, K. K. W. "Structure, Photophysical and Electrochemical Properties, Biomolecular Interactions, and Intracellular Uptake of Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Dipyridoquinoxaline Complexes". *Inorg. Chem.* **49**, p. 2530-2540, 2010.
- ⁴⁴ TETKO, I. V.; JAROSZEWICZ, I.; PLATTS, J. A. & KUDUK-JAWORSKA, J. "Calculation of lipophilicity for Pt(II) complexes: Experimental comparison of several methods". *J. Inorg. Biochem.* **102**, p. 1424-1437, 2008.

-
- ⁴⁵ McKEAGE, M. J.; PRICE, S. J. B.; GALETTIS, P.; BOWEN, R. J.; DING, W. B. L.; ZHUANG, L. & BAGULEY, B. C. "Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes". *Cancer Chemother Pharmacol*, **46**, p. 343-350, 2000.
- ⁴⁶ GARGADENNEC, S.; BURGOT, G.; BURGOT, J.L.; MANNHOLD, R. & REKKER, R.F. "Log P Estimation of 1, 2-dithiole-3-thiones and 1,2-dithiole-3-ones. A comparison of -experimental and calculative Approaches". *Pharm. Res.*, **22**, p. 875-888, 2005.
- ⁴⁷ GULABOSKI, R. & SCHOLZ, F. "Lipophilicity of Peptide Anions: An Experimental Data Set for Lipophilicity Calculations". *J. Phys. Chem. B*, **107**, p. 5650-5657, 2003.
- ⁴⁸ REYMOND, F.; STEYAERT, G.; CARRUPT, P.-A.; TESTA, B. & GIRAULT, H. H. "Ionic Partition Diagrams: A Potential-pH Representation" *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11951, 1996.
- ⁴⁹ TESTA, B.; VAN DE WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G. & GUY, R. "Pharmacokinetic Optimization in Drug Research"; Wiley-WCH: Weinheim, Germany, 2001.
- ⁵⁰ CARLOS, R. M.; CARDOSO, D. R.; CASTELLANO, E. E.; OSTI, R. Z.; CAMARGO, A. J.; MACEDO, L. G. & FRANCO, D. W. "Reactivity of radicals generated on irradiation of trans-[Ru(NH₃)₄(NO₂)P(OEt)₃](PF₆)". *J. Am. Chem Soc.*, **8**, p. 2546-2555, 2004.
- ⁵¹ CARLOS, R. M.; FERRO, A. A.; SILVA, H. A.; GOMES, M. G.; BORGES, S. S. S.; FORD, P. C.; TFOUNI, E. & FRANCO, D. W. "Photochemical reactions of trans-[Ru(NH₃)₄L(NO)]³⁺ complexes". *Inorg. Chim. Acta.* **357**, p. 1381-1388, 2004.
- ⁵² GOROSTIZA, P. & ISACOFF, E. "Optical switches and triggers for the manipulation of ion channels and pores". *Mol. BioSyst.*, **3**, p. 686-704, 2007.
- ⁵³ MAYER, G. & HECKEL, A. "Biologically Active Molecules with a Light Switch". *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, p. 4900-4921, 2006.
- ⁵⁴ HAZELL, A. C. & MUKHOPADHYAY, A. "Structure of bis(1,10-phenanthroline)platinum(II) dichloride trihydrate". *Acta Crystallogr. B*, **B36**, p. 1647, 1980.
- ⁵⁵ GRDENIC, D.; KAMENAR, B. & HERGOLD-BRUNDIC, A. "bis(1,10-Phenanthroline)mercury(II) nitrate, C₂₄H₁₆HgN₆O₆". *Cryst. Struct. Commun.*, **7**, p. 245-250, 1978.
- ⁵⁶ McKENZIE, E.D. Steric effect in bis(2,2'-bipyridyl) and bis(1,10-phenanthroline) metal compounds". *Coord. Chem. Rev.*, **6**, p. 187, 1971.
- ⁵⁷ LUNDH, H.; NILSSON, O. & ROSEN, I. "Treatment of Lambert-Eaton syndrome: 3,4-diaminopyridine and pyridostigmine". *Neurology*, **34**, p. 1324-1330, 1984.
- ⁵⁸ CARLSSON, C.; ROSEN, I. & NILSON, E. "Can 4-aminopyridine be used to reverse anaesthesia and muscle relaxation?". *Acta. Anaesthesiol. Scand.* **27**, p. 87-90, 1993.

-
- ⁵⁹ McEVOY, K. M.; WINDEBANK, A. J.; DAUBE, J. R. & LOW, P. A. "3,4-Diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome". *Engl. J. Med.*, **321**, p. 1567-1571, 1989.
- ⁶⁰ DAVIDSON, M.; ZEMISHLANY, Z.; MOHS, R. C.; HORVATH, T. B.; POWCHIK, P.; BLASS, J. P. & DAVIS, K. L. "4-Aminopyridine in the treatment of Alzheimer's disease". *Biol. Psychiatry*, **23**, p. 485-490, 1988.
- ⁶¹ KALYANASUNDARAM, K. "Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes". Academic press: 1994.
- ⁶² HIGGINS, B.; DeGRAFF, B. A. & DEMAS, J. N. "Luminescent Transition Metal Complexes as Sensors: Structural Effects on pH Response". *Inorg. Chem.*, **44**, p. 6662-6669, 2005.
- ⁶³ DEMAS, J.N.; DeGRAFF, B. A. & COLEMAN, P. B. "Oxygen sensors based on luminescence quenching". *Anal. Chem.*, **71**, p. 793A-800A, 1999.
- ⁶⁴ BAI, G. Y.; WANG, K. Z.; DUAN, Z. M. & GAO, L. H. "Luminescent pH sensing and DNA binding properties of a novel ruthenium(II) complex". *J. Inorg. Biochem.*, **98**, p. 1017-1022, 2004.
- ⁶⁵ SCHIEMANN, O.; TURRO, N. J. & BARTON, J. K. "EPR Detection of Guanine Radicals in a DNA Duplex under Biological Conditions: Selective Base Oxidation by Ru(phen)₂dppz³⁺ Using the Flash-Quench Technique". *J. Phys. Chem. B*, **104**, p. 7214-7220, 2000.
- ⁶⁶ KAPLAN, J. H.; FORBUSH, B. & HOFFMAN, J. F. "Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts". *Biochemistry*, **17**, p. 1929-1935, 1978.
- ⁶⁷ DORMAN, G. & PRESTWICH, G. D. "Using photolabile ligands in drug discovery and development". *Trends Biotechnol.*, **18**, p. 64-77, 2000.
- ⁶⁸ SRINIVAS, O.; MITRA, N.; SUROLIA, A. & JAYARAMAN, N. "Photo-Switchable Multivalent Sugar Ligands: Synthesis, Isomerization, and Lectin Binding Studies of Azobenzene-Glycopyranoside Derivatives". *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, p. 2124-2125, 2002.
- ⁶⁹ <<http://www.acorda.com/Default.aspx>> Acessado em 18/09/2010.
- ⁷⁰ JURIS, A.; BALZANI, V.; BARIGELLETI, F.; CAMPAGNA, S.; BELSER, P. & VON-ZELEWSKY, A. "Ruthenium(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence". *Coord. Chem. Rev.*, **84**, p. 85-277, 1988.
- ⁷¹ DURHAM, B.; WALSH, J. L.; CARTER, C. L. & MEYER, T. J. "Synthetic applications of photosubstitution reactions of poly(pyridyl) complexes of ruthenium(II)". *Inorg. Chem.*, **19**, p. 860-865, 1980.
- ⁷² PINNICK, D. V. & DURHAM, B. "Photosubstitution reactions of Ru(bpy)₂XYn⁺ complexes". *Inorg. Chem.*, **23**, p. 1440-1445, 1984.

- ⁷³ CHUN-YING, D.; ZHONG-LIN, L.; XIAO-ZENG, Y. & MAK, T. C. W. "Crystal structure and photochemistry of bis(bipyridine)-bis(4-aminopyridine)ruthenium(II)". *J. Coord. Chem.*, **46**, p. 301-312, 1999.
- ⁷⁴ YANG, X-J.; JANIAK, C.; HEINZE, J.; DREPPER, F.; MAYER, P.; PIOTROWSKI, H. & KLUFERS, P. "Heteroleptic 5,5'-disubstituted-2,2'-bipyridine complexes of ruthenium(II): spectral, electrochemical, and structural investigations". *Inorg. Chim. Acta*, **318**, p. 103-116, 2001.
- ⁷⁵ SANTIAGO, M.O.; DONICCI FILHO, C. L.; MOREIRA, I. S.; CARLOS, R. M.; QUEIROZ, S. L. & BATISTA, A. A. "Photochemical isomerization of trans- to cis-[RuCl₂(dppb)(4,4'-X₂-2,2'-bipy)] (X=H, -NO₂, -Me, -COOH, -SMe, -O:SMe, -Cl, -OMe) complexes". *Polyhedron*, **22**, p. 3205-3211, 2003.
- ⁷⁶ PATRICK, G. L. "An Introduction to Medicinal Chemistry". Oxford University Press, New York, 1995.
- ⁷⁷ SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J. & MEYER, T. J. "Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium". *Inorg. Chem.*, **17**, p. 3334-3341, 1978.
- ⁷⁸ JOHNSON, E. C.; SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; ADEYEMI, S. A. & MEYER, T. J.; "Synthesis and properties of the chloro-bridged dimer [(bpy)₂RuCl]₂²⁺ and its transient 3+ mixed-valence ion". *Inorg. Chem.*, **17**, p. 2211-2215, 1978.
- ⁷⁹ BONNESON, 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.*, **22**, p. 1761-1765, 1983.
- ⁸⁰ DURHAM, B.; WILSON, S. R.; HODGSON, D. J. & MEYER, T. J. "Cis-trans photoisomerization in Ru(bpy)₂(OH₂)₂²⁺. Crystal structure of trans-[Ru(bpy)₂(OH₂)(OH)](ClO₄)₂". *Journal of the American Chemical Society*, **102**, p. 600-607, 1980.
- ⁸¹ COLLECT Data Collection Software; Nonius: Delft, The Netherlands, 1998.
- ⁸² FARRUGIA, L. J. "ORTEP-3 for windows - a version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI)". *J. Appl. Crystallogr.* **30**, p. 565, 1997.
- ⁸³ OTWINOWSKI, Z. & MINOR, W. "Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode". *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, Part A*; **276**, p. 307-326, 1997.
- ⁸⁴ SHELDRIK, G. M. *SHELXS-97: Program for Crystal Structure Resolution*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
- ⁸⁵ FARRUGIA, L. J. "WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography". *J. Appl. Crystallogr.*; **32**, p. 837-838, 1999.
- ⁸⁶ BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; EDGINGTON, P. R.; KESSLER, M.; MACRAE, C. F.; McCABE, P.; PEARSON, J. & TAYLOR, R. "New software for searching the

Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures". *Acta Crystallogr., Sect. B*, **58**, p. 389–397, 2002.

⁸⁷ GENNETT, T.; MILNER, D. F. & WEAVER, M. J. "Role of solvent reorganization dynamics in electron-transfer processes. Theory-experiment comparisons for electrochemical and homogeneous electron exchange involving metallocene redox couples". *J. Phys. Chem.*, **89**, p. 2787-2794, 1985.

⁸⁸ Gaussian 09, Revision A.02, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A. Jr.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MoOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOŚLOWSKI, J.; FOX, D. J.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

⁸⁹ BECKE, A. D. "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange". *J. Chem. Phys.* **98**, p. 5648–5652, 1993.

⁹⁰ HAY, P. J. & WADT, W. R. "Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms scandium to mercury". *J. Chem. Phys.* **82**, p. 270–283, 1985.

⁹¹ HAY, P. J. & WADT, W. R. "Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for potassium to gold including the outermost core orbitals". *J. Chem. Phys.* **82**, p. 299–310, 1985.

⁹² WADT, W. R. & HAY, P. J. "Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements sodium to bismuth". *J. Chem. Phys.* **82**, p. 284–298, 1985.

⁹³ MIERTUS, S.; SCROCCO, E. & TOMASI, J. "Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects". *Chem. Phys.* **55**, p. 117-129, 1981.

⁹⁴ MIERTUS, S. & TOMASI, J. "Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes". *Chem. Phys.* **65**, p. 239-245, 1982.

⁹⁵ STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G. E. & FRISCH, M. J. "An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules". *J. Chem. Phys.*, **109**, p. 8218-8224, 1998.

-
- ⁹⁶ GRIMME, S.; "Calculation of the electronic spectra of large molecules". *Rev. Comput. Chem.*, **20**, p. 153–218, 2004.
- ⁹⁷ BAUERNSCHMITT, R. & AHLRICHS, R. "Treatment of electronic excitations within the adiabatic approximation of time dependent density functional theory". *Chem. Phys. Lett.*, **256**, p. 454-464, 1996.
- ⁹⁸ CASIDA, M. E.; JAMORSKI, C. CASIDA, K. C. & SALAHUB, D. R. "Molecular excitation energies to high-lying bound states from time-dependent density-functional response theory: characterization and correction of the time-dependent local density approximation ionization threshold". *J. Chem. Phys.*, **108**, p. 4439-4449, 1998.
- ⁹⁹ VLCEK, A. & ZALIS, S. "Modeling of charge-transfer transitions and excited states in d6 transition metal complexes by DFT techniques". *Coord. Chem. Rev.*, **251**, p. 258–287, 2007.
- ¹⁰⁰ GORELSKY, S. I. *SWizard program*, CCRI; University of Ottawa: Ottawa, Canada, 2008, <http://www.sg-chem.net/>.
- ¹⁰¹ GORELSKY, S. I. *AOMix: Program for Molecular Orbital Analysis*; University of Ottawa, 2007, <http://www.sg-chem.net/>.
- ¹⁰² GLENDENING, E. D.; BADENHOOP, J. K.; REED, A. E.; CARPENTER, J. E.; BOHMANN, J. A.; BOHMANN, C. M. & WEIHDOLD, F. "NBO 5.0". Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, 2001.
- ¹⁰³ RABEK, J. F. "Photochemistry" in "Experimental Methods in Photochemistry and Photophysics", Wiley&Sons, New York, 1967, Part 2.
- ¹⁰⁴ CASPAR, J. V. & MEYER, T. J. "Photochemistry of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) ion (Ru(bpy)₃2+). Solvent effects.". *J. Am. Chem. Soc.* **105**, p. 5583-5590, 1983.
- ¹⁰⁵ BARGAWI, K. R.; LLOBET, A. & MEYER, T. J. "Synthetic design of MLCT excited states. Ligand-substituted, mono-2,2'-bipyridine complexes of ruthenium(II)". *J. Am. Chem. Soc.* **110**, p. 7751-7759, 1988.
- ¹⁰⁶ KAPUSTA, P.; WAHL, M.; BENDA, A.; HOF, M. & ENDERLEIN, J. "Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy". *J. Fluoresc.* **17**, p. 43–48, 2007.
- ¹⁰⁷ KRUG, F. J. "Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar". Copiadora Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008, Capítulo 7, p. 252 – 255.
- ¹⁰⁸
<http://www.oecd.org/document/22/0,3343,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html> Acessado em 16/03/2010.
- ¹⁰⁹ BRAUMANN, T.; "Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships". *Journal of Chromatography*, **373**, p. 191-225, 1986.
- ¹¹⁰ ROBILLARD, M. S.; GALANSKI, M.; ZIMMERMANN, W.; KEPPLER, B. K. & REEDIJK, J. "(Aminoethanol)dichloroplatinum(II) complexes: influence of the

-
- hydroxyethyl moiety on 5'-GMP and DNA binding, intramolecular stability, the partition coefficient and anticancer activity". *J. Inorg. Biochem.* **88**, p. 254-259, 2002.
- ¹¹¹ SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J. & NIEMAN, T. A. "Análise Instrumental". 5^a ed., Editora Bookman, São Paulo, 2002.
- ¹¹² VALKO, K.; "Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution". *J. Chrom. A.* **1037**, p. 299-310, 2004.
- ¹¹³ DJAKOVIC-SSEKULIC, T. L.; PETROVIC, S. M.; PERISIC-JANJIC, N. U. & PETROVIC, S. D.; "HPLC behavior and hydrophobic parameters of some anilides". *Chromatographia*, **54**, p. 60-64, 2001.
- ¹¹⁴ BASOLO, F. & JOHNSON, R.C. "Coordination Chemistry". 2^a ed, British Library, 1986.
- ¹¹⁵ Ivanova, B.B.; Arnaudov, M. G. & Mayer-Figge, H. "Molecular spectral analysis and crystal structure of the 4-aminopyridinium tetrachloropalladate(II) complex salt". *Polyhedron*, **24**, p. 1624-1630, 2005.
- ¹¹⁶ MELLACE, M. G.; FAGALDE, F.; KATZ, N. E.; HESTER, H. R. & SCHMEHL, R. "Photophysical properties of the photosensitizer [Ru(bpy)₂(5-CNphen)]²⁺ and intramolecular quenching by complexation of Cu(II)". *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **181**, p. 28-32, 2006.
- ¹¹⁷ BRATERMAN, P. S. & SONG, J. I. "Spectroelectrochemistry of aromatic ligands and their derivatives. 1. Reduction products of 4,4'-bipyridine, 2,2'-bipyridine, 2,2'-bipyrimidine, and some quaternized derivatives". *J. Org. Chem.* **56**, p. 4678-4682, 1991.
- ¹¹⁸ BRYANT, G. M. & FERGUSON, J. E. "Charge-transfer and intraligand electronic spectra of bipyridine complexes of iron, ruthenium, and osmium. II. Tervalent complexes". *Austr. J. Chem.*, **24**, p. 275-286, 1971.
- ¹¹⁹ NOBLE, B. C. & PEACOCK, R. D. "Spectroscopic studies on the bipyridinium anion". *Spectrochimica Acta*, **46A**, p. 407-412, 1990.
- ¹²⁰ KREJCIK, M. & VICEK, A. A. "Electrochemical formation of dianions of 2,2'-bipyridine and related compounds" *J. Eletroanal. Chem.* **313**, p. 243-257, 1991.
- ¹²¹ BONNET, S.; COLLIN, J. P.; SAUVAGE, J. P. & SCHOFIELD, E. "Photochemical Expulsion of the Neutral Monodentate Ligand L in Ru(Terpy)(Diimine)(L)²⁺: A Dramatic Effect of the Steric Properties of the Spectator Diimine Ligand". *Inorg Chem.* **43**, p. 8346-8354, 2004.
- ¹²² WATSON, R. T.; JACKSON Jr., J. L.; HARPER, J. D.; KANE-MAGUIRE, K. A.; KANE-MAGUIRE, L. A. P. & KANE-MAGUIRE, 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**, p. 5-7, 1996.

ANEXO

Fluxograma: Resumo

