



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AURIDÉIA POSSIDÔNIO DE SOUSA BARROZO

**COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO: PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS E
AÇÃO ANTIMICROBIANA**

FORTALEZA

2022

AURIDÉIA POSSIDÔNIO DE SOUSA BARROZO

COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO: PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS E
AÇÃO ANTIMICROBIANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Alda Karine Medeiros Holanda.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B287c Barrozo, Auridéia Possidônio de Sousa.

Complexos metálicos de rutênio : propriedades fotoquímicas e ação antimicrobiana / Auridéia Possidônio de Sousa Barrozo. – 2022.
122 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Alda Karine Medeiros Holanda.

1. Rutênio. 2. Monóxido de carbono. 3. Óxido nítrico. 4. Metionina. 5. Propriedades fotoquímicas. I. Título.
CDD 540

AURIDÉIA POSSIDÔNIO DE SOUSA BARROZO

COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO: PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS E
AÇÃO ANTIMICROBIANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em: 11/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Alda Karine Medeiros Holanda (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Elisane Longhinotti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Ordelei Nascimento da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

A Deus, pela sua presença e amor infinito.

Ao Caio, meu “cristal” mais precioso e ao
João Paulo, pelo amor e companheirismo.

À minha família, em especial à minha mãe,
Maria Aurení, que nunca mediu esforços para
me proporcionar uma formação digna.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Alda Karine Medeiros Holanda, pelos ensinamentos, paciência e incentivo. A sua paixão e entusiasmo pela ciência sempre me contagiaram e me encorajaram a buscar sempre mais nessa caminhada. Sou grata por todo esse tempo de aprendizado, desde o mestrado, que foi de extrema relevância para que eu chegasse até aqui. Agradeço também pela amizade, pelos conselhos que foram importantes para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os professores do Grupo de Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Aos colaboradores que contribuíram com os resultados desse trabalho: ao doutorando Florêncio Gouveia, pelos cálculos teóricos; ao Laboratório de Cristalografia Estrutural da UFC (LABCRES), em nome do Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala e Dra. Beatriz Pinheiro Bezerra; ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da RMN (CENAUREM), em nome do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e ao doutorando Lucas Fonseca; à Nadia Pitombeira, pelas medidas de análise elementar; ao Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), em nome do Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira e das alunas Anna Luiza e Elizabeth, pela realização dos ensaios de atividade antimicrobiana dos complexos; a doutoranda Patrícia Helenita Rocha (Paty), pelos ensaios de eletroforese; a Ana Cláudia, pela realização dos experimentos de interação dos complexos com DNA; aos professores Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa e Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes, pela valiosa contribuição nos artigos.

Aos amigos do Grupo de Bioinorgânica Allan, Andrelane, Florêncio, Geângela, Henrique, Josiane, Karol, Lucas, Mayara, Monilson, Patrícia, Ricardo, Rodrigo, Suesley, Walysson, agradeço por todos os momentos compartilhados. Em especial, a Juliana, com quem dividi bancada. A Ju sempre foi solícita em me ajudar com as atividades do laboratório e hoje temos uma amizade muito consolidada. Aos amigos que conheci no Grupo e hoje fazem parte da minha vida: Vivânia, Danielle, Carlos Daniel, Wellinson, Edinilton, Mikael. Em especial, minha amiga Gilmara, que me reaproximou de Deus no momento em que mais precisei e isso fez toda diferença em minha vida.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFC e todo o corpo docente, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Aos órgãos de fomento CAPES, FUNCAP e CNPq pelo suporte financeiro.

“Mesmo que já tenha feito uma longa caminhada, sempre haverá mais um caminho a percorrer.”

Santo Agostinho

RESUMO

Complexos de Rutênio têm se destacado por apresentarem aplicações biológicas relevantes, inclusive pela possibilidade de utilização como pró-fármacos que podem ser fotoativados. Nesse trabalho, foram sintetizados três complexos de Rutênio: *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (I); *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (II), onde bpy = 2,2'-bipiridina e Met = metionina; *ct*-[RuCl(NO)(dppb)(4,4'-Mebpy)](PF₆)₂ (III), onde dppb = 1,4-bis(difenilfosfino) e Mebpy = 4,4'-dimetilbipiridina. Além de apresentarem o Rutênio como centro metálico, estes complexos possuem ligantes com potencial farmacológico que os tornam interessantes para aplicação como metalofarmacêuticos. Assim, os compostos I e III foram desenvolvidos pensando-se nas ações farmacológicas desempenhadas pelo monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), entre elas, as propriedades antibacterianas. Em relação ao complexo II, estudos apontam que aminoácidos, como a metionina, podem ser carreadores de drogas até alvos específicos como células cancerígenas e bactérias, o que despertou o interesse pelo composto. A caracterização foi realizada através de técnicas espectroscópicas (espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C), voltametria cíclica e difração de Raios X de monocristais. Os complexos foram submetidos a estudos fotoquímicos com luz ultravioleta e visível. As irradiações dos complexos foram acompanhadas por técnicas espectrofotométricas, cromatográficas e eletroquímicas. A liberação de CO, para o complexo I, foi confirmada pelos ensaios com mioglobina e voltametria cíclica com Hemina. A liberação de NO foi acompanhada por técnica espectrofotométrica. Além disso, o surgimento de um processo anódico em 0,8 V da solução irradiada do complexo, confirma a liberação do NO. Já no caso do complexo II, a constatação da liberação do ligante metionina foi feita através da espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Todos os complexos foram testados frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no entanto, o complexo I não mostrou atividade bactericida e bacteriostática. Os complexos II e III mostraram ação antimicrobiana apenas contra bactérias Gram-positivas, com destaque para o complexo III que mostrou um valor de concentração inibitória mínima (MIC) de 7,8 µg/mL frente as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Assim, os resultados evidenciam o desenvolvimento de novos complexos com potencial farmacológico e intensificado pela irradiação com luz visível.

Palavras-chave: rutênio; monóxido de carbono; óxido nítrico; metionina; propriedades fotoquímicas.

ABSTRACT

Ruthenium complexes have stood out for presenting relevant biological applications, including the possibility of being used as prodrugs that can be photoactivated. In this work, three ruthenium complexes were synthesized: *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (I); *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (II), where bpy = 2,2'-bipyridine and Met = methionine; *ct*-[RuCl(NO)(dppb)(4,4'-Mebpy)](PF₆)₂ (III), where dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino) and Mebpy = 4,4'-dimethylbipyridine. In addition to having Ruthenium as a metallic center, these complexes have ligands with pharmacological potential that make them interesting for application as metal-pharmaceuticals. The characterization was performed using spectroscopic techniques (electron spectroscopy in the ultraviolet and visible region, vibrational spectroscopy in the infrared region and ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance), cyclic voltammetry and X-ray diffraction. Thinking about the pharmacological actions performed by carbon monoxide (CO) and nitric oxide (NO), among them, the bacteriostatic and bactericidal properties. Regarding complex II, studies indicate that amino acids, such as methionine, can be drug carriers to specific targets such as cancer cells and bacteria, which motivated the synthesis and characterization of this compound. The complexes were subjected to photochemical studies with ultraviolet and visible light. The irradiations of the complexes were monitored by spectrophotometric, chromatographic and electrochemical techniques. The release of CO was confirmed by assays with myoglobin and cyclic voltammetry with Hemin. NO release was monitored by spectrophotometric technique. Furthermore, the appearance of an anodic process at 0.8 V of the irradiated solution of the complex, confirms the release of NO. In the case of complex II, the verification of the release of the methionine ligand was made through vibrational spectroscopy in the infrared region. All complexes were tested against strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, however, complex I did not show bactericidal and bacteriostatic activity. Complexes II and III showed antimicrobial action only against Gram-positive bacteria, with emphasis on complex III which showed a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 7.8 µg/mL against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Thus, the results show the development of new complexes with pharmacological potential benefited by irradiation with visible light.

Keywords: ruthenium; carbon monoxide; nitric oxide; methionine; photochemical properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura dos complexos de Rutênio que apresentaram potencial ação como metalofarmacêuticos apresentados em ordem cronológica.....	22
Figura 2	- Processos de geração de espécies reativas de oxigênio ou oxigênio singlete que causam a apoptose celular.	23
Figura 3	- Atividades terapêuticas do CO e NO.....	25
Figura 4	- Complexos metálicos contendo aminoácidos como ligantes.	27
Figura 5	- Formação de adutos entre complexo metálico e DNA através de ataque nucleofílico, resultando nas interações covalente de esfera interna (A), covalente de esfera externa (B) e interação não covalente de esfera externa (C).	28
Figura 6	- Etapas da fotoativação do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (INH) ₂] ²⁺	32
Figura 7	- Representação esquemática da disposição dos eletrodos na célula eletroquímica.....	35
Figura 8	- Sistema montado para a produção de óxido nítrico gasoso.....	39
Figura 9	- Processo de modificação do eletrodo.	43
Figura 10	- Eletroforese em gel de agarose. Solidificação do gel, deixando-se formar os poços onde as amostras de DNA serão inseridas (I) e submetidas a um campo elétrico (II).....	45
Figura 11	- Representação do método de crescimento de cristais para o complexo I...	49
Figura 12	- Estrutura ORTEP do complexo de forma geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].6(H ₂ O).(CH ₃ CH ₂ OH). Elipsóides com 50% de probabilidade.....	49
Figura 13	- Parâmetros geométricos e $\nu(\text{CO})$ para complexos do tipo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ L(CO)] ^{n+/0} , em que L = (1): CO, (2): ONO ₂ -, (3): SO ₃ ²⁻ , (4): CH ₃	52
Figura 14	- Rede tridimensional de ligações de hidrogênio para o complexo de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].6(H ₂ O).(CH ₃ CH ₂ OH).	53
Figura 15	Figura 15 - Representação dos possíveis modos de coordenação monodentada do ligante sulfito.	54
Figura 16	- Espectros vibracionais na região do infravermelho para os complexos <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ Cl ₂] (em vermelho) e <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)] (em preto) em pastilhas de KBr.	55

Figura 17	- (A) Espectro de ressonância magnética de ^1H do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em D_2O ; (B) Espectro ^1H - ^1H RMN COSY.....	56
Figura 18	- Espectro de ressonância magnética de ^{13}C do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em D_2O	59
Figura 19	- Voltamograma cíclico do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em solução de acetonitrila contendo PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1}	61
Figura 20	- Espectros eletrônicos calculado (em vermelho) e experimental (em preto) para o complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em água a uma concentração de $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	62
Figura 21	- Composição dos orbitais moleculares do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em função dos fragmentos: Ru (em laranja), bpy (em azul), SO_3^{2-} (em cinza) e CO (em amarelo).....	63
Figura 22	- Espectros eletrônicos para a irradiação em 350 nm do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em solução aquosa durante 180 minutos.....	64
Figura 23	- Reação de fotosubstituição da molécula de monóxido de carbono por uma molécula de solvente.....	65
Figura 24	- Acompanhamento da reação de fotosubstituição do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ por CLAE, com irradiação em 350 nm. Os cromatogramas (em azul) foram monitorados a 250 nm, fase móvel = metanol/água (contendo HTFA 0,1%) 85/15%, pH = 3,5, fluxo = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os espectros eletrônicos (em preto) foram obtidos a partir do detector cromatógrafo.....	66
Figura 25	- Espectros na região do UV-Vis para a mioglobina a $12 \mu\text{M}$ nas formas deoxigenada, saturada com CO e exposta ao ar (ligada ao Oxigênio).....	67
Figura 26	- Acompanhamento por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis de uma solução contendo $12 \mu\text{M}$ de mioglobina e $24 \mu\text{M}$ do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em PBS $0,1 \text{ M}$, pH = 7,4. Irradiação em 350 nm por 360 minutos a 37°C (A) e acompanhamento cinético (B).	69
Figura 27	- voltamogramas cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo não modificado (em vermelho), eletrodo modificado com HmFeIII/Nafion [®] em solução de PBS deaerada pH = 7,4 (em preto) e com adição do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ irradiado por 10 minutos em 350 nm.	70

Figura 28	- Representação esquemática do método de difusão de vapor para obtenção de monocristais.	73
Figura 29	- Estrutura ORTEP do complexo de forma geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ . Elipsóides com 50% de probabilidade.	74
Figura 30	- Espectros vibracionais na região do infravermelho para a metionina livre (A) e o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ (B) em pastilha de KBr, numa ampliação de 500 a 2000 cm ⁻¹	77
Figura 31	- Espectros ¹ H RMN da metionina livre (A) e do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ (B) em DMSO deuterado.	79
Figura 32	- Espectro de ¹ H RMN bidimensional COSY para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ em DMSO deuterado.	80
Figura 33	- Espectro de ressonância magnética de ¹³ C do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ em DMSO.	81
Figura 34	- Voltamograma cíclico do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ em solução de NaTFA 0,10 mol L ⁻¹ , pH = 2,5 a 100 mV s ⁻¹	82
Figura 35	- Espectros eletrônicos calculado (em vermelho), experimental (em preto) para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ em água a uma concentração de 1,2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e espectro eletrônico (em azul) do precursor <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Cl ₂)] em água a uma concentração de 3,68 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	83
Figura 36	- Composição dos orbitais moleculares do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ em função dos fragmentos: Ru (em laranja), bpy (em azul) e Met (em cinza).	84
Figura 37	- Espectros eletrônicos para a irradiação do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ com luz λirradiação = 505 nm, em solução aquosa durante 100 minutos.	85
Figura 38	- Acompanhamento da reação de fotossustituição do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ por CLAE, com irradiação em 453 nm. Os cromatogramas (em azul) foram monitorados a 250 nm, fase móvel = metanol/água (contendo HTFA 0,1%) 45/55%, pH = 3,5, fluxo = 1,0 mL min ⁻¹ . Os espectros eletrônicos (em preto) foram obtidos a partir do detector cromatógrafo.	86
Figura 39	- Espectro vibracionais na região do infravermelho para metionina livre (A), o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ (B) e o produto da fotólise	

	isolado (C) após irradiação em 453 nm em pastilha de KBr, em uma ampliação da 480 a 2000 cm^{-1}	87
Figura 40	- Espectros eletrônicos para o ensaio de interação com DNA após filtração na coluna de exclusão. Em preto a amostra (500 μM do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ + luz) e em vermelho (500 μM do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ + 500 μM de DNA + luz).	89
Figura 41	- Eletroforese em gel de agarose dos complexos <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ (A) e <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (H ₂ O) ₂](PF ₆) ₂ (B) na ausência de luz e após irradiação por 1 h com luz azul.	90
Figura 42	- Mecanismo proposto para a atividade antimicrobiana do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂	93
Figura 43	- Espectro eletrônico para o complexo <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF ₆) ₂ em metanol a uma concentração de $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	95
Figura 44	- Espectros eletrônicos para a irradiação do complexo <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF ₆) ₂ em metanol, a uma concentração de $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com luz $\lambda_{\text{irradiação}} = 453 \text{ nm}$ durante 50 minutos.	96
Figura 45	- Espectros eletrônicos do complexo <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF ₆) ₂ em solução DMSO/H ₂ O 4%, no tempo inicial (em preto) e após 24h no escuro (em vermelho). 97	97
Figura 46	- Voltamograma de Pulso Diferencial do complexo <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF ₆) ₂ em solução de NaTFA 0,10 mol L^{-1} , pH = 3,0. Voltamograma inicial (linha cheia) e após 10 minutos de irradiação em 463 nm (linha tracejada).	98
Figura 47	- Espectros de absorção na região do infravermelho para o complexo <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF ₆) ₂ disperso em pastilha de KBr, sob irradiação com luz azul durante 1h.	99
Figura 48	- Representação da conversão intersistema que leva a formação de oxigênio singlete (Diagrama de Jablonski).	100
Figura 49	- Espectros de fluorescência do DPBF (20 μM), em metanol, na presença dos complexos <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(Mebpy)] (A) e <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF ₆) ₂ (B) sob irradiação com LED azul. $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$	100

Figura 50	- Curva cinética de consumo do DPBF em função do tempo de irradiação com LED azul.	101
Figura 51	- Eletroforese em gel de agarose dos complexos <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF ₆) ₂ (A) e <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(Mebpy)] (B) na ausência de luz e após irradiação por 1 h com luz azul.	102
Figura 52	- Espectros eletrônicos para o ensaio de interação com DNA após filtração na coluna de exclusão.	103
Figura 53	- Mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana do complexo <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF ₆) ₂	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Reagentes/solventes e suas procedências.	34
Tabela 2	- Dados cristalográficos de refinamento da estrutura do complexo de forma geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].6(H ₂ O).(CH ₃ CH ₂ OH).	50
Tabela 3	- Comprimentos de ligação [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para o complexo de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].6(H ₂ O).(CH ₃ CH ₂ OH).	50
Tabela 4	- Resultado de análise elementar para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].	53
Tabela 5	- Deslocamentos químicos (ppm) de ¹ H do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].	58
Tabela 6	- Influência dos ligantes auxiliares no deslocamento químico da carbonila em complexos do tipo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (L)(CO)].	60
Tabela 7	- Dados de UV-Vis (experimental) para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)] em água.	63
Tabela 8	- Valores de rendimento quântico (Φ) para liberação fotoquímica de CO a partir do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].	64
Tabela 9	- Atividade antimicrobiana do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)].	71
Tabela 10	- Dados cristalográficos de refinamento da estrutura do complexo de forma geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂	74
Tabela 11	- Comprimentos de ligação [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para o complexo de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂	75
Tabela 12	- Resultado de análise elementar para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂	76
Tabela 13	- Deslocamentos químicos (ppm) de ¹ H do complexo complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂	80
Tabela 14	- Dados de UV-Vis para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ em água.	84
Tabela 15	- Atividade antimicrobiana do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	92
Tabela 16	- Atividade antimicrobiana dos complexos <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(Mebpy)] e <i>ct</i> -[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF ₆) ₂ frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.	104

Tabela 17 - Ação antimicrobiana para complexos de Rutênio mediante irradiação com luz azul.....	108
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
A549	Linhagens de células (adenocarcinoma de pulmão)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bpy	2,2'- bipyridina
CCD-1029Sk	Linhagens de células (fibroblasto normal)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO	Monóxido de carbono
CO-RMs	Moléculas liberadoras de CO
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
D ₂ O	Água deuterada
DFT	Teoria do funcional da densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA pBR322	DNA circular plasmidial
DPBF	Difenilbenzofurano
dppb	1,4 – bis(difenilfosfina)butano
E _{1/2}	Potencial de meia-onda
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FI	DNA plasmidial superenovelado em fita única
FII	DNA plasmidial clivado em fita única
FIII	DNA plasmidial clivado em fita dupla
HCT-9	Linhagens de células (câncer de colón)
Hep G2	Linhagens de células (hepatocarcinoma humano)
HO	Enzima heme-oxigenase
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IL	Transição intraligante

i_{pa}	Corrente de pico anódico
i_{pc}	Corrente de pico catódico
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (Diodo emissor de luz)
LUMO	Orbital molecular não ocupado de menor energia
Mb	Mioglobina
MBC	Concentração bactericida mínima
MbCO	Carboximioglobina
MDA-MB-231	Linhagens de células (câncer de mama)
Mebpy	4,4'- dimetilbipiridina
Met	Metionina
MIC	Concentração inibitória mínima
MLCT	Transferência de carga metal-ligante
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaTFA	Trifluoroacetato de sódio
NH ₄ PF ₆	Hexafluorofosfato de amônio
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima NO sintetase
PACT	Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana
PDAMT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
PRAMT	Terapia de fotoliberação antimicrobiana
PTBA	Perclorato de tetrabutílamônio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SO ₃	Sulfito
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TFD	Terapia fotodinâmica
T _R	Tempo de retenção
UV-Vis	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível
δ/ppm	Deslocamento químico em partes por milhão
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
ν_{ass}	Estiramento assimétrico
ν_{CO}	Frequência de estiramento do monóxido de carbono

v_s

Estiramento simétrico

Φ

Rendimento quântico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Complexos de Rutênio com possível ação como metalofarmacêuticos	21
1.2	Monóxido de Carbono (CO) e Óxido nítrico (NO)	23
1.3	Complexos contendo aminoácidos	26
1.4	Interações de complexos metálicos com o DNA	28
1.4.1	<i>Clivagem do DNA</i>	29
1.5	Atividade antibacteriana de complexos polipiridínicos de Ru(II)	30
2	OBJETIVOS	33
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
3.1	Atmosfera inerte	34
3.2	Reagentes e solventes	34
3.3	Equipamentos e técnicas experimentais	35
3.3.1	<i>Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)</i>	35
3.3.2	<i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i>	35
3.3.3	<i>Medidas Eletroquímicas</i>	35
3.3.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	36
3.3.5	<i>Cristalização dos complexos e difração de raios-X</i>	36
3.3.6	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	36
3.4	Síntese dos complexos	37
3.4.1	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂Cl₂]</i>	37
3.4.2	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (complexo I)</i>	37
3.4.3	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (complexo II)</i>	37
3.4.4	<i>Síntese do complexo cis-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)]</i>	38
3.4.5	<i>Síntese do complexo ct-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂ (complexo III)</i>	38
3.5	Análise Elementar	39
3.6	Estudo Fotoquímico	39

3.6.1	Actinometria Química.....	39
3.7	Análises de liberação CO	42
3.7.1	<i>Método espectrofotométrico</i>	42
3.7.2	<i>Método eletroquímico por modificação de eletrodo com hemina</i>	43
3.8	Ensaio de isolamento do complexo-DNA por coluna de exclusão.....	44
3.9	Eletroforese em Gel de Agarose	44
3.10	Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)	45
3.11	Estudos computacionais.....	46
3.12	Atividade antimicrobiana	47
4	PARTE I - RESULTADOS E DISCUSSÃO PARA O COMPLEXO <i>cis</i>- [Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (I)	48
4.1	Síntese do complexo (I)	48
4.2	Caracterização do complexo (I)	48
4.2.1	<i>Difração de Raios X de monocristais</i>	48
4.2.2	<i>Análise elementar</i>	53
4.2.3	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	53
4.2.4	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C</i>	56
4.2.5	<i>Medidas eletroquímicas</i>	60
4.2.6	<i>Espectroscopia eletrônica</i>	61
4.3	Estudo Fotoquímico.....	63
4.4	Ensaio de liberação de CO	67
4.4.1	<i>Método espectrofotométrico</i>	67
4.4.2	<i>Método eletroquímico</i>	69
4.5	Atividade antimicrobiana	70
5	PARTE II – RESULTADOS E DISCUSSÃO PARA O COMPLEXO <i>cis</i>- [Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (II)	72
5.1	Síntese do complexo (II).....	72

5.2	Caracterização do complexo (II).....	72
5.2.1	<i>Difração de Raio x de monocristais</i>	72
5.2.2	<i>Análise elementar</i>	76
5.2.3	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	77
5.2.4	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C</i>	78
5.2.5	<i>Medidas eletroquímicas</i>	81
5.2.6	<i>Espectroscopia eletrônica</i>	82
5.3	Estudo Fotoquímico.....	84
5.4	Estudo de interação e fotoclivagem com DNA.....	88
5.4.1	<i>Ensaio de isolamento do complexo-DNA por coluna de exclusão</i>	88
5.4.2	<i>Ensaio de clivagem de DNA</i>	89
5.5	Atividade antimicrobiana.....	91
6	PARTE III – RESULTADOS E DISCUSSÃO PARA O COMPLEXO <i>ct</i> - [RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF ₆) ₂ (III).....	94
6.1	Síntese do complexo (III).....	94
6.2	Estudo Fotoquímico.....	95
6.3	Geração de Oxigênio Singlete (¹ O ₂).....	99
6.4	Estudo de interação e fotoclivagem com DNA.....	102
6.4.1	<i>Ensaio de clivagem de DNA</i>	102
6.4.2	<i>Ensaio de isolamento do complexo-DNA por coluna de exclusão</i>	103
6.5	Atividade antimicrobiana.....	104
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
	REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

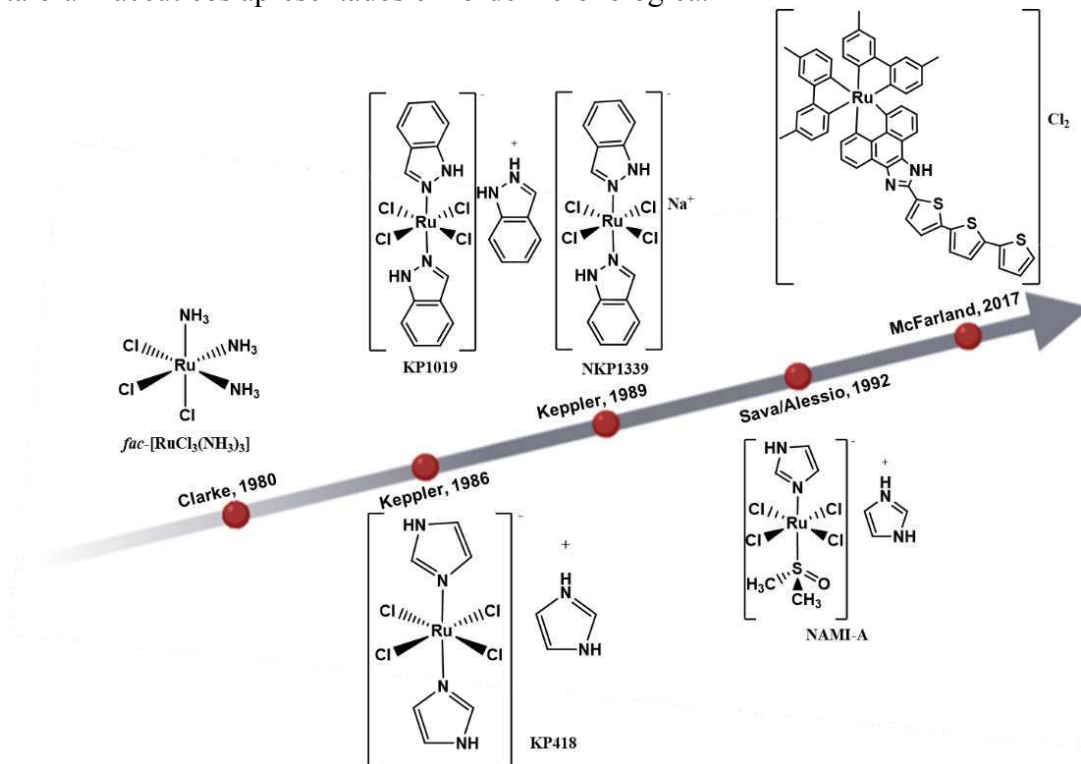
1.1 Complexos de Rutênio com possível ação como metalofarmacêuticos

Nos últimos quarenta anos, os complexos de Rutênio vêm ganhando destaque na química inorgânica devido às suas propriedades biológicas, catalíticas e eletrônicas (MITAL; ZIORA, 2018). No contexto do desenvolvimento de novas drogas, destacam-se algumas características: diferentes e acessíveis estados de oxidação (II e III) em meio fisiológico, bem como o efeito do estado de oxidação na distribuição do medicamento (SHEN et al., 2017); possibilidade de até seis sítios de coordenação e facilidade na troca desses ligantes (CHEN et al., 2010); menor toxicidade em relação a medicamentos já utilizados, como aqueles a base de platina (HARTMANN; LIPP, 2003) e propriedades de coordenação similares as do ferro (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Em 1980, foi reportada a atividade antitumoral do complexo *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃]. Entretanto, a continuidade nos testes foi interrompida pela baixa solubilidade do composto em água (CLARKE, 1980). Anos depois, uma nova classe de compostos foi apresentada, representados pelas siglas KP418 e KP1019, contendo ligantes heterocíclicos coordenados através do nitrogênio nas posições *trans*, juntamente com quatro ligantes cloretos equatoriais. Estes complexos apresentaram atividade contra tumores colorretais resistentes a cisplatina, no entanto, o KP418 não chegou a fase de testes em humanos devido a sua maior nefrotoxicidade quando comparado ao KP1019. Este último, apresenta uma velocidade de reação lenta na troca dos ligantes em meio fisiológico, semelhante aos complexos de platina já utilizados. Sua ação está centrada na interação covalente com o DNA, mas devido à baixa solubilidade em água, seus estudos foram interrompidos (RICCARDI et al., 2017). Uma modificação foi feita neste complexo para melhorar a solubilidade, dando origem ao NKP1339. Em seguida veio o NAMI-A mostrando-se eficaz ao inibir a proliferação de linhagens de células mielóides e linfóides. Sua atividade está relacionada a interação com o DNA, impedindo o progresso do ciclo celular (ALESSIO, 2017). O complexo também apresenta atividade antimetastática e antiangiogênica, no entanto, foi pouco ativo para tumores sólidos (ALESSIO et al., 2004). Em 2008, foram realizados os ensaios pré-clínicos, onde os melhores resultados foram obtidos através da sua combinação com a gemcitabina, um quimioterápico, chegando até a fase II. Dos 27 pacientes avaliados, a dose máxima tolerada mostrou remissão em um caso e estabilização em outros 10 pacientes. Este resultado não foi satisfatório e o estudo foi interrompido (LEIJEN et al., 2015). Um dos complexos de Rutênio mais recentes em etapas clínicas, trata-se de um composto polipiridínico, o TLD1433. O tratamento por fotoativação mostrou necrose tumoral

significativa, sendo a atividade do complexo baseada na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que induz a apoptose celular (MONRO et al., 2019). A Figura 1 apresenta um resumo em ordem cronológica da descoberta e estudo desses compostos bem como as estruturas dos mesmos.

Figura 1 - Estrutura dos complexos de Rutênio que apresentaram potencial ação como metalofarmacêuticos apresentados em ordem cronológica.

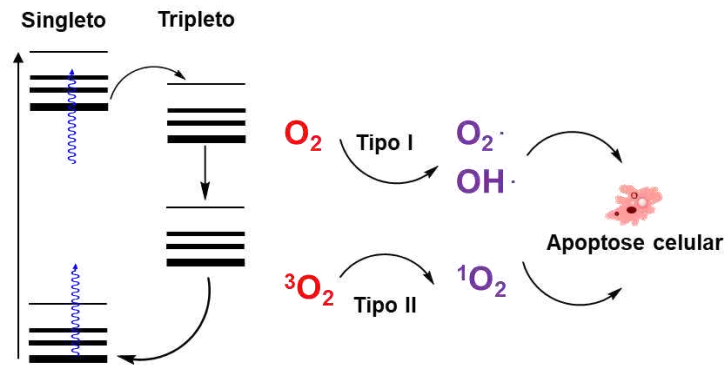


Fonte: adaptado da referência (MITAL; ZIORA, 2018).

Na maior parte destes complexos citados, o Rutênio encontra-se no estado de oxidação III. O mecanismo de atuação proposto para o Ru (III) seria a ativação por redução. Os complexos seriam transportados pela transferrina, albumina ou outra biomolécula para o interior da célula tendo como alvo o DNA (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Complexos de Ru (II) apresentam propriedades fotofísicas que são uma vantagem por permitir aplicações biológicas ativadas por luz, como é o caso do complexo TLD1433. Neste tipo de tratamento, conhecido como “Terapia fotodinâmica” (TFD), um composto fotossensibilizador é aplicado e em seguida ativado por luz. A administração do medicamento pode ser feita sistêmica ou topicamente (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). A Figura 2 ilustra os processos de geração de espécies citotóxicas relacionados a TFD. Mediante a irradiação de luz, o agente fotossensibilizador leva a reações de transferência de elétrons com biomoléculas, gerando espécies reativas de oxigênio (reações do tipo I) ou a transferência de elétrons ao oxigênio

molecular gerando oxigênio singleto (reações do tipo II) e por se tratar de espécies reativas, podem danificar macromoléculas como o DNA, levando a apoptose celular (HESS et al., 2017).

Figura 2 - Processos de geração de espécies reativas de oxigênio ou oxigênio singleto que causam a apoptose celular.



Fonte: Adaptado da referência (HESS et al., 2017).

O composto fotossensibilizador utilizado em TFD deve absorver luz na região da “janela terapêutica”, que corresponde à região do espectro eletromagnético compreendida entre 600 e 900 nm. Além disso, ter boa solubilidade em água e um rendimento quântico alto do estado excitado tripleto para formação de oxigênio singleto (MEEROVICH et al., 2016). Outra aplicação terapêutica para complexos de Ru(II) corresponde à liberação de moléculas bioativas, como o monóxido de carbono (CO), óxido nítrico (NO) ou outros agentes citotóxicos (MANN; MOTTERLINI, 2007).

1.2 Monóxido de Carbono (CO) e Óxido nítrico (NO)

Embora o CO ainda seja muito conhecido como “assassino silencioso” e o NO como fonte de gases NO_x , que causam poluição, estes gases são duas moléculas sinalizadoras que em baixas concentrações são essenciais para a vida. Em 1968, descobriu-se que o CO é produzido endogenamente pelos mamíferos como resultado da degradação de heme proteínas denominadas heme oxigenases (HO) (TENHUNEN; MARVER; SCHMID, 1968). Entretanto, houveram poucas investigações sobre a sua função em humanos, até que a importância do NO foi reconhecida e então durante a década de 1990 as pesquisas sobre suas atividades avançaram rapidamente, demonstrando a participação dessas moléculas em diversos processos fisiológicos, chamando a atenção devido seus potenciais terapêuticos.

Nas últimas décadas, estudos têm confirmado os efeitos benéficos do CO no tratamento de processos anti-inflamatórios. Sendo este um efeito potencial, uma vez que conduz diversas doenças. Entre elas, o CO mostrou benefícios consideráveis para tratar doença pulmonar obstrutiva crônica, doença neuroinflamatória, doença inflamatória intestinal e sepse (YAN et al., 2019). Relata-se também a ação proapoptótica e antiproliferativa em células malignas (VÍTEK et al., 2014). No sistema cardiovascular, o CO inibe a agregação plaquetária, conferindo propriedades vasodilatadoras a essa molécula (PATHWAYS et al., 2004). Estudos também avaliam o CO como um novo agente antimicrobiano de amplo espectro. Neste caso, a ação dele é exercida no aumento da resposta imune do hospedeiro, causando a morte bacteriana (CHIN; OTTERBEIN, 2009; SIRACUSA et al., 2021).

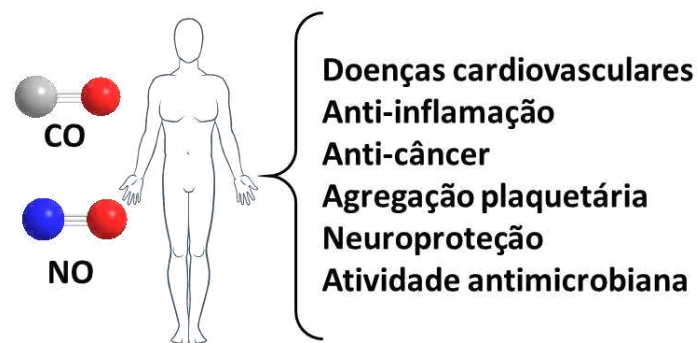
A administração direta do gás CO foi capaz de causar prejuízo significativo no crescimento de culturas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (NOBRE et al., 2007). No entanto, a aplicação do CO_(g) constitui um desafio. Pode-se dizer que a barreira entre a dose tóxica e terapêutica é bem “estreita”, devido a sua alta afinidade pela hemoglobina. Além disso, é importante ressaltar que os CO-RMs (moléculas liberadoras de CO) demonstraram maior poder bactericida que do CO_(g), devido ao acúmulo destes compostos dentro das células bacterianas. Os mecanismos citados para o efeito antimicrobiano dos CO-RMs envolvem a inibição da cadeia respiratória bacteriana (DAVIDGE et al., 2009), aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (TAVARES; NOBRE; SARAIVA, 2012), aumento da polarização da membrana e interferência da expressão gênica (WAREHAM et al., 2018), entre outros. Um complexo citado na literatura como agente antimicrobiano é o tryptoCORM, que se mostrou potente frente a *E. coli*, mediante fotoliberação do CO (WARD et al., 2014).

O NO também é um gás produzido endogenamente, sendo um importante mensageiro intercelular nos mamíferos, onde é produzido pela oxidação do resíduo da guanidina do aminoácido L-arginina. A reação é catalisada pela enzima NO sintetase (NOS), utilizando oxigênio e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) como substratos. Como produtos, são formados citrulina e NO (PANDEY, K., 1983). Esta molécula participa de diversos processos fisiológicos, incluindo atuação no sistema imunológico, atua no sistema nervoso central, controle da pressão sanguínea e vasodilatação, entre outros (CARAMORI, 2015). Estudos também tem demonstrado a atividade antitumoral de nitrosilo complexos, uma vez que há a possibilidade da liberação da molécula de NO dentro da célula tumoral (SERLI et al., 2003). No entanto, deve-se proceder com cautela neste caso também. Altos níveis de NO

pode induzir estresse nitrosativo e apoptose celular e níveis mais baixos estimular a angiogênese, induzindo o crescimento do tumor (THOMAS et al., 2008).

Tanto o CO quanto o NO, tratam-se de duas moléculas de bastante relevância biológica (Figura 3). No entanto, ao comparar seus mecanismos de ação, tem-se que: o CO é uma molécula relativamente pouco reativa e liga-se, preferencialmente, ao grupo heme e citocromos, sendo que esta reação é reversível. O NO é altamente reativo, estando em solução por um curto período de tempo e isso pode, de certa forma, oferecer a vantagem do CO continuar a exercer suas propriedades de sinalização em ambientes onde a biodisponibilidade do NO é comprometida (MANN; MOTTERLINI, 2007). O fato é que, nenhuma das duas moléculas são seguras para a utilização farmacológica estando na forma gasosa. Por esse motivo, esforços são então direcionados para uma forma de armazenamento e manuseio seguro, juntamente com uma liberação direcionada e controlada para um alvo específico. Nesse contexto, os complexos metálicos são promissores, pois são capazes de liberar tanto NO quanto CO de forma controlada no organismo. Isso pode ser através de estímulos endógenos ou exógenos como calor, luz ou outros fatores (INABA; FUJITA; UENO, 2015; SCHATZSCHNEIDER, 2015).

Figura 3 - Atividades terapêuticas do CO e NO.



Fonte: Adaptada da referência (LING et al., 2018).

Quando o estímulo utilizado para a liberação do CO ou NO é a luz, tem-se que considerar uma série de fatores. O primeiro deles é a solubilidade em água ou em solução aquosa de DMSO, que é frequentemente utilizado para a liberação de fármacos. Outro fator é a estabilidade em meio aquoso e temperatura fisiológica, sendo ideal a liberação das moléculas de interesse, apenas quando acionadas por luz. Também é importante que o produto da

fotorreação contendo o metal não seja tóxico ou apresente baixa toxicidade a longo prazo. Por fim, é interessante que o composto apresente fotorreatividade quando expostas à luz com comprimentos de onda na região da janela terapêutica (FORD, 2018).

1.3 Complexos contendo aminoácidos

A literatura reporta que alguns aminoácidos podem ser usados como carreadores de drogas antineoplásicas, é o caso do conjugado metionina-mitomomicina (YOSHIDA et al., 1998). O estudo foi baseado no fato de as células tumorais apresentarem absoluta dependência de um suprimento do aminoácido metionina, que é utilizado tanto para síntese de proteínas quanto do DNA, já que estas células encontram-se em constante estado de replicação. Estudos revelaram que a maioria das células tumorais são caracterizadas pela inabilidade de proliferar quando a metionina é substituída por seu precursor homocisteína, entretanto, células normais conseguem se replicar neste meio. Esta diferença metabólica tem sido extensivamente estudada e cria interessantes perspectivas para estratégias nutricionais na terapia anticâncer (CELLARIER et al., 2003). Por exemplo, privação de metionina para as células tumorais, conseguida através do simples controle da dieta do paciente que receberia uma alimentação livre do aminoácido, tornou-se um caminho atrativo para a diminuição do crescimento dos tumores (CAVUOTO; FENECH, 2012). Assim, a maior dependência das células tumorais pela metionina indica que este aminoácido pode ser utilizado como um mediador para transferir drogas antineoplásicas ao alvo específico. Essa proposta foi confirmada com o estudo realizado por Yoshida e colaboradores, utilizando a já conhecida droga Mitomicina C (BRADNER, 2001), que demonstrou o maior direcionamento do conjugado metionina-mitomomicina no tratamento do câncer de esôfago. A constatação do carreamento da droga foi feita através da diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos em relação à utilização da mitomicina não conjugada.

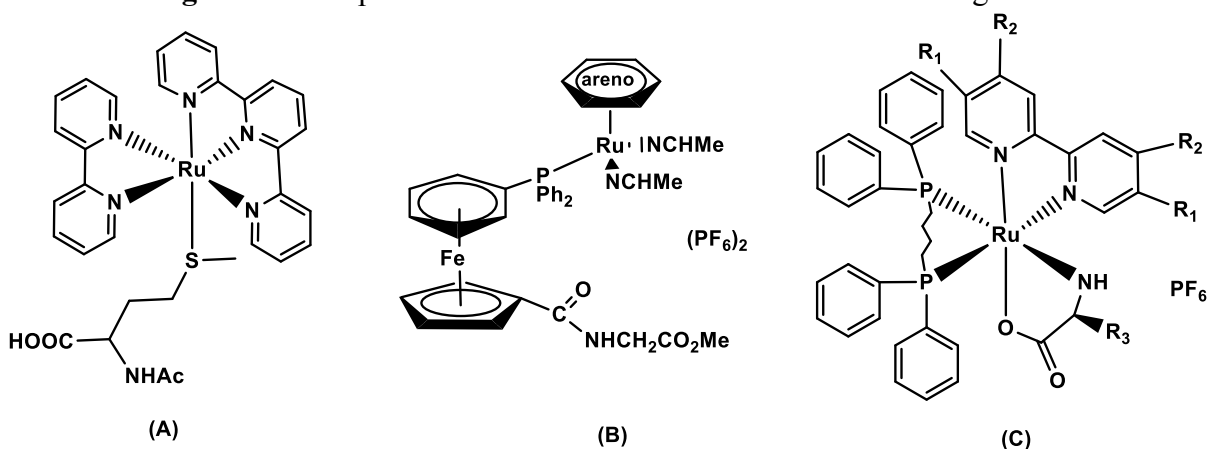
O efeito da coordenação de aminoácidos a complexo de coordenação também tem sido estudado, principalmente no desenvolvimento de drogas anticancerígenas (SANTOS et al., 2018). Sabe-se que os aminoácidos podem se coordenar ao metal das seguintes formas: monodentada, através de acoplamento a um grupo intermediário coordenado ou quelação via grupo carboxílico, amino ou outro átomo da cadeia lateral e que, dependendo do modo de coordenação irá exercer uma função diferente. No complexo polipiridínico de Ru(II), [Ru(terpy)(bpy)(N-acetil-L-metionina)]Cl₂, a coordenação é monodentada, com ligação ao centro metálico via átomo de Enxofre (Figura 4A) (GOLDBACH et al., 2011). Neste complexo, o ligante derivado de aminoácido teve a função de grupo protetor fotoclivável, pois a irradiação com luz visível gera a espécie monoaqua, que é biologicamente ativa, liberando o ligante N-

acetilmetionina que é uma molécula inofensiva. Esse comportamento conferiu maior especificidade ao complexo em relação ao seu análogo com o ligante cloreto, uma vez que a ligação Ru-Cl pode ser quebrada em meio aquoso em qualquer parte do corpo humano e esse mecanismo é a base tanto da atividade antitumoral quanto da toxicidade como um todo.

A coordenação de aminoácidos via intermediários pode ser usada para conferir reatividade adicional ou como grupo de direcionamento biológico. Em complexos com ligantes fosfino-ferroceno de Ru(II) (Figura 4B), foram testadas funcionalizações com diferentes carboxamidas, as quais mostraram atividade de moderada a boa, frente a linhagem de células A2780 (câncer de ovário) resistentes a cisplatina (TAUCHMAN et al., 2013). A modificação do grupo R da base dos aminoácidos afetaram a atividade dos compostos, demonstrando assim a relevância desses grupos para o mecanismo de ação desses complexos.

Embora a quelação de aminoácidos possa comprometer o reconhecimento biológico desses ligantes, compostos contendo os doadores N, O e S desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A série de complexo fosfínicos de Rutênio contendo aminoácidos bidentados mostraram resultados promissores (Figura 4C), em que a citotoxicidade frente a linhagens de células MDA-MB-231 (câncer de mama) foi comparável à cisplatina, no entanto, com melhor especificidade (SANTOS et al., 2018). Recentemente, foi reportado um estudo utilizando complexos polipiridínicos de Rutênio, com e sem metionina coordenada de modo bidentado, como inibidores contra doenças relacionadas a amiloidose. O complexo contendo o aminoácido mostrou-se mais eficaz por apresentar maior biocompatibilidade (GONG et al., 2019).

Figura 4 - Complexos metálicos contendo aminoácidos como ligantes.

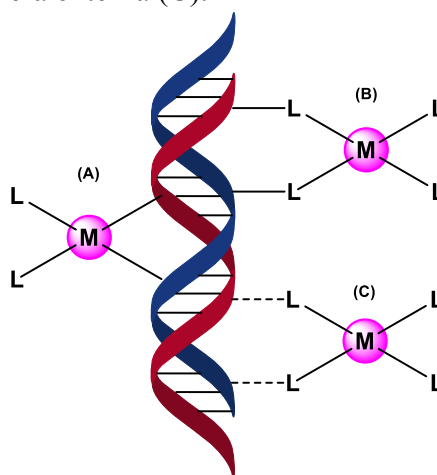


Fonte: a autora.

1.4 Interações de complexos metálicos com o DNA

A interação de complexos metálicos com o DNA é um dos mecanismos responsáveis pelas propriedades terapêuticas apresentadas por estes compostos, como a atividade anticancerígena. Algumas características como estado de oxidação variável, tipos de ligantes e reatividade fazem com que os complexos sejam interessantes para essa finalidade, bem como pelo fato de o metal apresentar carga positiva, sendo susceptível ao ataque nucleofílico, uma vez que ácidos nucleicos possuem pares de elétrons livres em suas estruturas permitindo a interação entre complexo e DNA (ZHANG; LIPPARD, 2003). A formação de adutos através de ataque nucleofílico pode ocorrer de três modos: covalente de esfera interna e covalente ou não de esfera externa. Quando ocorre coordenação direta entre metal e DNA, a interação é chamada covalente de esfera interna (Figura 5A). No entanto, se a ligação for entre o ligante do complexo e o DNA, ocorre interação covalente de esfera externa (Figura 5B) e se a ligação não depende de ataque nucleofílico, portanto não covalente de esfera externa (Figura 5C), a interação pode ocorrer através de ligações de hidrogênio (ANASTASSOPOULOU, 2003).

Figura 5 - Formação de adutos entre complexo metálico e DNA através de ataque nucleofílico, resultando nas interações covalente de esfera interna (A), covalente de esfera externa (B) e interação não covalente de esfera externa (C).



Fonte: a autora.

No caso da cisplatina, um agente antineoplásico já utilizado desde 1978, acredita-se que a atividade citotóxica esteja relacionada à interação com o DNA das células cancerígenas através da formação de adutos. Em solução aquosa, este complexo de fórmula *cis*-[Pt(NH₃)₂(Cl₂)₂], sofreria a substituição de dois ligantes cloretos por moléculas de água. Posteriormente, o complexo se liga às bases nitrogenadas do DNA, formando um aduto com a

guanina através de uma interação covalente de esfera interna, o que irá influenciar na inibição da replicação e transcrição, levando a apoptose celular (GOWDA et al., 2014; KLEIN; HAMBLEY, 2009).

Outros tipos de interação com o DNA podem ocorrer além do modo covalente, são os casos da intercalação, interação por sulcos e inserção. Complexos metálicos com ligantes aromáticos planares podem atuar como bons intercaladores, a interação ocorre pelo empilhamento “ π - π *stacking*” entre as bases nitrogenadas e o ligante, que quanto maior for o seu prolongamento, maior a afinidade entre o complexo e DNA (GOWDA et al., 2014). Adicionalmente, as interações podem ser reforçadas pelas ligações de hidrogênio de interações de Van Der Waals na desestabilização da dupla hélice. Semelhante a intercalação, é o processo de inserção. Neste caso, o complexo afasta o par de base para o exterior da dupla hélice e insere-se no espaço formado. Como consequência da desestabilização dos pares de bases, ocorrem erros de emparelhamento (ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007). O outro tipo de interação não covalente com o DNA se dá por meio dos sulcos (menor e maior). A ligação por sulcos ocorre com ligante menores e é baseada nas interações de natureza eletrostática, hidrofóbicas e de Van der Waals (NEIDLE, 2001).

1.4.1 Clivagem do DNA

A atividade de compostos que apresentam ação anticancerígena está relacionada a capacidade destes em induzir a clivagem do DNA, o que pode desencadear a apoptose celular, devido à quebra das ligações fosfodiéster, ligações das bases nitrogenadas ou pela desoxirribose. Compostos capazes de clivar o DNA são chamados de nucleases sintéticas que, em geral, realizam esse mecanismo via clivagem hidrolítica, oxidativa ou fotoquímica (GOWDA et al., 2014; SIGMAN, 1990). Quando a clivagem é hidrolítica, as ligações fosfodiéster podem ser quebradas pela presença de um complexo contendo água como ligante. O íon metálico irá atuar como ácido de Lewis, propiciando uma melhor interação com o grupo fosfato e o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo. O mecanismo oxidativo é baseado na formação de espécies radicalares, originadas da reação entre o complexo metálico e espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, que podem ser fotoinduzidas ou desencadeadas através da atividade redox do metal (PITIÉ; PRATVIEL, 2010). O rompimento da fita é provocado pela retirada de um hidrogênio da desoxirribose, produzindo um radical centrado no carbono que poderá sofrer rearranjo.

A atividade nuclease pode ser desencadeada por estímulo luminoso, ocasionando a fotoclivagem do DNA. O dano pode ocorrer por mecanismos que incluem a retirada do átomo de hidrogênio do açúcar por radicais e ataque à bases nitrogenadas (normalmente guanina) por espécies radicalares e oxigênio singlete gerados fotoquimicamente (PAILLOUS; VICENDO, 1993). Os processos que induzem esses danos podem ser de dois tipos principais: tipo I e tipo II, como já foi colocado anteriormente. Compostos que atuam como nucleases ativadas por luz são promissores agentes terapêuticos nos tratamentos em que se utiliza a TFD devido à seletividade.

1.5 Atividade antibacteriana de complexos polipiridínicos de Ru(II)

A resistência aos antibióticos desenvolvida por certos tipos de bactérias é atualmente uma das maiores ameaças globais à saúde. *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias que faz parte do microbioma humano, no entanto, é considerada uma das mais preocupantes, pois causa desde infecções simples a mais graves, como pneumonia, meningite e septicemia, entre outras. Além disso, algumas cepas de *S. aureus* mostraram-se resistentes até mesmo a “antibióticos de última geração” (VAN WAMEL, 2017). Outras bactérias como *Escherichia coli*, *Eubacterium lentum*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora* e *Mycobacterium tuberculosis* também são responsáveis por um grande número de doenças infecciosas graves e, portanto, consideradas de alto risco e também têm desenvolvido mecanismos de resistência.

Assim, um número crescente de infecções estão se tornando cada vez mais difíceis de tratar enquanto os antibióticos utilizados têm se tornado menos eficazes. Por isso, a comunidade científica tem intensificado esforços para o desenvolvimento de antibióticos com novos mecanismos de ação (BLAIR et al., 2014). Neste sentido, existem dois tipos de terapia utilizando ativação luminosa, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDAMT) ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) e a terapia de fotoliberação antimicrobiana (PRAMT).

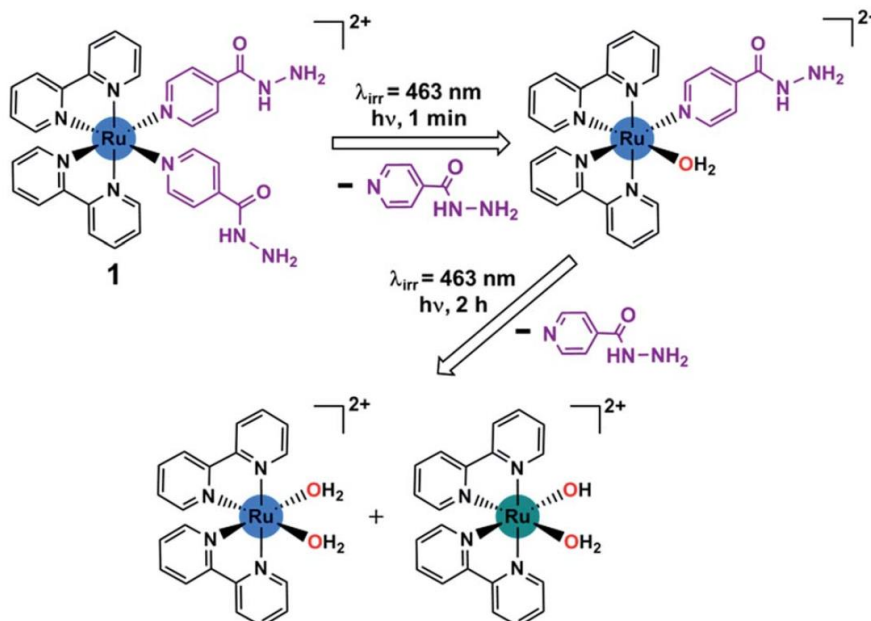
Na PDAMT, semelhante a terapia fotodinâmica utilizada em tumores, um fotossensibilizador é irradiado. Saindo do estado fundamental, o fotossensibilizador atinge o estado tripleto via cruzamento intersistema e em seguida, gera espécies reativas de oxigênio, que por serem altamente tóxicas, podem causar danos aos componentes celulares bacterianos (WAINWRIGHT, 1998). Na PRAMT, um agente terapêutico é liberado. Neste caso, o local de

liberação e o tempo são controlados, ou seja, um tratamento localizado, de modo a reduzir a toxicidade sistêmica para os demais tecidos (MIZUKAMI et al., 2010).

Por exemplo, a terapia antimicrobiana associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) representa uma nova estratégia de tratamento, como o caso do gel SurgihoneyRO™ utilizado como antimicrobiano por produzir altos níveis de EROS na forma de H₂O₂ (DRYDEN, 2018). Neste sentido, a quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) pode ser um método promissor no tratamento a doenças causadas por bactérias resistentes através da geração de oxigênio singlete e/ou EROS, com os efeitos colaterais minimizados em relação aos tratamentos convencionais.

Complexos polipiridínicos de Ru(II) são promissores para a aplicação em PACT e PRAMT pela possibilidade de se comportarem como sistema de entrega de pró-fármaco fotoativáveis. Embora o mecanismo de ação dos complexos não seja totalmente elucidado, encontra-se uma correlação entre a ligação com o DNA e atividade antimicrobiana para uma série de complexos de Ru(II) (RIORDAN; AKILOV; HASAN, 2005). Complexos contendo ligante aromático estendido, como [Ru(dppz)Ant]²⁺ e [Ru(dppz)Naf]²⁺, apresentaram atividade antimicrobiana quando expostos a luz, tendo suas atividades relacionadas a produção de EROS (ABREU et al., 2017). A atividade também relaciona-se a lipofilicidade (compostos mais lipofílicos apresentam maior capacidade de penetração na membrana da célula, ou seja, melhor captação) (LI et al., 2012). Outra estratégia, seria coordenar ao centro metálico, moléculas orgânicas ou inorgânicas que já possuem atividade antimicrobiana, na tentativa de superar a resistência pela sinergia entre o efeito do complexo metálico e o efeito do ligante. A Figura 6, ilustra o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(INH)₂]²⁺, descrito por (SMITH et al., 2016). O complexo polipiridídico de Rutênio é fotoativado liberando a izoniazida, que é um composto antituberculostático. No estudo, uma molécula de izoniazida foi liberada com 1 minuto de irradiação com luz em 463 nm (azul), seguida da segunda molécula com exposição a luz por 2 horas, formando o aqua complexo. O complexo foi seletivo e potencialmente ativo após irradiação frente a micobactéria *M. smegmatis*.

Figura 6 - Etapas da fotoativação do complexo cis -[Ru(bpy)₂(INH)₂]²⁺.



Fonte: retirada da referência (SMITH et al., 2016).

Diante das aplicações biológicas relevantes citadas anteriormente, fica claro o interesse por novas moléculas que possam atuar no tratamento de várias doenças. A ação farmacológica combinada entre íons metálicos e espécies como o monóxido de carbono e óxido nítrico, pode ser uma alternativa promissora. A modulação desses complexos deve-se basear em garantir boa solubilidade em meio aquoso, baixa ou nenhuma toxicidade do fragmento deixado após liberação do CO ou NO, estabilidade na ausência de luz, além da fotorreatividade na presença de luz na região do espectro visível (RIMMER; PIERRI; FORD, 2012). Outra característica desejável para aplicação de complexos é a seletividade, resultando na intensificação do efeito terapêutico e diminuição de efeitos colaterais sistêmicos.

2 OBJETIVOS

Neste estudo, objetiva-se a síntese de dois complexos polipiridínicos e um complexo bifosfínico de Rutênio (II) contendo os ligantes CO e NO, visto que estas duas biomoléculas apresentam potencial efeito antimicrobiano. Também propõe-se estudar a liberação fotoquímica dessas moléculas através da irradiação dos complexos com vários comprimentos de onda. Assim, temos como objetivos específicos:

- Sintetizar os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)], *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ e *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂, onde bpy = 2, 2'-bipiridina, SO₃ = sulfito, Met = metionina, dppb = 1,4 – bis(difenilfosfina)butano e Mebpy = 4,4'- dimetilbipiridina;
- Caracterizar os complexos através das técnicas como: Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), Espectroscopia vibracional na região do infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, Voltametria cíclica e Difração de Raios-X;
- Estudar as propriedades fotoquímicas através da irradiação das soluções dos complexos;
- Avaliar a interação dos complexos com DNA plasmidial antes e após irradiação;
- Avaliar a ação antimicrobiana dos complexos frente a bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Escherichia coli* (ATCC 11303).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Atmosfera inerte

Para os experimentos realizados em atmosfera inerte, foi usado gás argônio de procedência White Martins. O tratamento para remoção de possíveis traços de água e oxigênio é feito em sistema de colunas contendo sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador BTS-R-11.9 (Fluka Chemika).

3.2 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados para todos os procedimentos encontram-se listados na Tabela 1, juntamente com suas respectivas procedências. A água foi tratada de um equipamento de ultrapurificação de grau milliQ (Direct Q 3UV, com bomba MILLIPORE).

Tabela 1 - Reagentes/solventes e suas procedências.

Reagentes/Solventes	Procedência
Tricloreto de rutênio	Precious Metals Online
2,2'- Bipiridina	Sigma-Aldrich
Cloreto de lítio	Sigma-Aldrich
Sulfito de sódio	Synth
Hexafluorofosfato de amônio	Sigma-Aldrich
L-Metionina	Sigma-Aldrich
Trietilamina	Sigma-Aldrich
Nitrato de Prata	Sigma-Aldrich
Etanol	Tedia
Acetona	Synth
Metanol	Tedia
Dimetilformamida	Synth
Éter dietílico	Synth
Acetonitrila	Tedia
Ácido trifluoroacético	Tedia
PTBA	Tedia
Dimetilsulfóxido	Tedia
Mioglobina	Sigma-Aldrich
Hemina	Sigma-Aldrich

DPPB	Sigma-Aldrich
4,4'-Mebpy	Sigma-Aldrich

Fonte: a autora.

3.3 Equipamentos e técnicas experimentais

3.3.1 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos, nas regiões do ultravioleta e visível, foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett-Packart, modelo 8453 com arranjo de diodos. As amostras foram analisadas em solução utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. As medidas da absorbância foram obtidas pela leitura direta dos espectros, utilizando-se o branco como o espectro do solvente da amostra. Os valores de absorvidade molar foram calculados pela Lei de Lambert-Beer, através da medida de absorbância das soluções em diferentes concentrações e expressos em $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

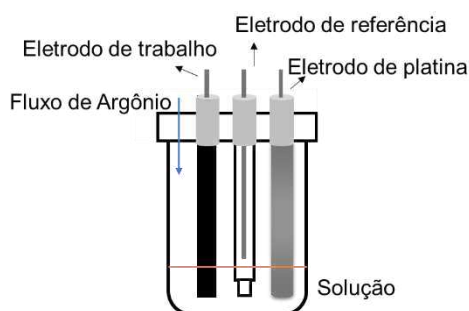
3.3.2 Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho

Os espectros dos compostos na região do infravermelho foram obtidos a partir da dispersão das amostras em pastilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR da ABB Bomem FTLA 2000-102 com uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.3.3 Medidas Eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas em um sistema eletroquímico potenciostato/galvanostato BAS, modelo Epsilon E2 818, à temperatura ambiente. Usou-se um sistema convencional de três eletrodos, conforme apresentado na Figura 7, um eletrodo de trabalho (carbono vítreo), um de referência (Ag/AgCl) e um contra eletrodo de platina.

Figura 7 - Representação esquemática da disposição dos eletrodos na célula eletroquímica.



Fonte: a autora.

Uma solução de trifluoroacetato de sódio (NaTFA 0,1 mol L⁻¹) foi utilizada como eletrólito suporte para medidas em meio aquoso. Para os experimentos em meio orgânico, utilizou-se como eletrólito suporte uma solução de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) 0.1 mol L⁻¹ em acetonitrila. Para calibração do sistema foi usado ferroceno, Fe(C₅H₅)₂, padrão indicado pela IUPAC (GAGNE, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, 1980). Como critérios de reversibilidade, foram consideradas a diferença entre os potenciais de pico anódico (E_a) e potenciais de pico catódico (E_c), $\Delta E = E_a - E_c$ e a razão entre as correntes de pico anódica (i_a) e corrente de pico catódica (i_c), $|i_a - i_c|$. Pode ainda ser avaliado a dependência de i_c com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (i_c vs v^{1/2}) (BARD; FAULKNER, 1980).

3.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A estrutura e pureza dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ e *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] foram analisadas pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro AVANCE DPX 300 Bruker, a 300 MHz e AVANCE DPX 500 Bruker, a 500 MHz. Os deslocamentos foram registrados em ppm, utilizando tetrametilsilano (TMS, δ = 0,00 ppm) como referência interna.

3.3.5 Cristalização dos complexos e difração de raios-X

Os cristais dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ e *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] foram obtidos pela método da difusão de vapor em etanol/éter dietílico e evaporação lenta do solvente, respectivamente. As medidas de difração de raios-x foram realizadas no Laboratório de Cristalografia Estrutural do Departamento de Física da UFC. O equipamento utilizado foi um difratômetro Bruker D8 VENTURE KAPPA, equipado com um detector de área PHOTON II CPAD, com radiação da linha K α do molibdênio (0,71073 Å) à temperatura de 25 °C. As estruturas foram resolvidas por faseamento intrínseco usando SHELTX e refinadas pelo método dos mínimos quadrados usando SHELXL no programa Olex2 (DOLOMANOV et al., 2009; SHELDRIK, 2015). Os programas MERCURY (versão 4.2) e ORTEP-3 foram usados para fornecer as representações e dados cristalográficos.

3.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema cromatográfico líquido (Shimatzu, Prominence, UFLC, Japão) com detector UV-Vis com arranjo de diodo (Shimatzu, Prominence SPD-M 20A, Japão). Para todos os experimentos, utilizou-se a coluna cromatográfica C-18 Waters (10 μm, 4,6 mm x 150 mm) contendo uma pré-coluna de fase

reversa C-18 Sunfire (5,0 μm , 4,6 mm x 20 mm) sob fluxo de 1 mL min^{-1} . O regime de eluição foi o isocrático, contendo as proporções de 85:15 (metanol/água pH = 3,5) para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] e 55:45 (methanol/água pH = 3,5) para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂, acompanhando os comprimento de onda em 250 nm para ambos.

3.4 Síntese dos complexos

3.4.1 Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]

A síntese do complexo seguiu o procedimento citado por (MEYER; SULLIVAN; SALMON, 1978). Brevemente,

3,12 g (11,9 mmol) de RuCl₃.xH₂O, 3,75 g (24 mmol) do ligante 2,2'-bipiridina e 3,36 g (79 mmol) de LiCl foram dissolvidos em 20 mL de dimetilformamida (DMF). A mistura foi deixada sob refluxo e agitação por 8 horas. Após esse período, deixou-se a mistura reacional esfriar até a temperatura ambiente, sendo adicionado 100 mL de acetona gelada para a precipitação do complexo. O sólido foi filtrado e lavado com água e éter etílico gelados, em seguida foi estocado sob vácuo. Rendimento: 70%.

3.4.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (complexo I)

0,200 g (0,41 mmol) de *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] e 0,062 g (0,41 mmol) do reagente sulfito de sódio foram dissolvidos em 20 mL de uma solução (1:1 etanol/água), deixando em refluxo por 2 horas. Em seguida, a solução foi transferida para um Schlenk e submetida a borbulhamento do gás monóxido de carbono (CO), sob agitação e aquecimento a 120°C durante 6 horas. Após este tempo adicionou-se acetona gelada a solução para precipitação do complexo. Posteriormente, o sólido foi filtrado e estocado sob vácuo. Rendimento: 90%.

3.4.3 Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (complexo II)

0,100 g (0,19 mmol) de *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] e 0,065 g (0,38 mmol) de nitrato de prata foram dissolvidos em 20 mL de etanol, deixando em refluxo por 15 minutos. O Cloreto de prata depositado foi separado da solução por filtração. Em seguida, 10 mL de uma solução aquosa contendo 0,030 g (0,20 mmol) do ligante metionina e 0,03 mL (0,21 mmol) de trietilamina foram adicionados ao filtrado, deixando em refluxo por 3 horas. Após este tempo, evaporou-se o volume da solução até reduzi-lo a metade e coletou-se o precipitado pela adição de uma solução aquosa saturada com NH₄PF₆. Posteriormente, o sólido foi filtrado e estocado sob vácuo. Rendimento: 84%.

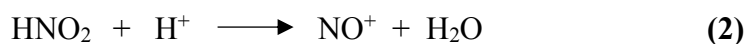
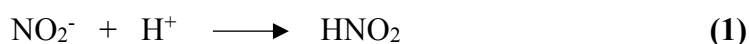
3.4.4 Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)]

A síntese do complexo seguiu o procedimento descrito por (QUEIROZ et al., 1998). Brevemente,

0,100 g (0,12 mmol) do complexo precursor [RuCl₂(dppb)(PPh₃)] foram dissolvidos em 5,0 mL de tolueno previamente desaerado. A esta solução foi adicionado 0,022 g (0,12 mmol) de 4,4'-Mebpy, deixando a mistura reagir por 2 horas sob refluxo. Após esse período, o sólido da suspensão, antes verde, torna-se laranja. Para a precipitação foram adicionados 10,0 mL de hexano, seguido da filtração e lavagem ainda com hexano para remover algum excesso de PPh₃. O sólido filtrado foi estocado sob vácuo. Rendimento: 89%.

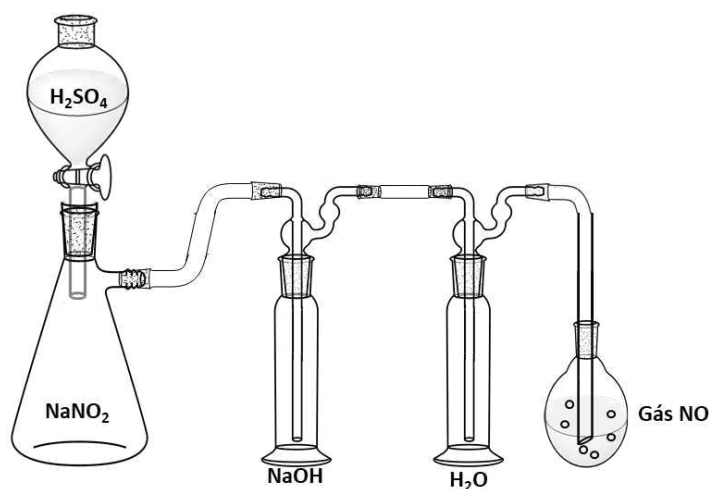
3.4.5 Síntese do complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂ (complexo III)

0,050 g (0,064 mmol) de complexo *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)] foram dissolvidos em 5,0 mL de uma solução (1:1 metanol/água). Em seguida, a mistura foi submetida ao borbulhamento contínuo de NO_(g), formado pela reação entre ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) e nitrito de sódio (NaNO₂) durante 1h, segundo as reações (HOLANDA, 2006):



O fluxo de NO_(g) formado é conduzido por dois frascos contendo uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4,0 mol L⁻¹ e água destilada, respectivamente, conforme mostrado na Figura 8. A primeira lavagem é feita para a neutralização de possíveis traços ácidos e a segunda para eliminar possíveis resíduos ácidos ou básicos restantes. Após o período de borbulhamento, o volume do solvente foi reduzido por evaporação e o complexo foi precipitado por adição de NH₄PF₆. Posteriormente, o sólido foi filtrado e estocado sob vácuo. Rendimento: 95%.

Figura 8 - Sistema montado para a produção de óxido nítrico gasoso.



Fonte: a autora.

Após o período de borbulhamento, o volume do solvente foi reduzido por evaporação e o complexo foi precipitado por adição de NH_4PF_6 . Posteriormente, o sólido foi filtrado e estocado sob vácuo. Rendimento: 95%.

3.5 Análise Elementar

As determinações dos teores de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre foram obtidas no equipamento: Analisador Elementar – Perkin Elmer 2400 séries ii, no modo CHN ou CHNS, situado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

3.6 Estudo Fotoquímico

Irradiações monocromáticas das soluções contendo os complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$, *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$ e *ct*- $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{Mebpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$ foram realizadas utilizando um reator fotoquímico UNT 001 para os comprimentos de onda de 300 e 350 nm. Para os demais comprimentos de onda: 395, 453 e 505 nm, foram utilizados LED's (Basetech Conrand, 1.7 W). As irradiações foram feitas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm de comprimento tampada com septo de borracha a 25°C. O controle para as reações no escuro foi realizado sob as mesmas condições, mostrando que as amostras são estáveis no escuro na mesma escala de tempo das reações fotoquímicas.

3.6.1 Actinometria Química

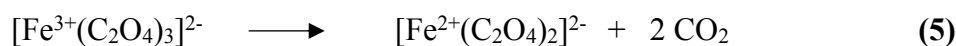
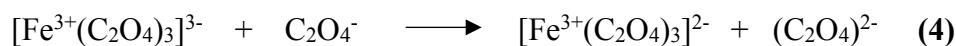
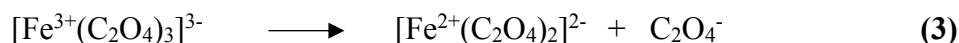
Nos estudos de fotólise, as intensidades de luz incidente foram medidas através da actinometria. O actinômetro utilizado foi o complexo ferrioxalato de potássio

$K_3[Fe(C_2O_4)_3].3H_2O$, devido à sua sensibilidade a luz, fácil manuseio e reprodutibilidade. A preparação de $K_3[Fe(C_2O_4)_3].3H_2O$ é descrita por (HATCHARD, C. G; PARKER, 1956). Brevemente,

Misturou-se três volumes de uma solução $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto férrico ($FeCl_3$) e um volume de uma solução $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de oxalato de potássio ($K_2C_2O_4$) sob agitação vigorosa e na ausência de luz. O precipitado de $K_3[Fe(C_2O_4)_3].3H_2O$ formado foi separado por filtração, em seguida, foram feitas três recristalizações com água morna e banho em gelo. Após esse tratamento, o sólido armazenado em dessecador na ausência de luz. Para o procedimento foram preparadas as seguintes soluções:

- 1- Solução de acetato de sódio ($NaCH_3COO$): obtida pela mistura de 600 mL de $NaCH_3COO$ $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e 360 mL de uma solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, diluída a um volume final de 1,0 L;
- 2- Fenantrolina 0,12%: preparada pela dissolução de 12 g de 1,10- fenantrolina em 100,0 mL em água destilada;
- 3- Solução de ferrioxalato de potássio $0,006 \text{ mol L}^{-1}$: obtida pela dissolução de 2,95 g de $K_3[Fe(C_2O_4)_3].3H_2O$ em 100,0 mL de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, diluída a um volume total de 1,0 L (usada para irradiações em $\lambda = 254 - 405 \text{ nm}$);
- 4- Solução de ferrioxalato de potássio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$: obtida pela dissolução de 7,37 g de $K_3[Fe(C_2O_4)_3].3H_2O$ em 10,0 mL de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, diluída a um volume total de 100,0 mL (usada para irradiações em $\lambda = 436 - 579 \text{ nm}$).

Quando uma solução de ferrioxalato de potássio é exposta a luz, numa faixa de 254-500 nm, os íons Fe^{3+} são reduzidos a Fe^{2+} , segundo as reações:



O procedimento da actinometria pode ser acompanhado medindo-se a concentração de Fe^{2+} através da espectrofotometria. Devido a falta de absorção do complexo $[Fe^{2+}(C_2O_4)_2]^{2-}$, utiliza-se um complexo formado com a 1,10-fenantrolina, $[Fe^{2+}(C_2O_4)_2]^{2-}$ de cor vermelha que apresenta absorvância em 510 nm, enquanto o complexo com íons férricos formado nas etapas intermediárias, é transparente em 510 nm. Para esta etapa:

Pipetaram-se 3,0 mL da solução do actinômetro $0,006 \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda = 254 - 405 \text{ nm}$) ou $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda = 436 - 579 \text{ nm}$) em uma cela de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, em seguida, a solução foi fotolisada por 3 minutos. Transferiu-se 2,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10,0 mL, onde também foram adicionados 3,0 mL da solução de acetato de sódio e 1,0 mL da solução 0,12% de 1,10-fenantrolina, completou-se o volume do balão com água destilada. A solução resultante permaneceu em repouso por 1h, na ausência de luz, para a total complexação dos íons Fe^{2+} pela fenantrolina. Um branco foi preparado sob as mesmas condições, exceto que a solução do actinômetro não foi irradiada, no início do procedimento. Ao se completar o período de 1h do preparo das soluções (fotolisada e branco), fez-se a leitura da absorbância em 510 nm, onde o complexo de Fe(II)-fenantrolina absorve.

O número de íons Fe^{2+} ($\eta_b \text{ Fe}^{2+}$), formado durante a fotólise pode ser calculado pela equação 6:

$$\eta_b \text{ Fe}^{2+} = \frac{6,023 \times 10^{20} V_1 V_3 \log(I_0/I)}{V_2 I \varepsilon} \quad (6)$$

Em que:

V_1 = volume da solução do actinômetro irradiada (mL)

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

V_3 = volume ao qual a alíquota V_2 é diluída (mL)

$\log(I_0/I)$ = diferença da absorbância em 510 nm da solução irradiada e da absorbância em 510 nm do branco

I = caminho óptico da cela espectrofotométrica (cm)

ε = absorvidade molar do complexo Fe(II)-fenantrolina, determinado experimentalmente ($1,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (CROSBY; DEMAS, 1971)

A intensidade da luz incidente foi calculada pela equação 7:

$$I_0 = \frac{\eta_b \text{ Fe}^{2+}}{\Phi_b t (1 - 10^{-\varepsilon c l})} \quad (7)$$

Em que:

Φ_b = rendimento quântico do actinômetro irradiado (valor tabelado) (CROSBY; DEMAS, 1971)

t = tempo de irradiação (segundos)

$1-10^{-\text{ecl}}$ = fração da luz incidente absorvida pela amostra (valor tabelado) (CROSBY; DEMAS, 1971)

O rendimento quântico da reação fotoquímica representa a eficiência com que esta acontece. Soluções dos complexos: *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)], *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ e *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)₂(NO)](PF₆)₂ foram irradiadas liberando monóxido de carbono, metionina e óxido nítrico, respectivamente, os quais tiveram seus rendimentos quânticos calculados para cada intervalo de tempo usando a equação 8:

$$\Phi = \frac{\Delta A \cdot V \cdot N}{I_0 \cdot l \cdot \Delta \varepsilon \cdot t \cdot f} \quad (8)$$

Em que:

ΔA = variação da absorvância do complexo no comprimento de onda medido

V = volume da cela fotolisada (litros)

N = número de Avogadro

I_0 = intensidade da luz incidente no comprimento de onda de irradiação (Einstein s⁻¹)

l = caminho óptico da cela fotolisada (cm)

$\Delta \varepsilon$ = diferença no coeficiente de extinção molar entre o complexo inicial e o produto da fotólise no comprimento de onda medido (L cm⁻¹ mol⁻¹)

t = tempo de fotólise (segundos)

f = fração de luz absorvida no comprimento de irradiação pelo complexo entre $t = 0$ e $t = n$, é calculada em função da média das absorvâncias:

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

Φ = rendimento quântico da reação fotoquímica (mol Einstein⁻¹)

3.7 Análises de liberação CO

3.7.1 Método espectrofotométrico

A liberação de CO para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] foi avaliada por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, através da conversão de deoximioglobina (Mb) em carboximioglobina (MbCO) (LLANGURI et al., 2001). O método propõe a comparação dos espectros da mioglobina reduzida e da carboximioglobina. A redução de

hemoglobinas é obtida adição de um excesso de duas vezes de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). A MbCO é formada pela liberação do CO proveniente da irradiação da solução do complexo carbonílico.

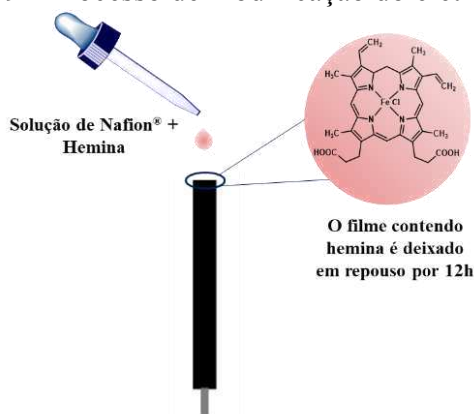
Todas as soluções utilizadas no ensaio foram preparadas em meio anaeróbico (Coy Laboratory), sendo desaeradas no interior da câmara por um período de 12 horas, antes do experimento, para garantir a remoção de oxigênio. A solução estoque de mioglobina foi preparada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e reduzidas com um excesso de 2 vezes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. O complexo foi solubilizado imediatamente antes de iniciar o ensaio. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico igual a 1,0 cm, contendo um volume máximo de 500 μL . Após o preenchimento da cubeta com a solução de mioglobina reduzida e complexo, nas concentrações de 12 e 24 μM , respectivamente, esta foi lacrada e retirada da câmara. Registrou-se um espectro inicial e então seguiu-se o acompanhamento espectrofotométrico após as sucessivas irradiações.

3.7.2 Método eletroquímico por modificação de eletrodo com hemina

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em sistema convencional de três eletrodos: um eletrodo de trabalho (carbono vítreo), um de referência (Ag/AgCl) e um contra eletrodo de platina. A modificação, ilustrada na Figura 9, foi realizada no eletrodo de carbono vítreo, conforme descrito:

Para a modificação do eletrodo, preparou-se uma suspensão de hemina com concentração de 0,3 mM dissolvida em Nafion[®]/etanol 1:4 (v/v). Após permanecer em banho ultrassônico por 1 h, duas gotas da suspensão foram depositadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo limpo e deixado em repouso por 12 h a temperatura ambiente (OBIRAI et al., 2006).

Figura 9 - Processo de modificação do eletrodo.



A varredura por voltametria cíclica foi realizada utilizando tampão fosfato pH = 7,4 como eletrólito. Inicialmente, registrou-se o voltamograma somente da solução eletrolítica para comprovar a modificação do eletrodo e posteriormente foi realizada a adição da solução do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] irradiada a 453 nm. Através desse método, constatou-se qualitativamente a liberação de CO, monitorada pela alteração no perfil voltamétrico do eletrodo modificado devido a interação do CO com a hemina.

3.8 Ensaio de isolamento do complexo-DNA por coluna de exclusão

Neste experimento, a filtração em gel (exclusão em gel) utiliza um material com tamanho de poro controlado, em que moléculas pequenas ficam retidas na fase estacionária, enquanto as maiores são excluídas. Neste ensaio, foram investigados a modificação de 1,0 mM de DNA extraído do esperma de salmão com os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ e *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)₂(NO)](PF₆)₂ a uma concentração de 500 μM, sob as condições:

- 1- Solução do complexo a 500 μM + luz por 1 h (irradiação a 453 nm)
- 2- Solução do complexo a 500 μM + DNA + luz por 1 h (irradiação a 453 nm)

Após a irradiação, as amostras foram incubadas por 24 h a 23°C. Após esse período, 50 μL de cada amostra foi aplicada na coluna de exclusão do tipo Biospin P30 (Biorad). Havendo interação do complexo com o DNA, ao passar pela coluna, o complexo é arrastado pela macromolécula. Essa evidência pode ser comprovada pela presença de bandas características do complexo no espectro eletrônico. Então, após a eluição, as amostras foram coletadas, diluídas em água e tiveram seus espectros registrados.

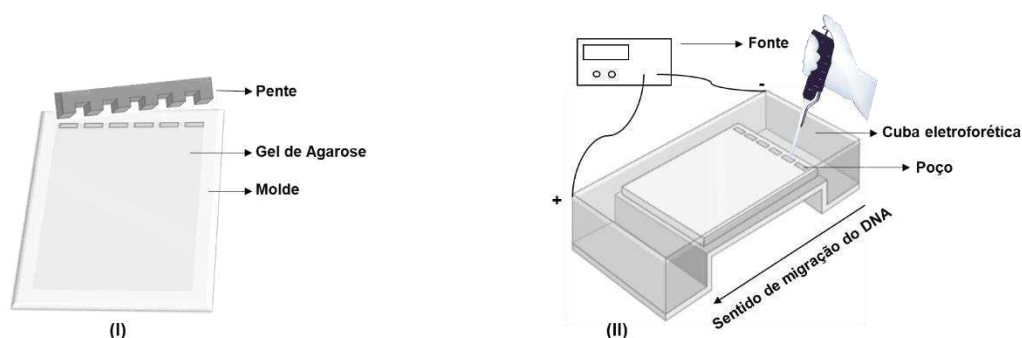
3.9 Eletroforese em Gel de Agarose

O estudo de fotoclivagem foi realizado para os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ e *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)₂(NO)](PF₆)₂ através da técnica de eletroforese em gel de agarose. O DNA utilizado foi o plasmidial pBR322 (4.361 pares de base), o mesmo foi obtido comercialmente e posteriormente amplificado em bactéria *E. Coli* e isolado utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep da QIAGEN seguindo protocolo do fabricante.

A eletroforese em gel de agarose é um método padrão usado para separar e identificar ácidos nucléicos e seus fragmentos, principalmente por ser uma técnica relativamente simples e rápida. A preparação dos géis foi feita pela dissolução, a quente, de 0,4 g de agarose em 50 mL de tampão TAE 1x pH = 8,0, obtendo-se uma concentração final de

0,8%. Após o resfriamento da mistura a aproximadamente 50°C, foi adicionado o GelRed™ (1,0 µg mL⁻¹), um corante seletivo para efetuar marcação das bandas no gel. A mistura resultante, ainda a quente, foi despejada na cuba eletroforética (modelo Sub-Cell® GT, BioRad) e inserido o pente para a geração dos poços (Figura 10). Após 30 minutos, com o gel já solidificado, este foi imerso na cuba pela adição de tampão TAE 1x pH = 8,0 (mesmo tampão utilizado para a preparação do gel) (MARTINS, 2014).

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose. Solidificação do gel, deixando-se formar os poços onde as amostras de DNA serão inseridas (I) e submetidas a um campo elétrico (II).

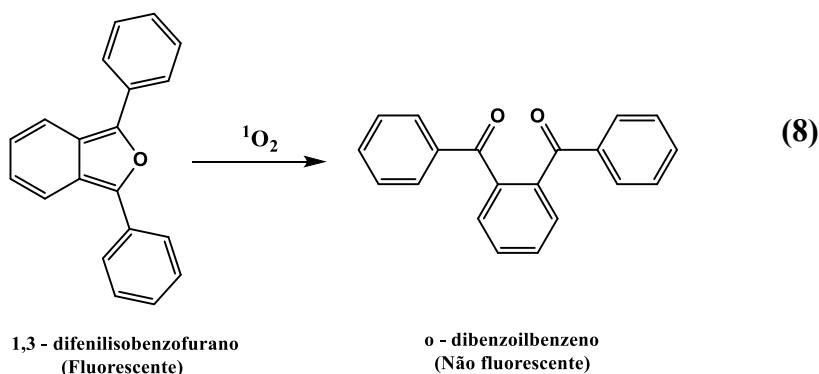


Fonte: Adaptada da referência (MARTINS, 2014).

As alíquotas de cada amostra foram adicionadas em cada poço, em seguida foi aplicada uma tensão de 70 V e corrente variável de 53-64 mA por aproximadamente 1 h (Figura 10 II). Ao final do experimento, o padrão de bandas foi verificado e analisado usando o fotodocumentador Gel Doc™ + System (BioRad). Os experimentos foram realizados para verificar a clivagem de DNA na ausência e presença de luz (irradiação a 453 nm) durante 1h sob diferentes concentrações.

3.10 Rendimento quântico de geração de oxigênio singleto (¹O₂)

A detecção e cálculo dos rendimentos quânticos de geração de ¹O₂ foram determinados via fluorescência, utilizando o Fluorímetro Estacionário QM-40 (PTI). Neste método, o 1,3- difenilisobenzofurano (DPBF) reage seletivamente com a moléculas de ¹O₂, sendo convertido a *o*-dibenzoilbenzeno (Equação 8). O primeiro, apresenta luminescência em 475 nm e o produto da reação de oxidação não é fluorescente. Assim, a detecção de pode ser monitorada pela supressão da emissão do DPBF (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005).



Para a realização do experimento, preparou-se 2,0 mL de solução contendo complexo (20 μM) e DPBF (20 μM) em metanol adicionados em uma cubeta de quartzo. A irradiação foi feita em 453 nm e o consumo do DPBF foi monitorado pela diminuição da intensidade da banda de emissão com máximo em 475 nm em diferentes tempos de irradiação. O composto de referência utilizado para o cálculo de rendimento quântico foi o $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ que apresenta $\Phi_{\Delta} = 0,87$ em solução de metanol (TANIELIAN; WOLFF; ESCH, 1996). A valor do rendimento quântico de geração de ${}^1\text{O}_2$ para os complexos foi determinado pela equação (D):

$$k_a / k_p = {}^a\Phi_{\Delta} / \pi\Phi_{\Delta} \quad (\text{D})$$

Em que:

k_a e k_p = coeficientes angulares das curvas cinéticas $\ln(I_t / I_0)$ vs tempo de irradiação da amostra e DPBF, respectivamente

${}^a\Phi_{\Delta} / \pi\Phi_{\Delta}$ = valores de rendimento quântico da amostra e padrão, respectivamente.

3.11 Estudos computacionais

Os cálculos teóricos foram realizados no Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD), situado no Universidade Federal do Ceará. Utilizou-se os *softwares* GaussView 5 (“GaussView, Version 5”, 2009) e Gaussian 9 (“Gaussian 9”, 2009) para desenho de estruturas e execução de cálculos, respectivamente. As otimizações das geometrias moleculares dos complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})(\text{PF}_6)_2]$ foram efetuadas utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (JENSEN, 2007), através do método B3LYP (JENSEN, 2007). Usou-se o conjunto de bases LANL2DZ (HAY et al., 1985; WADT et al., 1985) para descrição do átomo de Rutênio e 6-31G(d) (FRENKING; KOCH; LI, 1986) para os demais átomos.

Nas simulações envolvendo a presença de solvente, utilizou-se o modelo de solvatação contínua polarizada (PCM) (JENSEN, 2007), sendo água como solvente. Os espectros eletrônicos teóricos foram obtidos utilizando a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) (JENSEN, 2007) e as contribuições percentuais dos orbitais envolvidos nas transições eletrônicas obtidas pelo software GaussSum 3.0 (BOYLE; TENDERHOLT; LANGNER, 2007).

3.12 Atividade antimicrobiana

As bactérias utilizadas nesse estudo foram: bactéria gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Escherichia coli* ATCC 11303). As bactérias foram inoculadas em Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas em condições aeróbicas a 37°C por 24h. As colônias individuais foram subcultivadas em Tryptic Soy Broth (TSB) a 37°C por 24h sob agitação constante. Após o período de incubação, a concentração celular final foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (cfu) mL⁻¹.

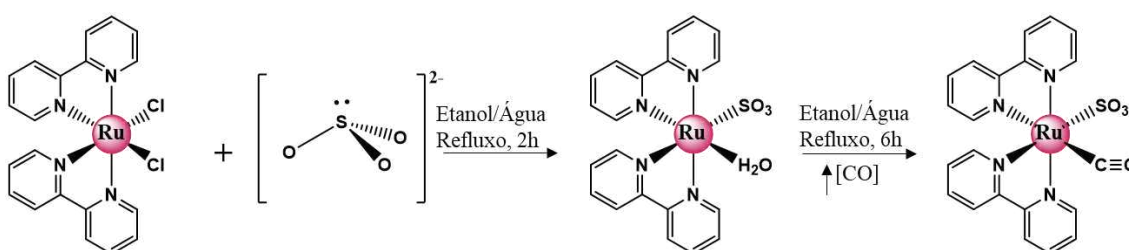
A atividade antimicrobiana dos complexos foi avaliada pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). O método da microdiluição foi usado para determinar os valores de MIC, de acordo com o documento M07-A9 do Instituto de Padrões de Laboratório Clínico com algumas modificações. Os complexos foram diluídos em TSB contendo 4% de DMSO em concentrações variando de 3,9 a 500 µg/mL, distribuídas em placas de 96 poços com suspensão bacteriana previamente ajustada para $(1,0 \times 10^6$ cfu/mL). Essas placas foram submetidas a irradiação com LED azul ($\lambda = 453$ nm) por 1h, mantidas no escuro e incubadas durante a noite a 37°C sob agitação constante. Os valores de MIC foram determinados como a menor concentração de complexo mostrando uma completa inibição do crescimento bacteriano observável. A determinação de MBC foi avaliada pela remoção de 10 µL de cada poço onde nenhum crescimento bacteriano foi observado, essa alíquota foi incubada em placas de TSA a 37°C.

4 PARTE I - RESULTADOS E DISCUSSÃO PARA O COMPLEXO *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (I)

4.1 Síntese do complexo (I)

A rota sintética do novo complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] ocorreu em duas etapas, por meio de reações de substituição dos ligantes cloretos do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] pelos ligantes sulfito (SO₃²⁻) e monóxido de carbono (CO), como mostrado no Esquema 1:

Esquema 1 – Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].



Na primeira etapa, complexo precursor e ligante, na proporção de 1:1 foram solubilizados na solução de etanol/água (1:1). Após 2 h de refluxo, a modificação na coloração da solução evidenciou a formação do complexo intermediário *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(H₂O)]. A etapa seguinte foi prosseguida sem isolar o aquo-complexo. A molécula de CO coordenou-se ao centro metálico devido ao fluxo constante desse gás na solução, pois o ligante aqua (H₂O) é relativamente lábil e sofre troca rápida por ligantes de campo forte como é o caso do monóxido de carbono (TOMA, 2016). Ao final da síntese, a acetona foi adicionada, levando à precipitação do complexo de interesse devido a sua insolubilidade neste solvente.

4.2 Caracterização do complexo (I)

4.2.1 Difração de Raios X de monocristais

A difração de raios X é uma das técnicas de determinação estrutural mais detalhada e eficiente para fornecer a estrutura tridimensional com precisão. Alguns métodos podem ser utilizados para a obtenção de monocristais de tamanho adequado para a coleta de dados, entre eles destacam-se: saturação líquido-vapor, difusão lenta de um líquido de menor polaridade em outro de maior polaridade e evaporação lenta. Todos baseados na lenta formação de uma solução saturada do sólido em estudo (CUNHA, 2008). Na obtenção dos cristais do complexo I, utilizou-se o método mais simples, o da evaporação lenta do solvente da solução. Para isso, pipetou-se uma pequena quantidade da solução final da síntese (em etanol e água), antes da

adição da acetona, e transferiu-a para um frasco de vidro pequeno mostrado na Figura 11. O frasco foi fechado hermeticamente com uma tampa de borracha, onde foi introduzida uma agulha no centro. O método baseia-se na evaporação lenta do solvente e na consequente saturação lenta da solução, formando os cristais. Deste modo, o frasco foi deixado em repouso, ao abrigo da luz por um longo período a temperatura ambiente.

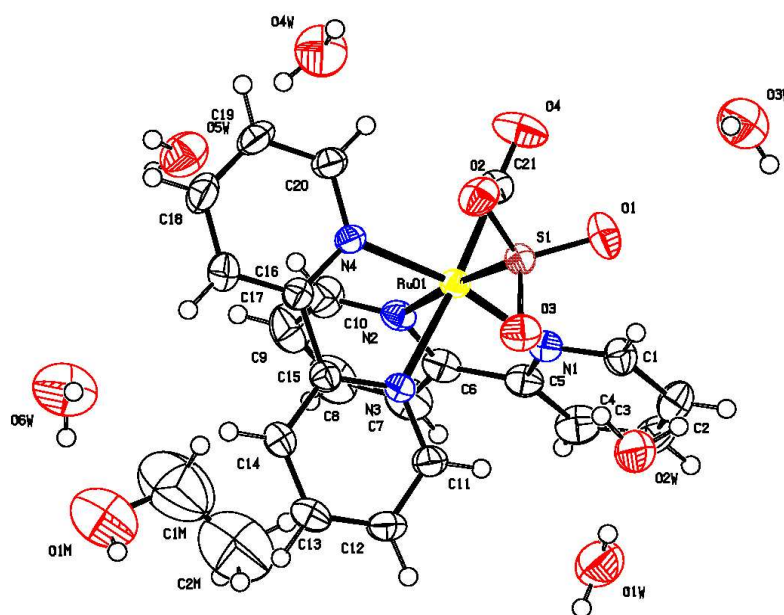
Figura 11 - Representação do método de crescimento de cristais para o complexo I.



Fonte: Adaptada da referência (CUNHA, 2008).

Os cristais obtidos do complexo I pertencem ao sistema cristalino triclinico, com grupo espacial P-1 e apresentam coordenação octaédrica em torno do centro metálico. A Figura 12 mostra a estrutura ORTEP. Os parâmetros cristalográficos de refinamento e os principais valores de distâncias [Å] e ângulos [°] encontram-se listados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Tais dados referentes a estrutura do complexo indicam que este foi obtido exitosamente pela rota sintética proposta.

Figura 12 - Estrutura ORTEP do complexo de forma geral *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].6(H₂O).(CH₃CH₂OH). Elipsóides com 50% de probabilidade.



Fonte: a autora.

Tabela 2 - Dados cristalográficos de refinamento da estrutura do complexo de forma geral *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].6(H₂O).(CH₃CH₂OH).

Fórmula empírica	C ₂₃ H ₃₄ N ₄ O ₁₁ RuS
Massa molecular	675.67
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Temperatura/K	273.15
Tamanho do cristal/mm³	0.243 × 0.144 × 0.098
a/Å	10.9260(7)
b/Å	11.9286(8)
c/Å	12.9655(8)
α/°	65.947(2)
β/°	79.013(4)
γ/°	69.646(2)
Volume/ Å³	1444.35(16)
Z	2
Coefficiente de absorção/ mm⁻¹	0.678
F(000)	696.0
Reflexões coletadas	32873
Reflexões independentes	10841 [R _{int} = 0.0800, R _{sigma} = 0.0932]
Qualidade de ajuste em F²	1.046
Índices R final [I>=2σ (I)]	R ₁ = 0.0554, wR ₂ = 0.1182
Índices R (todos os dados)	R ₁ = 0.0969, wR ₂ = 0.1385
CCDC	1876488

Fonte: a autora.

Tabela 3 - Comprimentos de ligação [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para o complexo de fórmula geral *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].6(H₂O).(CH₃CH₂OH).

Comprimento de ligação [Å]		Ângulo de ligação [°]	
Ru-N(4)	2.073(2)	O(4)-C(21)-Ru(1)	179.5(3)
Ru-N(1)	2.100(3)	O(1)-S(1)-Ru(1)	111.03(10)
Ru-N(2)	2.147(3)	O(2)-S(1)-Ru(1)	110.56(11)
Ru-N(3)	2.126(2)	O(3)-S(1)-Ru(1)	109.82(10)
Ru-S(1)	2.3254(8)	C(21)-Ru(1)-S(1)	87.85(9)
Ru-C(21)	1.880(3)	C(21)-Ru(1)-N(2)	84.23(10)
S(1)-O(1)	1.483(2)	C(21)-Ru(1)-N(3)	175.32(12)
S(1)-O(2)	1.477(2)	C(21)-Ru(1)-N(1)	91.12(12)
S(1)-O(3)	1.499(2)	C(21)-Ru(1)-N(4)	97.17(12)

C(21)-O(4)	1.109(4)	O(1)-S(1)-O(2)	109.32(15)
N(2)-C(6)	1.351(4)	O(3)-S(1)-O(1)	107.74(16)
N(2)-C(10)	1.323(4)	O(3)-S(1)-O(2)	108.30(15)
N(3)-C(15)	1.358(4)	N(2)-Ru(1)-S(1)	175.34(7)
N(3)-C(11)	1.344(4)	N(3)-Ru(1)-S(1)	92.82(7)
N(1)-C(1)	1.339(4)	N(1)-Ru(1)-S(1)	98.94(7)
N(1)-C(5)	1.356(4)	N(4)-Ru(1)-S(1)	89.74(7)
N(4)-C(16)	1.359(4)		

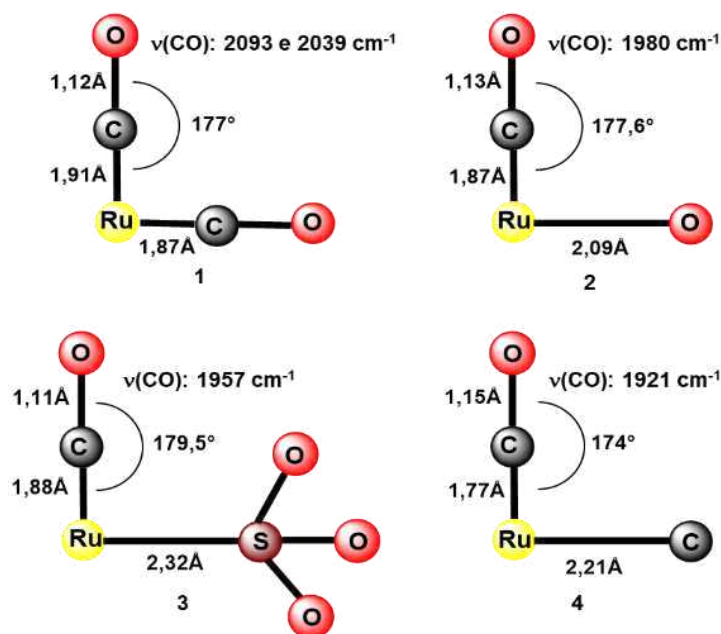
Fonte: a autora.

A simetria do ligante SO_3^{2-} é C_{3v} . Resultados semelhantes são encontrados para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]PF₆, onde o sulfito também é coordenado ao metal através do átomo de enxofre (SILVA et al., 2010). O isomerismo *cis* entre os ligantes CO e SO_3^{2-} é confirmado como proposto pela rota sintética com este último *trans* ao átomo de nitrogênio da bipyridina, enquanto o outro átomo de nitrogênio encontra-se *trans* ao CO. As distâncias interatômicas para Ru-N(bpy) não mudaram significativamente, variando numa escala de 2,073(2) Å a 2,147 Å, estando de acordo com complexos semelhantes (OYAMA et al., 2012).

O monóxido de carbono coordenado é praticamente linear, apresentando ângulo de ligação Ru-C-O igual a 179,5° e comprimento C-O de 1,109 Å. Os resultados acerca dos comprimentos e ângulos de ligação, bem como do ν_{CO} para complexos carbonílicos análogos do tipo *cis*-[Ru(bpy)₂L(CO)]ⁿ⁺, onde (L= CO, ONO₂⁻ e CH₃) foram compilados na Figura 13, sendo possível fazer algumas comparações (OOYAMA et al., 2001; OYAMA et al., 2012; TANAKA et al., 1993). Por exemplo, o comprimento da ligação C-O para o complexo deste trabalho foi o menor da série, enquanto o ângulo Ru-C-O foi o maior, o que pode indicar um efeito estérico menor e conseqüente linearidade maior para a molécula de CO. A banda referente ao estiramento $\text{C}\equiv\text{O}$ segue a ordem crescente para os ligantes L= CH₃ < SO_3^{2-} < ONO₂⁻ < CO. Tal fato pode ser justificado pelo efeito sinérgico da retrodoação. Primeiramente, o orbital ocupado de maior energia (HOMO) exerce a função de σ -doador, doando densidade eletrônica ao centro metálico. O CO possui orbitais π^* vazios que recebem densidade eletrônica do metal, caracterizando assim a retrodoação. Quanto maior for a densidade de elétrons no metal, mais forte será essa retrodoação e conseqüentemente mais forte a ligação M-CO (MIESSLER, 2014). A tendência observada para a série pode ser explicada com base no caráter σ -doador de L, quanto mais densidade eletrônica é doada para o metal, mais forte a ligação Ru-C, enfraquecendo a ligação C-O. Como conseqüência, menor energia é requerida para alongar

a ligação, refletindo em menores números de onda no espectro de infravermelho.

Figura 13 - Parâmetros geométricos e ν_{CO} para complexos do tipo *cis*-[Ru(bpy)₂L(CO)]^{n+/0}, em que L = (1): CO, (2): ONO₂⁻, (3): SO₃²⁻, (4): CH₃.

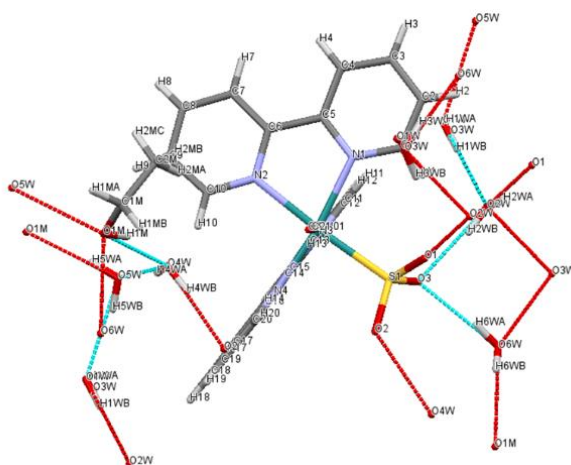


Fonte: a autora.

Nesta série, o ligante sulfito tem uma diferença menor entre os comprimentos de ligação Ru-N(bpy) (considerando os átomos de nitrogênio *trans* ao CO e L). Ou seja, o efeito *trans* estrutural destes dois ligantes em isomeria *cis* são bem próximos, mesmo apresentando propriedades eletrônicas distintas. No entanto, essa falta de tendência pode ser justificada pela combinação de efeitos que podem ocorrer, como: carga do complexo, efeito estérico e ligações de hidrogênio (COE; GLENWRIGHT, 2000).

A Figura 14 ilustra a presença de seis moléculas de águas de hidratação em torno do complexo. Como pode ser observado, cada átomo de oxigênio do ligante sulfito está interagindo com moléculas de água de hidratação. Também é possível observar os hidrogênios da bipyridina fazendo esse tipo de interação. O complexo I apresenta alta solubilidade em água, bem como, em etanol e metanol, o que pode estar relacionado com uma melhor interação entre os cristais do complexo e o solvente, facilitando as ligações de hidrogênio. Tal fato é reportado na literatura para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(CO)(CO₂)], em que os cristais hidratados são solúveis em água, etanol e metanol se comparado aos cristais anidros (TANAKA et al., 1993). A solubilidade em água é uma vantagem desse composto em relação a outras carbonilas metálicas, podendo facilitar a aplicação como metalofarmacêutico.

Figura 14 - Rede tridimensional de ligações de hidrogênio para o complexo de fórmula geral *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].6(H₂O).(CH₃CH₂OH).



Fonte: a autora.

4.2.2 Análise elementar

Através desta técnica foi possível determinar a fórmula molecular e avaliar a pureza do produto obtido na reação. A Tabela 4 relaciona os dados de porcentagens em massa teórica e experimental de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre.

Tabela 4 - Resultado de análise elementar para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].

	C	H	N	S
Teórico (%)	40,06	4,48	8,90	5,09
Experimental (%)	39,64	4,48	9,00	4,95
Erro (%)	1,05	0	1,12	2,75

Fonte: a autora.

A partir dos dados da análise elementar foi possível inferir que os resultados são compatíveis com a formulação proposta. Os valores são ainda condizentes com a presença de seis moléculas de água e uma molécula de etanol presentes na rede cristalina, que foram observadas na estrutura de raios X. O erro percentual relacionado as massas de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre corresponde a um valor inferior a 5%, que é considerado tolerável.

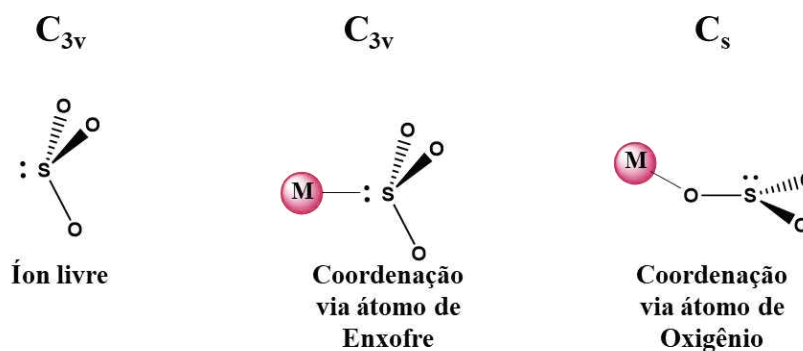
4.2.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma técnica bastante útil na caracterização de compostos de coordenação, uma vez que pode identificar grupos

funcionais, tautômeros, interações intermoleculares e os modos de coordenação de ligantes ao centro metálico (NAKAMOTO, 1978). A atribuição dos modos vibracionais pode ser feita através de comparações entre espectros de composto precursor e final, ligantes livres e de complexos semelhantes já descritos. No caso do complexo I, pode-se destacar os modos vibracionais dos dois ligantes SO_3^{2-} e CO, ambos apresentam modos vibracionais distintos dependendo do átomo ao qual estão coordenados.

O ligante SO_3^{2-} livre, molécula do tipo XY_3 pertencente ao grupo pontual C_{3v} , apresenta quatro frequências vibracionais em 469, 620, 933, 967 cm^{-1} , referentes aos modos vibracionais $\nu_1(\text{A}_1)$, $\nu_3(\text{E})$, $\nu_2(\text{A}_1)$, $\nu_4(\text{E})$ ativos no infravermelho. A coordenação deste ligante pode ser tanto via átomo de Enxofre quanto via átomo de Oxigênio, como representado na Figura 15. No primeiro caso, a sua simetria é preservada (C_{3v}) e as bandas observadas no espectro de infravermelho estão associadas aos quatro modos vibracionais do ligante livre. Na segunda situação, a simetria é reduzida a C_s , neste caso, dois dos seus modos vibracionais irão se desdobrar em duas outras bandas (NAKAMOTO, 2006).

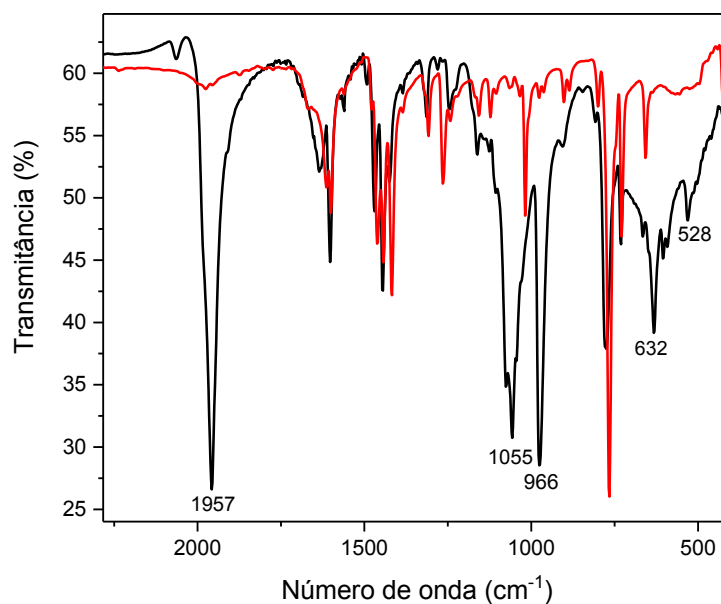
Figura 15 - Representação dos possíveis modos de coordenação monodentada do ligante sulfito.



Fonte: Adaptado da referência (NAKAMOTO, 2006).

A Figura 16 mostra uma sobreposição dos espectros de infravermelho na região de 470 a 2500 cm^{-1} para o complexo precursor *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ e para o complexo I para fins comparativos. Nota-se o surgimento de bandas inexistentes no espectro do precursor, quatro destas, localizadas em: 528, 632, 966, 1055 cm^{-1} são atribuídas às frequências vibracionais do ligante sulfito. Esses dados consistem com a preservação da simetria C_{3v} , indicando que a coordenação do ligante SO_3^{2-} ocorreu de forma monodentada via átomo de enxofre, como observado na estrutura obtida pela difração de raios X.

Figura 16 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] (em vermelho) e *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] (em preto) em pastilhas de KBr.



Fonte: a autora.

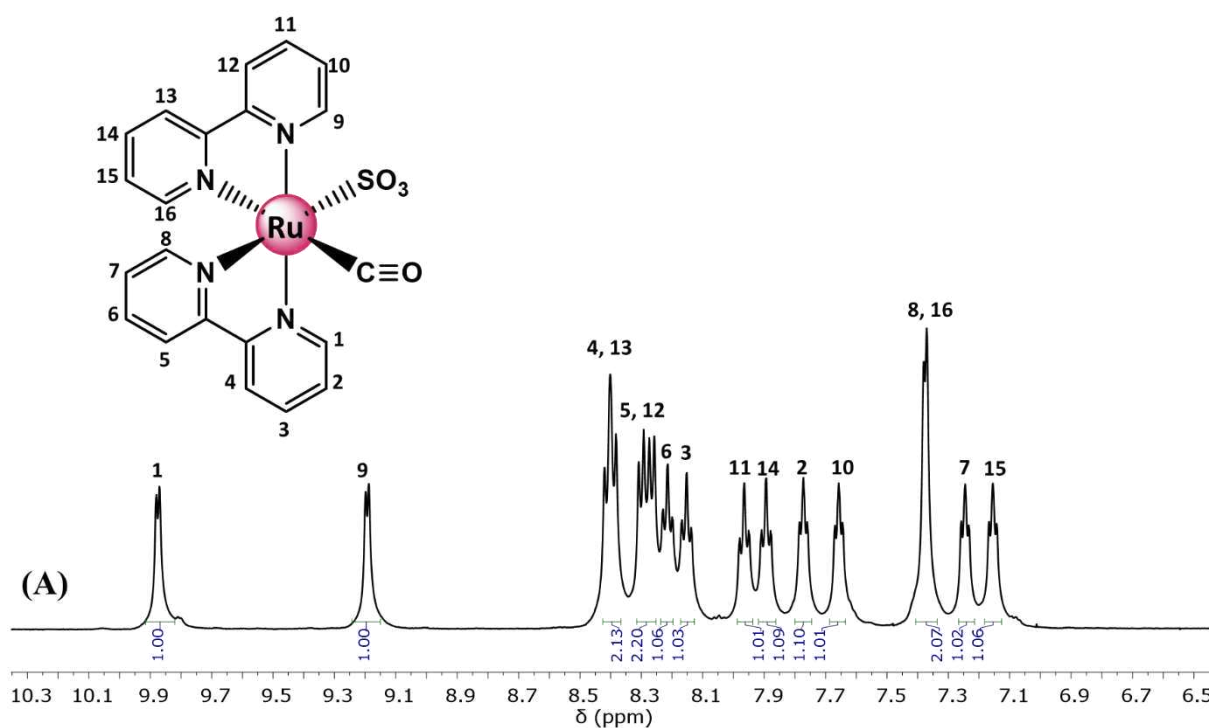
O monóxido de carbono livre apresenta estiramento em 2155 cm⁻¹. Quando coordenado a tendência é que esta frequência seja deslocada para valores menores. Isto ocorre devido ao efeito sinérgico, em que o CO pode doar densidade eletrônica para um orbital σ do metal, ao mesmo tempo que o metal devolve densidade eletrônica para os orbitais π^* do CO. O efeito líquido é uma forte ligação M-CO e enfraquecimento da ligação C \equiv O, o que ocasiona a diminuição na frequência de estiramento desta molécula quando coordenada (MIESSLER, 2014).

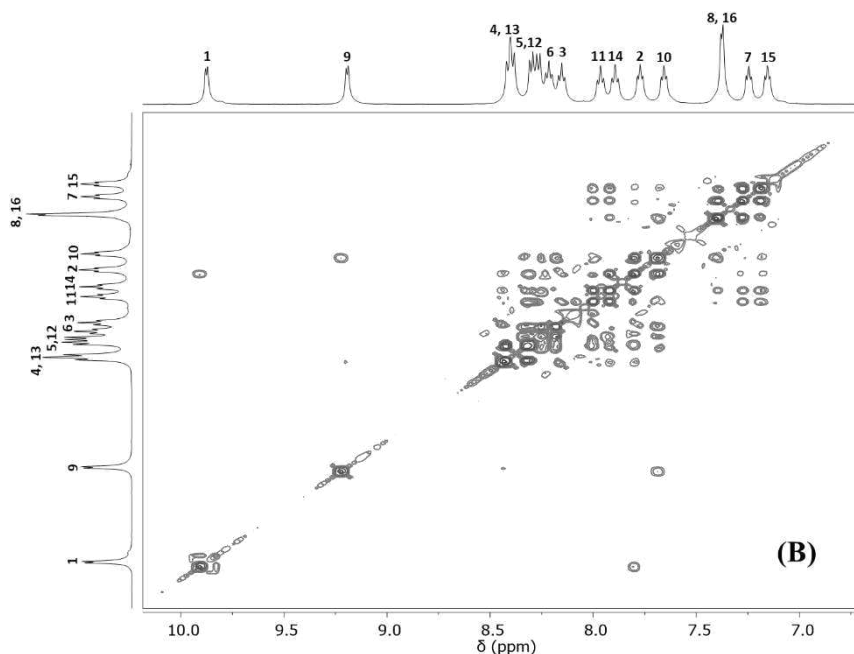
Essa técnica é bastante útil para a caracterização de complexos carbonílicos por ser capaz de distinguir o seu modo de coordenação ao centro metálico, uma vez que este pode ser de modo terminal (apresentando estiramento numa faixa de 1850-2100 cm⁻¹), pontes duplas (1750-1850 cm⁻¹) ou pontes triplas (1620-1730 cm⁻¹) (OLIVEIRA, 2009b), além disso, a frequência de estiramento é intensa, bem definida e localizada em uma região do espectro livre de interferentes. No espectro do complexo em estudo (Figura 16), é observada uma banda de forte intensidade em 1957 cm⁻¹, atribuída ao (ν CO), confirmando a coordenação desta molécula ao Rutênio com uma ligação do tipo terminal.

4.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma poderosa ferramenta utilizada para a caracterização estrutural de complexos. Considerando o estado de oxidação (+2) do centro metálico, o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] pode ser considerado apto ao estudo por essa técnica. Para as análises, o composto foi dissolvido em água deuterada (D₂O), a uma concentração de 25 mmol L⁻¹. A representação estrutural e os espectros de ^1H RMN para o complexo I são ilustrados na Figura 17A. Para uma melhor atribuição dos sinais, também foram obtidos os espectros bidimensionais COSY (Figura 17B), que detectam os acoplamentos H-H, facilitando a atribuição da região de sinais referentes aos anéis aromáticos.

Figura 17 - (A) Espectro de ressonância magnética de ^1H do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em D₂O; (B) Espectro ^1H - ^1H RMN COSY.





Fonte: a autora.

Os dois ligantes bipyridina são magneticamente equivalentes, pois apresentam um eixo de rotação C_2 em sua estrutura, no entanto, quando coordenada a um complexo com conformação *cis*, cada anel do ligante torna-se não equivalente (LLANGURI et al., 2001). A integração dos sinais apresentados no espectro ^1H RMN da Figura 17A aponta a existência de 16 hidrogênios, confirmando a forma isomérica *cis* das duas bipyridinas. Também é importante ressaltar a região em que esses sinais aparecem, na faixa de 7,16 a 9,87 ppm, característico de hidrogênios de ligantes aromáticos.

O ponto inicial para a tentativa de atribuição dos sinais levou em consideração que os hidrogênios mais próximos aos ligantes CO e SO_3^- estariam mais desprotegidos (maior δ), sendo o H_1 mais desprotegido apresentando um deslocamento de 9,87 ppm, devido a maior aproximação com o ligante CO . Esta observação é sustentada pela capacidade deste ligante de retirar densidade eletrônica do metal pela retrodoação, causando uma desproteção aos hidrogênios deste anel (OLIVEIRA, 2009a). Além disso, é descrito que as posições *orto* e *para* do anel piridínico apresentam deslocamentos químicos maiores que na posição *meta*. Isso ocorre devido o Nitrogênio presente neste ligante, apresentar uma relação carga/raio atômico suficiente para diminuir a densidade eletrônica nas posições *orto* e *para*. Uma vez que a concentração de elétrons é menor nestas posições, estes estarão mais desprotegidos, essa observação também se estende a 2,2'- bipyridina (GOBETTO et al., 2003; REISNER et al., 2005). Estabelecido esses dois critérios, espera-se que H_9 apresente deslocamento químico próximo do valor estabelecido para H_1 , visto que H_9 está ligado ao carbono em posição *orto* ao Nitrogênio. Com isso, os sinais mais desprotegidos, em 9,87 e 9,19 ppm, foram atribuídos aos

H₁ e H₉, respectivamente. O mesmo raciocínio foi aplicado na atribuição dos sinais de prótons para o complexo semelhante *cis*-[Ru(bpy)₂(CO)Cl]⁺, o qual apresentou 16 sinais de prótons não equivalentes na reação de aromáticos e os dois dubletos em campo mais baixo foram atribuídos aos Hidrogênios em posição *orto* dos anéis da bipyridina (SALASSA et al., 2010).

Devido a uma aproximação dos demais sinais, as posições dos outros Hidrogênios foram confirmadas por correlações homonucleares ¹H-¹H COSY obtidas pela análise do espectro bidimensional (Figura 17B), levando em conta também os padrões de desdobramentos dos sinais. As atribuições para os prótons do complexo I encontram-se resumidas na Tabela 5.

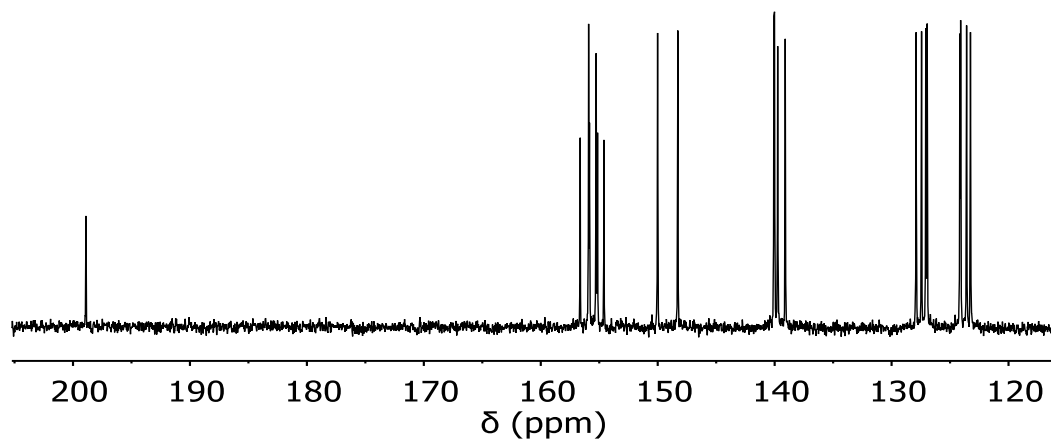
Tabela 5 - Deslocamentos químicos (ppm) de ¹H do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].

H	δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	δ (ppm)
1	9,87	7	7,25	13	8,40
2	7,77	8	7,38	14	7,90
3	8,15	9	9,19	15	7,16
4	8,40	10	7,66	16	7,38
5	8,28	11	7,97	-	-
6	8,22	12	8,28	-	-

Fonte: a autora.

Adicionalmente, o espectro de ¹³C RMN encontra-se representado na Figura 18, onde foram observados 21 sinais de carbonos, dos quais, 20 estão na região de 123 a 156 ppm referentes aos carbonos dos anéis aromáticos e 1 referente ao ligante monóxido de carbono. Essa análise confirma os resultados obtidos no espectro de ¹H RMN, pois este número de sinais está totalmente consistente com a quantidade de átomos de carbono encontrados na estrutura do complexo I. Contudo, a atribuição de todos os deslocamentos químicos de ¹³C não foi realizada devido à ausência dos espectros de correlação HMBC e HMQC.

Figura 18 - Espectro de ressonância magnética de ^{13}C do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{CO})]$ em D_2O .



Fonte: a autora.

A espectroscopia de ^{13}C RMN é uma ferramenta útil para observar ligantes que não contenham Hidrogênio, como é o caso do CO. Em complexos organometálicos são encontradas algumas características interessantes (MIESSLER, 2014), como:

- Picos de carbonila terminal (M-CO) situam-se frequentemente na faixa de 177 a 275 ppm;
- O deslocamento químico de ^{13}CO está correlacionado com a força da ligação C-O. Quanto mais forte esta ligação, mais baixo será o deslocamento químico;
- Carbonilas em ponte têm maiores deslocamentos químicos do que carbonilas terminais.

Deste modo, o sinal para o ligante CO é geralmente fácil de ser distinguido dos demais ligantes. Para o complexo I, o sinal foi observado em 198,98 ppm. Comportamento semelhante é observado também para o complexo citado anteriormente, *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{CO})\text{Cl}]^+$, onde o deslocamento do Carbono é visto em 198,77 ppm. Visto que, este deslocamento está relacionado com a força da ligação C-O, é possível fazer uma correlação com demais complexos carbonílicos semelhantes verificando a influência dos ligantes auxiliares, como pode ser demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Influência dos ligantes auxiliares no deslocamento químico da carbonila em complexos do tipo *cis*-[Ru(bpy)₂(L)(CO)].

Complexo	δC (ppm)	Referência
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (CO)CO ₂]	210,2	(TANAKA et al., 1993)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (CO)(C(O)OCH ₃) ⁺	202,2	(TANAKA et al., 1993)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (CO)(C(O)OH) ⁺	201,5	(TANAKA et al., 1993)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)]	198,98	Este trabalho
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (CO)Cl] ⁺	198,77	(SALASSA et al., 2010)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (CO) ₂] ²⁺	190,3	(TANAKA et al., 1993)

Fonte: a autora.

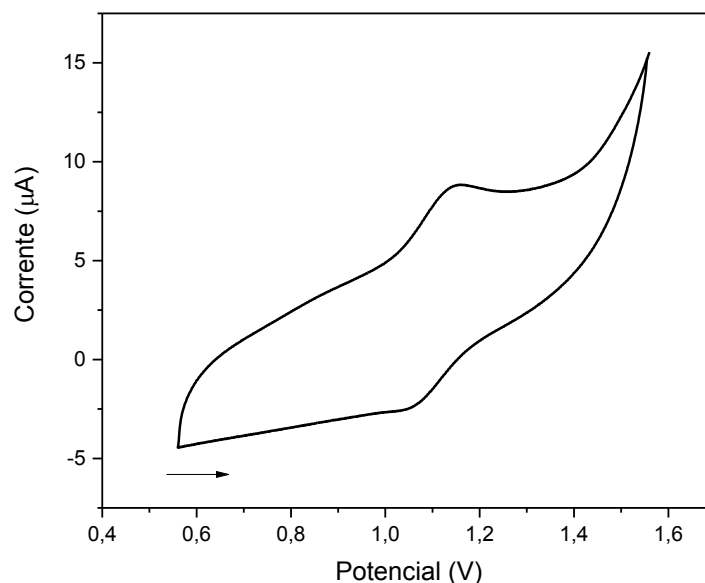
Nota-se que quanto maior o caráter σ -doador do ligante auxiliar, mais desprotegido é o sinal da carbonila do espectro de ¹³C. Isso é explicado pela maior tendência de o metal, nesses casos, doar elétrons para os orbitais π^* do monóxido de carbono, enfraquecendo a ligação C-O. Por outro lado, no complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺ observamos comportamento contrário, uma vez que o ligante auxiliar se trata de um π -acceptor. Os dois ligantes monóxido de carbono competem pela densidade do metal, o que torna a ligação C-O mais forte e conseqüentemente o valor do seu deslocamento aparece em 190,3 ppm. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao CO ligado em ponte.

4.2.5 Medidas eletroquímicas

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica bastante utilizada em compostos de coordenação por fornecer informações sobre as propriedades doadoras e receptoras dos ligantes e assim avaliar a suas influencias sobre o potencial formal de redução da espécie metálica. Além da caracterização de complexos, a técnica também pode ser utilizada para o monitoramento de reações, entre outras aplicações.

O voltamograma cíclico do complexo I, representado na Figura 19, foi obtido em acetonitrila onde o perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) a 0,1 mol L⁻¹ foi utilizado como eletrólito, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ (varredura positiva). O potencial foi referenciado utilizando o ferroceno como padrão interno ($E_{1/2} = 0,44$ V vs Ag/AgCl).

Figura 19 - Voltamograma cíclico do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em solução de acetonitrila contendo PTBA 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹.



Fonte: a autora.

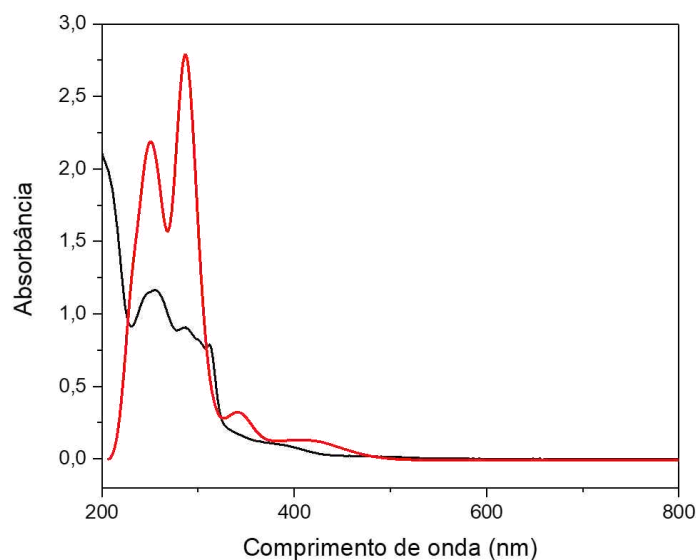
No voltamograma foram encontrados um potencial de pico anódico (E_{pa}) em 1,15 V, referente ao processo de oxidação $Ru^{2+} \rightarrow Ru^{3+} + e^-$ e um potencial de pico catódico (E_{pc}) em 1,05 V, referente ao processo de redução: $Ru^{3+} + e^- \rightarrow Ru^{2+}$. O potencial de meia onda ($E_{1/2}$) para esse processo redox é igual a 1,10 V, sendo considerado *quasi*-reversível, uma vez que $\Delta E_p = 0,100$ V e $i_{pc}/i_{pa} = 3,68$. Ao se comparar o valor do potencial de meia onda do complexo I e do seu precursor (WALSH; DURHAM, 1982), nota-se o deslocamento deste para valores mais positivos, ou seja, conferiu maior estabilidade ao centro metálico. Este comportamento é característico de complexos similares que têm em sua esfera de coordenação o ligante CO (OYAMA et al., 2012), devido ao seu forte caráter π -acceptor. Como já foi explicado anteriormente, ao fazer retrodoação para o ligante CO, o metal tem sua densidade eletrônica diminuída, o que torna a sua oxidação mais difícil. Tal fato justifica a elevação dos potenciais de oxidação para complexos deste tipo.

4.2.6 Espectroscopia eletrônica

O espectro eletrônico para o complexo I foi obtido em água. Utilizou-se cálculo computacional de TD-DFT na obtenção do espectro teórico do complexo em água, para auxiliar na atribuição das transições eletrônicas. Os espectros eletrônicos calculado e experimental são

mostrados na Figura 20. É possível observar duas bandas na região de maior energia, em 255 e 290 nm, bem como, bandas em regiões de menor energia: 314 (ombro) e 394 nm.

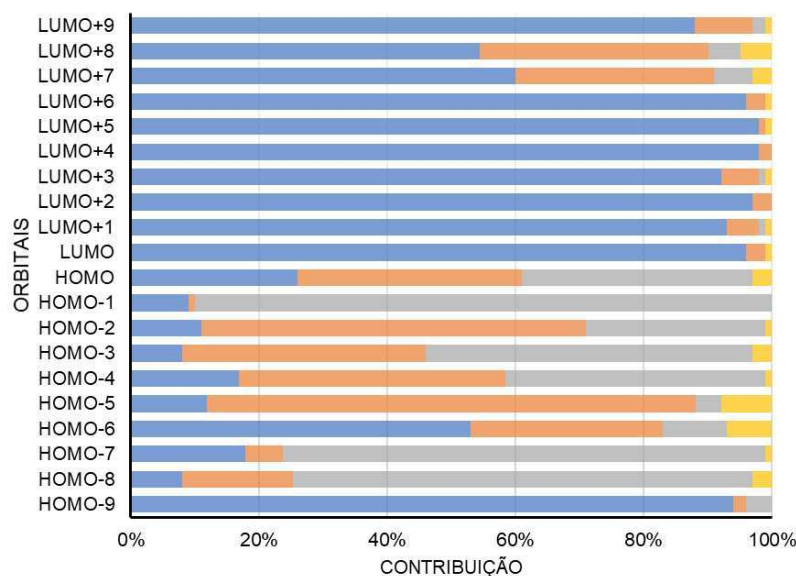
Figura 20 - Espectros eletrônicos calculado (em vermelho) e experimental (em preto) para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em água a uma concentração de $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: a autora.

A Figura 21 mostra as contribuições dos fragmentos nas transições eletrônicas obtidas teoricamente. A banda em 255 nm é composta, principalmente, pela transição H-6 \rightarrow L+4 (27%). Uma vez que o orbital H-6 e L+4 são predominantemente do ligante bipyridina, a banda pode ser atribuída a uma transição intraligante (IL). Para a segunda banda na região de maior energia, em 290 nm, foram encontradas as seguintes contribuições: H-3 \rightarrow L+4 (39%), H-8 \rightarrow L+1 (11%), H-3 \rightarrow L+3 (11%), como os orbitais H-3 e H-8 têm contribuições mais significativas dos ligantes sulfito e bipyridina, enquanto os orbitais L+4, L+1 e L+3 têm maior percentual do ligante bipyridina. Portanto, a banda pode assumir caráter misto de transição IL e LLCT. As bandas em 314 e 394 nm, apresentam maiores contribuições de: H-2 \rightarrow L+6 (50%) e H-2 \rightarrow L+1 (72%), respectivamente. Como o orbital H-2 possui maior composição do centro metálico, as duas bandas são atribuídas como transferência de carga metal ligante (MLCT). As atribuições e os coeficientes de absorvância molar, encontram-se listados na Tabela 5.

Figura 21 - Composição dos orbitais moleculares do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em função dos fragmentos: Ru (em laranja), bpy (em azul), SO₃²⁻ (em cinza) e CO (em amarelo).



Fonte: a autora.

Tabela 7 - Dados de UV-Vis (experimental) para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em água.

Complexo	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	Atribuições
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)]	255	1,06 x 10 ⁴	$\pi^* \leftarrow \pi(\text{bpy})$
	290	7,51 x 10 ³	$\pi^* \leftarrow \pi(\text{bpy})$
			$\pi^* \leftarrow \pi(\text{SO}_3^{2-})$
	314 (ombro)	5,94 x 10 ³	$\pi^*(\text{bpy}) \leftarrow d\pi(\text{Ru})$
	394	8,11 x 10 ²	$\pi^*(\text{bpy}) \leftarrow d\pi(\text{Ru})$

Fonte: a autora.

4.3 Estudo Fotoquímico

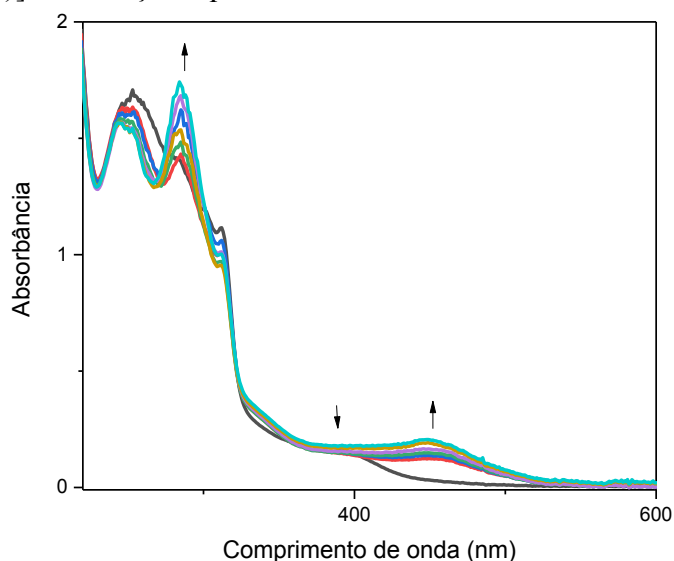
Reações fotoquímicas são processos em que se tem a participação da luz conduzindo a estados eletrônicos com maior conteúdo energético. Para que as reações deste tipo ocorram, é necessário que a energia do fóton excitado seja igual a diferença de energia entre os estados inicial e final. Com isso, as transições eletrônicas são fundamentais para este estudo. Considera-se que as transições totalmente permitidas aumentam a absorção de luz e as transições proibidas têm baixa eficiência, no entanto, podem estar ligadas aos processos de transferência ou conversão de energia, que aumentam o seu rendimento (TOMA, 2016).

O monóxido de carbono é firmemente ligado ao centro metálico e a sua liberação frequentemente necessita ser promovida térmica ou fotoquimicamente. Estas estratégias podem

ser utilizadas tanto em rotas sintéticas quanto na liberação controlada de CO *in vivo*, que é um dos objetivos deste trabalho.

O estudo fotoquímico do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] foi realizado em solução aquosa, utilizando luz de diferentes comprimentos de onda: 300, 350 e 394 nm. A liberação fotoinduzida do CO foi monitorada através do método espectrofotométrico, monitorando as alterações espectrais em função do tempo de irradiação, que ocorreu num total de 180 minutos. A Figura 22 ilustra a variação espectral da solução aquosa do complexo irradiado com luz $\lambda_{\text{máx.}}=350$ nm, onde pode ser observado um aumento na intensidade da banda em 290 nm, além da diminuição na intensidade da banda em 394 nm e o surgimento de outra em 450 nm. O mesmo comportamento foi observado para os demais comprimentos de onda utilizados para a irradiação do complexo. Os valores de rendimento quântico para a liberação de CO nos três comprimentos de onda foram calculados por actinometria. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Figura 22 - Espectros eletrônicos para a irradiação em 350 nm do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em solução aquosa durante 180 minutos.



Fonte: a autora.

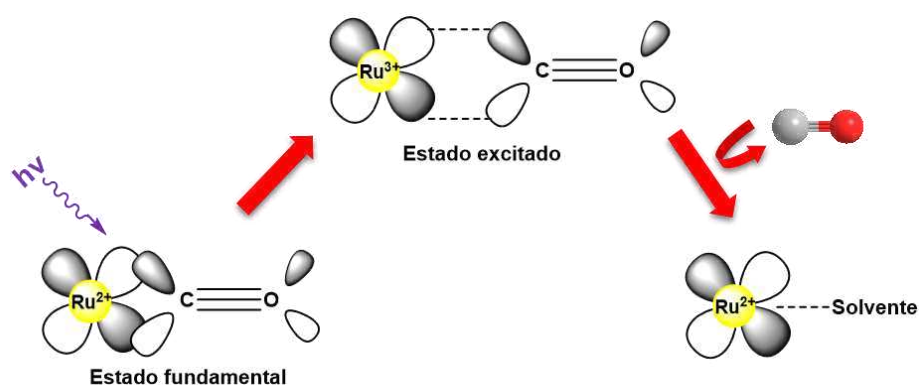
Tabela 8 - Valores de rendimento quântico (Φ) para liberação fotoquímica de CO a partir do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].

Comprimento de onda (nm)	Φ_{CO}
300	0,422±0,004
350	0,301±0,003
394	0,168±0,002

Fonte: a autora.

A mudança no perfil espectral indica que houve liberação de uma molécula de CO e posterior coordenação da água ao sítio livre. A Figura 23 traz uma representação da reação fotoquímica, a irradiação promove a transferência de carga do orbital $d\pi$ do centro metálico para o orbital π^* do monóxido de carbono, o que causa um enfraquecimento da retrodoação que está envolvida na porção Ru(II)-CO, que agora tem caráter Ru(III)-CO. O monóxido de carbono torna-se lábil, sendo liberado e substituído por uma molécula de solvente (RIMMER; PIERRI; FORD, 2012). A análise do espectro na região do ultravioleta e visível juntamente com os dados obtidos por TD-DFT são conclusivos para a atribuição da banda em 394 nm como uma MLCT, onde a transição H-2 \rightarrow L+1 tem uma contribuição de 72%, onde H-2 é um orbital centrado no Rutênio e L+1 no ligante bipyridina. Portanto, o deslocamento dessa banda para 450 nm pode ser justificado pela diminuição da energia envolvida nas transições eletrônicas, devido a formação do aquo complexo (SILVA, 2008). Os dados de rendimento quântico para a liberação de CO (Φ_{CO}) apresentaram dependência com os três comprimentos de onda utilizados. Quanto menor o λ_{irr} , maior rendimento quântico de liberação e de modo contrário, quanto maior o λ_{irr} , menor este rendimento, o que está totalmente de acordo com a quantidade de energia absorvida em cada transição.

Figura 23 - Reação de fotosubstituição da molécula de monóxido de carbono por uma molécula de solvente.

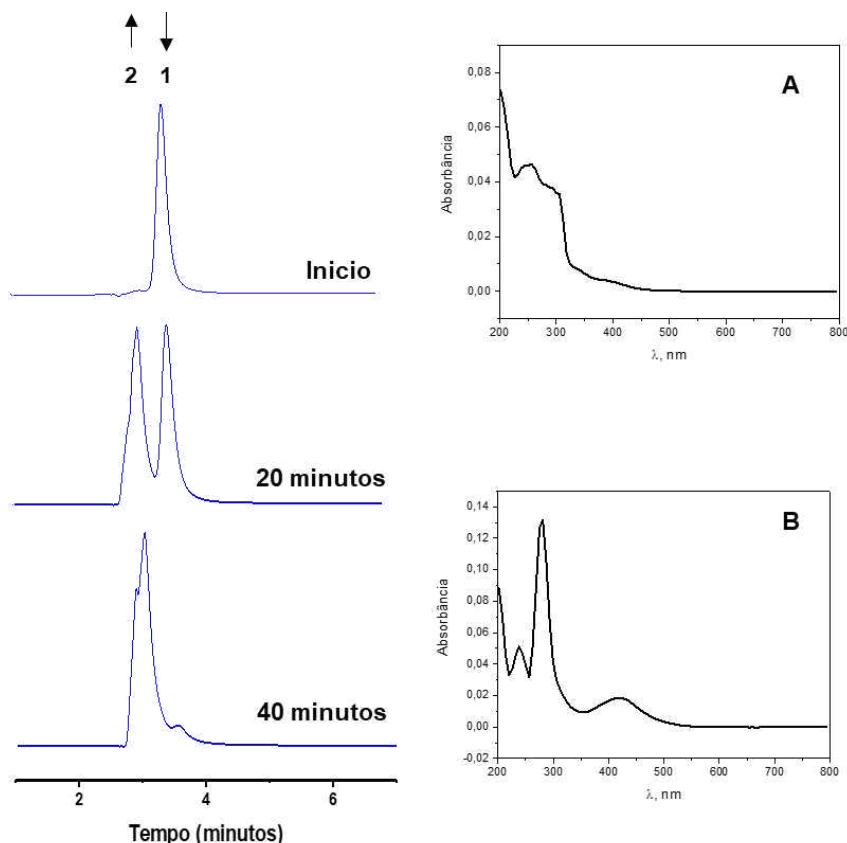


Fonte: a autora.

A reação de fotosubstituição também foi acompanhada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que além de indicar a pureza do complexo sintetizado, devido a sua sensibilidade, também pode ser utilizada no monitoramento de reações, como neste caso, as reações fotoquímicas, para dar suporte ao mecanismo de liberação do monóxido de carbono. Para a realização do experimento, uma solução 0,11 mM do complexo foi preparada utilizando

como solvente a fase móvel, constituída por metanol/água 85/15% pH = 3,5. Os cromatogramas e os espectros eletrônicos obtidos neste estudo encontram-se resumidos na Figura 24.

Figura 24 - Acompanhamento da reação de fotossustituição do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] por CLAE, com irradiação em 350 nm. Os cromatogramas (em azul) foram monitorados a 250 nm, fase móvel = metanol/água (contendo HTFA 0,1%) 85/15%, pH = 3,5, fluxo = 1,0 mL min⁻¹. Os espectros eletrônicos (em preto) foram obtidos a partir do detector cromatógrafo.



Fonte: a autora.

Inicialmente, pode-se observar a presença de apenas um pico cromatográfico (1) com tempo de retenção (T_R) igual a 3,5 minutos, cujo espectro eletrônico (A) correspondente ao complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)]. Após 20 minutos de irradiação da solução do complexo em 350 nm, foi então injetada uma nova alíquota desta solução, obtendo-se um cromatograma com um segundo pico (2) com $T_R = 3,0$ minutos. Deu-se então prosseguimento a irradiação até 40 minutos de exposição a luz com o mesmo comprimento de onda, a nova injeção da solução deu origem ao terceiro cromatograma, onde é possível observar que o quase desaparecimento do pico (1) e permanência do pico (2). O espectro correspondente a este pico coincide com espectro eletrônico (B) do aquo complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(H₂O)]. A natureza deste produto

da fotorreação foi comprovada pela injeção da amostra autêntica e com base em estudos semelhantes (SILVA, 2008).

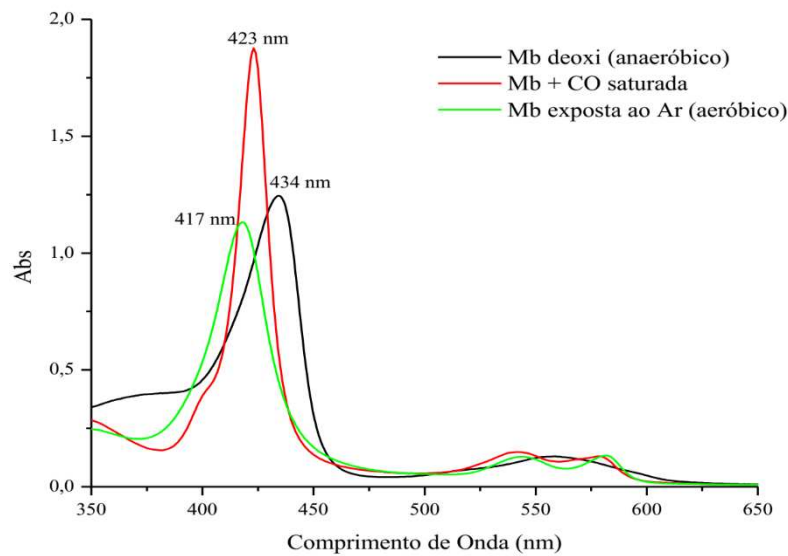
4.4 Ensaios de liberação de CO

4.4.1 Método espectrofotométrico

Com base nos estudos fotoquímicos realizados, sabe-se que o complexo I exibe liberação fotoinduzida de monóxido de carbono. O rendimento quântico é um parâmetro quantitativo, onde o Φ_{CO} é dado em mols de monóxido de carbono liberados por Einstein de luz absorvida por aquele composto. Contudo, do ponto de vista terapêutico, a liberação de CO seria mais interessante se expressa em uma taxa por unidade de tempo (RIMMER; PIERRI; FORD, 2012).

Um método analítico bastante utilizado para a detecção e quantificação de monóxido de carbono é avaliar a conversão da deoximioglobina (Mb) em carboximioglobina (MbCO) pela espectrofotometria (MOTTERLINI et al., 2002). Sabe-se que o perfil espectral da mioglobina totalmente reduzida (Fe^{2+}) é diferente do perfil espectral dessa proteína ligada ao CO, bem como ligada ao Oxigênio (O_2), representada na Figura 25.

Figura 25 - Espectros na região do UV-Vis para a mioglobina a 12 μ M nas formas deoxigenada, saturada com CO e exposta ao ar (ligada ao Oxigênio).



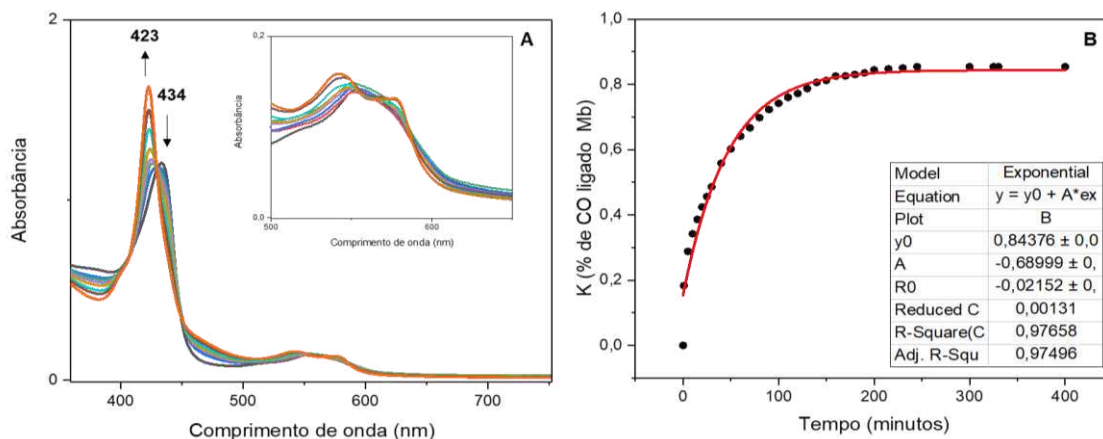
Fonte: a autora.

No espectro da deoximioglobina, a banda de Soret aparece em 434 nm e uma banda Q em 550 nm. Quando a mioglobina é exposta ao meio oxigenado, a banda de Soret desloca para 417 nm e a banda Q desdobra-se em duas novas bandas (α e β) com absorvância máxima em 540 e 575 nm. Já a coordenação do CO ao grupo heme provoca o mesmo desdobramento da banda Q, com máximos em 532 e 560 nm para α e β , respectivamente. Além disso, a banda de Soret ocorre em 423 nm. Devido a essas mudanças já conhecidas no espectro da proteína, que dependem da simetria do ferro, do seu estado de oxidação e do tipo de ligante, é possível aplicar a técnica para quantificação.

Para o ensaio, foram utilizadas concentrações finais de mioglobina e complexo de 12 e 24 μM , respectivamente, preparadas em tampão fosfato pH = 7,4 a temperatura de 37°C. Todos os experimentos foram conduzidos em câmara anaeróbica para que não houvesse competição do CO liberado com o oxigênio.

Inicialmente, registrou-se o espectro eletrônico da solução de mioglobina juntamente com o complexo, onde são observadas bandas características do estado reduzido da proteína: a banda de Soret em 434 nm e a banda Q em 558 nm. A irradiação foi feita com os comprimentos de onda de 300 e 350 nm, no entanto, somente o experimento em 350 nm é apresentado na Figura 26. A parte (A) da figura mostra o perfil espectral de acordo com o tempo de irradiação. A medida que CO é liberado, nota-se o deslocamento da banda de Soret para 423 nm e desdobramento da banda Q em duas (α e β), em 540 e 579 nm. Este perfil condiz com o espectro eletrônico reportado para o complexo formado com a coordenação do CO ao grupo heme (MOTTERLINI et al., 2002). Deste modo, pode-se consolidar com os demais estudos fotoquímicos, que a molécula liberada, mediante estímulo luminoso, trata-se do monóxido de carbono.

Figura 26 - Acompanhamento por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis de uma solução contendo 12 μM de mioglobina e 24 μM do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] em PBS 0,1 M, pH = 7,4. Irradiação em 350 nm por 360 minutos a 37°C (A) e acompanhamento cinético (B).



Fonte: a autora.

Este método, que é um dos mais utilizados para a detecção de monóxido de carbono, possui limitações no que diz respeito ao aspecto quantitativo. Primeiramente, porque a mioglobina também é um sensor de oxigênio. No entanto, esta limitação foi amenizada, uma vez que as soluções foram deaeradas e preparadas em câmara anaeróbica. A segunda complicação está relacionada as absorções da proteína nas regiões do ultravioleta e visível do espectro, deste modo, havendo interferência no resultado pela sobreposição com as bandas do complexo (RIMMER; PIERRI; FORD, 2012). Ainda assim, os dados foram tratados para a construção da curva cinética para determinar a porcentagem de MbCO. Esse ajuste é feito através da interação dos espectros da proteína totalmente reduzida e totalmente reduzida ligada ao CO. O resultado encontra-se na parte (B) da Figura 26, mostrando a conversão de 80% de Mb em MbCO em torno de 200 minutos com a irradiação em 350 nm.

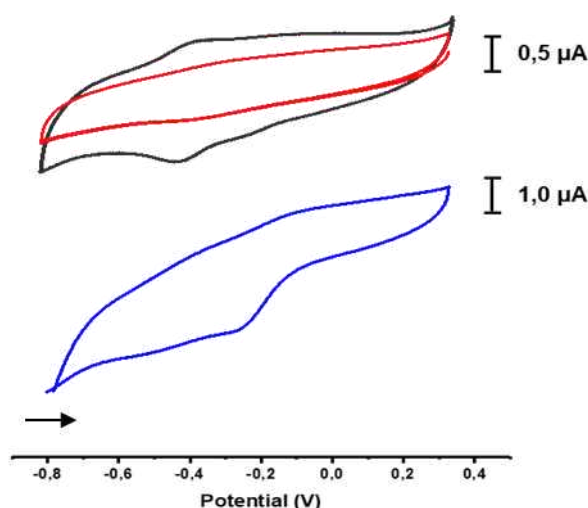
4.4.2 Método eletroquímico

A liberação de monóxido de carbono pode também ser analisada através de um eletrodo de carbono vítreo modificado com hemina (HmFe). Neste método, o CO liberado interage com a hemina presente na superfície do eletrodo, resultando na diminuição da corrente de pico anódica e aumento da corrente catódica para o processo referente ao par redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ da porfirina imobilizada (GARCÍA DE LA ROSA et al., 2005). Para a modificação do eletrodo, preparou-se uma suspensão de hemina com concentração de 0,3 mM dissolvida em Nafion[®]/etanol 1:4 (v/v). Após permanecer em banho ultrassônico por 1 h, duas gotas da

suspensão foram depositadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo limpo e deixado em repouso por 12 h a temperatura ambiente.

A varredura por voltametria cíclica foi feita usando o eletrodo modificado, platina e prata-cloreto de prata, sendo esses dois últimos como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente, em uma solução de tampão fosfato pH = 7,4. Os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na Figura 27.

Figura 27 - voltamogramas cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo não modificado (em vermelho), eletrodo modificado com HmFe^{III}/Nafion[®] em solução de PBS deaerada pH = 7,4 (em preto) e com adição do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] irradiado por 10 minutos em 350 nm.



Fonte: a autora.

A curva em preto traz o perfil do eletrodo modificado, que nestas condições, apresenta o potencial para o par redox HmFe^{III}/HmFe^{II} em 0,35 V. Ao adicionar o complexo à solução e depois irradiá-la, pode-se notar as duas principais mudanças na curva em azul: o desaparecimento da corrente de pico anódica, um discreto aumento na corrente de pico catódica e um deslocamento no potencial de catódico. A mudança na resposta do eletrodo evidencia que houve interação entre o ferro da porfirina e CO liberado com a irradiação. A formação do complexo HmFeCO^{II} seria responsável pelo aumento da corrente do processo de redução do HmFe^{III} a HmFe^{II} adsorvido à superfície do eletrodo. Resultados semelhantes foram apresentados para um complexo tricarbonílico de cromo (OBIRAI et al., 2006).

4.5 Atividade antimicrobiana

O complexo I foi submetido aos estudos de atividade antimicrobiana para uma série de bactérias gram-positivas e gram-negativas. O experimento foi realizado tanto na ausência

quanto na presença de luz com comprimento de onda de 453 nm. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Atividade antimicrobiana do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)].

Luz		Microorganismos			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
SIM	MIC	-	-	-	-
	MBC	-	-	-	-
NÃO	MIC	-	-	-	-
	MBC	-	-	-	-

MIC e MBC são expressos em µg/mL (µM), (-) Atividade não detectada para concentrações maiores que 500 µg/mL.

Fonte: a autora.

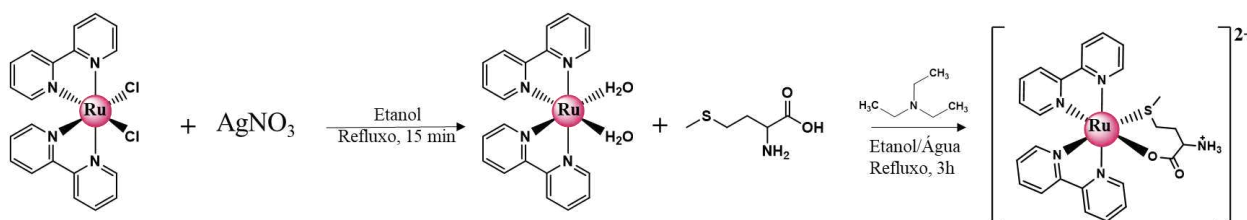
Um das propriedades farmacológicas conhecidas da molécula de CO é a sua capacidade de ser um agente bactericida. Seu mecanismo de ação envolve o aumento da resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente a morte bacteriana (YAN et al., 2019). Para os CO-RMs, alguns mecanismos envolvem a inibição da cadeia respiratória bacteriana (DAVIDGE et al., 2009), aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (TAVARES; NOBRE; SARAIVA, 2012), aumento da polarização da membrana e interferência da expressão gênica (WAREHAM et al., 2018), entre outros. Apesar de um grande número de compostos carbonílicos apresentarem-se como bons agentes bactericidas, o complexo carbonílico III não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana frente as cepas testadas.

5 PARTE II – RESULTADOS E DISCUSSÃO PARA O COMPLEXO *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (II)

5.1 Síntese do complexo (II)

Sabe-se que os aminoácidos podem formar quelatos estáveis com diversos íons metálicos. As ligações ocorrem através dos grupos amino, ácido carboxílico e Enxofre, caso contenha este átomo. A síntese do complexo (II) foi realizada em duas etapas, conforme descrito no esquema 2, seguindo procedimento já descrito para complexos semelhantes (MAJUMDER; BUTCHER; BHATTACHARYA, 2002).

Esquema 2 – Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂.



Fonte: a autora.

Na primeira etapa, o deslocamento dos dois ligantes cloretos foi facilitado pela reação com os íons Ag⁺ em meio de etanol. O AgCl formado foi removido por filtração e a solução resultante, foi adicionado o ligante metionina solubilizado em água. Este aminoácido apresenta dois valores de pK_a: 2,28 e 9,21 para o ácido carboxílico e grupo amino, respectivamente. Com a adição da base trietilamina, a síntese foi realizada em pH aproximadamente igual a 8, favorecendo a deprotonação da porção -COOH, enquanto o grupo -NH₃⁺ permanece protonado, o que indica uma coordenação do ligante ao centro metálico através dos átomos Oxigênio e Enxofre. A carga total do íon complexo formado sugere ainda a necessidade de dois íons PF₆⁻ para a precipitação do composto final. Deste modo, após o período reacional, reduziu-se o volume da mistura e adicionou-se uma solução saturada de NH₄PF₆.

5.2 Caracterização do complexo (II)

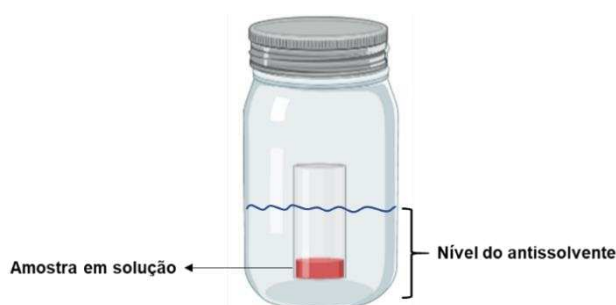
5.2.1 Difração de Raio x de monocristais

Os aminoácidos podem coordenar-se aos metais de transição via átomos de Oxigênio e Nitrogênio. No caso do aminoácido metionina, temos também a possibilidade de coordenação via átomo de Enxofre. Entretanto, a forma mais conhecida de ligação ao íon

metálico é a bidentada através dos doadores N e O, via dissociação do próton ácido. Deste modo, o aminoácido forma um anel quelato de cinco membros com o metal (MAJUMDER; BUTCHER; BHATTACHARYA, 2002). Esses ligantes, podem ainda, se coordenar de modo tri ou tetradentado e até mesmo em ponte, conectando dois centros metálicos (PATALENSZKI et al., 2015; SANTOS et al., 2018). Diante disso, a difração de raios x é uma técnica crucial para a elucidação da estrutura de complexos contendo aminoácidos, uma vez que permite identificar os corretos modos e sítios de coordenação.

A obtenção dos cristais do complexo II foi realizada através do método da difusão de vapor. Nesta metodologia, são utilizados dois líquidos com polaridades diferentes. Em geral, escolhe-se um solvente no qual a amostra é totalmente solúvel e um antissolvente com pressão de vapor superior ao primeiro (SPINGLER et al., 2012). Neste caso, foram escolhidos etanol e éter dietílico como solvente e antissolvente, respectivamente. Uma pequena quantidade da amostra, aproximadamente 5,0 mg, foi solubilizada em etanol ($\cong 5,0$ mL) e transferida para um frasco de vidro pequeno. Certificou-se antes que não havia nenhuma partícula em suspensão. Este frasco foi posicionado no centro de um frasco maior com tampa, como representado na Figura 28, foi adicionado um volume de éter dietílico cuidadosamente. O nível do éter foi superior ao nível da solução da amostra, no entanto, suficiente para não causar um tombamento do frasco menor. O recipiente maior foi então fechado e deixado em repouso em local escuro.

Figura 28 - Representação esquemática do método de difusão de vapor para obtenção de monocristais.

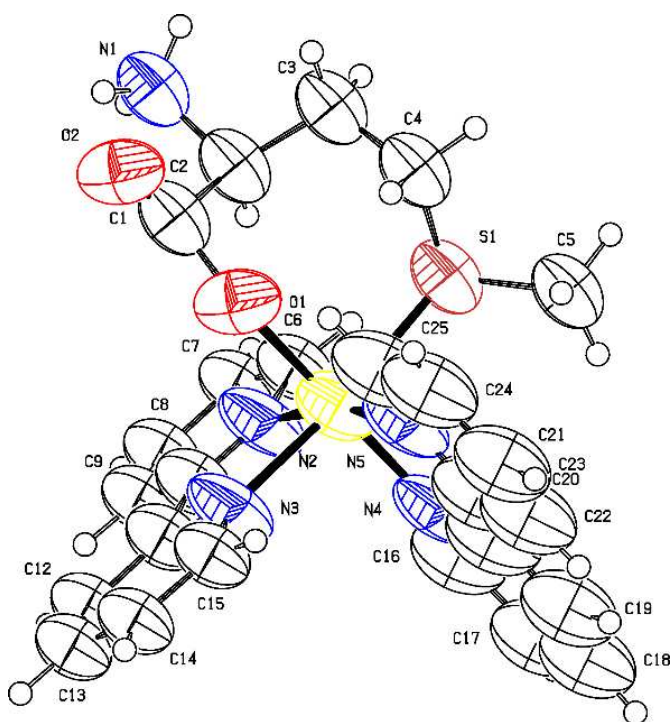


Fonte: Adaptada da referência (CUNHA, 2008).

O éter dietílico tem menor ponto de ebulição (35°C) que o etanol (78°C), assim, todo o espaço interno do frasco maior fica preenchido com os vapores deste antissolvente, que lentamente irá se difundir na solução contendo a amostra, formando duas fases e levando à precipitação do composto. Por ser um processo lento e demorado, favorece então a formação dos cristais.

O complexo II cristalizou no sistema trigonal, com grupo espacial R3 e apresentando uma geometria octaédrica distorcida. A estrutura cristalina é mostrada na Figura 29 e os parâmetros cristalográficos de refinamento e os principais valores de distâncias [Å] e ângulos [°] encontram-se listados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Pela estrutura e conjunto de dados foi possível concluir que a metionina está coordenada ao Rutênio de forma bidentada, através dos átomos de S e O como proposto pela rota sintética.

Figura 29 - Estrutura ORTEP do complexo de forma geral *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂. Elipsóides com 50% de probabilidade.



Fonte: a autora.

Tabela 10 - Dados cristalográficos de refinamento da estrutura do complexo de forma geral *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂.

Fórmula empírica	C ₂₅ H ₂₇ F ₁₂ N ₅ O ₂ P ₂ RuS
Massa molecular	852.58
Temperatura/K	149.99
Sistema cristalino	trigonal
Grupo espacial	R3
a/Å	24.1254(17)
b/Å	24.1254(17)
c/Å	14.5563(10)

$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	90
$\gamma/^\circ$	120
Volume/ \AA^3	7337.2(12)
Z	9
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.737
μ/mm^{-1}	6.372
F(000)	3834.0
Tamanho do cristal/ mm^3	$0.197 \times 0.049 \times 0.034$
Radiação	CuK α ($\lambda = 1.54178$)
Reflexões coletadas	16053
Reflexões independentes	4730 [$R_{\text{int}} = 0.1736$, $R_{\text{sigma}} = 0.1707$]
Qualidade de ajuste F^2	1.077
Índices R final [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.1287$, $wR_2 = 0.2691$
Índices R [todos os dados]	$R_1 = 0.2526$, $wR_2 = 0.3391$
CCDC	1951210

Fonte: a autora.

Tabela 11 - Comprimentos de ligação [\AA] e valores de ângulos [$^\circ$] selecionados para o complexo de fórmula geral *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂.

Comprimento de ligação [\AA]		Ângulo de ligação [$^\circ$]	
Ru-S(1)	2.35(9)	O(1)-Ru(1)-S(1)	92.9(7)
Ru-N(3)	2.09(4)	S(1)-Ru(1)-N(5)	97.4(8)
Ru-N(5)	2.07(3)	O(1)-Ru(1)-N(5)	94.0(13)
Ru-O(1)	2.06(3)	N(5)-Ru(1)-N(4)	77.2(10)
Ru-N(2)	2.07(3)	N(4)-Ru(1)-N(3)	94.1(10)
Ru-N(4)	2.07(3)	N(3)-Ru(1)-N(2)	82.5(14)
C(1)-O(2)	1.11(4)	N(2)-Ru(1)-O(1)	90.6(13)
C(1)-O(1)	1.41(4)	O(1)-Ru(1)-N(4)	82.6(9)
		S(1)-Ru(1)-N(3)	91.0(8)
		N(5)-Ru(1)-N(2)	168.1(10)
		O(1)-Ru(1)-N(3)	172.3(12)

N(4)-Ru(1)-S(1) 172.7(8)

Fonte: a autora.

A coordenação octaédrica distorcida é refletida nos ângulos de ligação em torno do Rutênio. Devido a formação de um anel quelato de sete membros, os ângulos das porções S(1)-Ru(1)-N(5), O(1)-Ru(1)-N(5), N(4)-Ru(1)-N(3) são maiores que 90°, enquanto os ângulos das ligações N(5)-Ru(1)-N(4), N(3)-Ru(1)-N(2), O(1)-Ru(1)-N(4) são expressivamente menores que 90°, ocasionado pelo impedimento estérico provocado pela coordenação da metionina. As distâncias para as ligações Ru-N(bpy) não variam consideravelmente, o mesmo ocorre com complexos semelhantes (MAJUMDER; BUTCHER; BHATTACHARYA, 2002). No entanto, comparando o comprimento da ligação Ru-S (2,35 Å) com os demais ligantes que compõem a esfera de coordenação, é possível notar que esta trata-se da ligação com maior comprimento. Isto ocorre devido ao tamanho do raio do Enxofre (1,84 Å) que é maior que o raio tanto do Oxigênio (1,4 Å) quanto do Nitrogênio (0,16 Å). Esse comportamento também é observado para complexos em que a metionina está coordenada pelo átomo de Enxofre (JI et al., 2020). Os comprimentos de ligação para os fragmentos C(1)-O(1) e C(1)-O(2) 1,41 e 1,11 Å, respectivamente, são ligeiramente diferentes como esperado pela diferença na natureza das ligações, uma vez que as ligações simples são mais longas que ligações múltiplas.

5.2.2 Análise elementar

A Tabela 12 relaciona os valores das porcentagens em massa calculado e obtidos experimentalmente para Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio:

Tabela 12 - Resultado de análise elementar para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂.

	C	H	N
Teórico (%)	35,22	3,19	8,21
Experimental (%)	35,29	3,29	8,36
Erro (%)	0,20	3,13	1,83

Fonte: a autora.

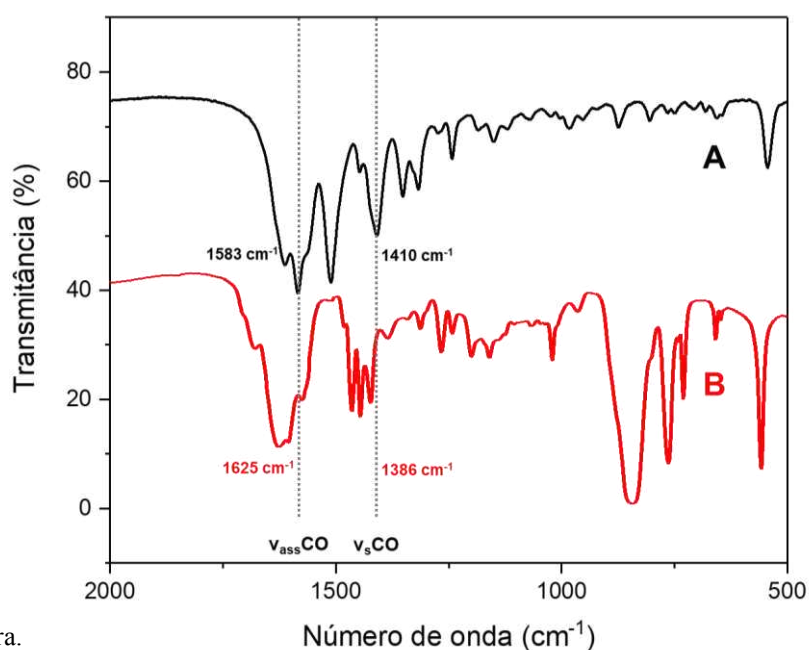
A partir dos dados da análise elementar foi possível inferir que os resultados estão de acordo com a estrutura proposta pela rota sintética. De acordo com esses resultados, é ainda interessante notar que os mesmos são compatíveis com a estrutura obtida pela difração de raios X. O erro percentual relacionado as massas de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio são inferiores a 5%, portanto, considerado aceitáveis.

5.2.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional é bastante utilizada na caracterização de complexos com aminoácidos em decorrência da natureza das ligações formadas por esta classe de compostos. O maior destaque para a discussão está em torno da frequência de estiramento do grupo carboxilato, um dos possíveis sítios de coordenação mais comuns nos aminoácidos, devido a alteração do seu caráter covalente. No aminoácido livre, os estiramentos simétricos ($\nu_s\text{CO}$) e assimétricos ($\nu_{\text{ass}}\text{CO}$) encontram-se numa faixa de 1340-1400 e 1590-1600 cm^{-1} , respectivamente. O íon carboxilato pode se coordenar ao centro metálico através de duas maneiras: monodentada ou bidentada, e a distinção entre essas duas formas pode ser feita através do cálculo da diferença entre os modos vibracionais ($\nu_s\text{CO}$) e ($\nu_{\text{ass}}\text{CO}$), Δcm^{-1} . Essa diferença deve ser calculada tanto para o aminoácido livre quanto para o complexo, sendo que, após a coordenação, o valor de Δcm^{-1} será maior se comparado ao ligante livre (NAKAMOTO, K; MARTELO, E; MORIMOTO, 1961).

A Figura 30 mostra uma ampliação nos espectros na região do infravermelho para a metionina livre (A) e o complexo II (B), na faixa de 2000 a 500 cm^{-1} , para melhor visualização dos estiramentos sensíveis a variação com a formação do complexo.

Figura 30 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para a metionina livre (A) e o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (B) em pastilha de KBr, numa ampliação de 500 a 2000 cm^{-1} .



Fonte: a autora.

Quando o grupo carboxilato se coordena de forma monodentada, há um aumento do caráter covalente deste grupo, tornando-o mais assimétrico. Como resultado, observa-se um

aumento na separação das frequências ($\nu_s\text{CO}$) e ($\nu_{\text{ass}}\text{CO}$). Por outro lado, se o deslocamento das frequências ($\nu_s\text{CO}$) e ($\nu_{\text{ass}}\text{CO}$) forem deslocadas na mesma direção, sugere uma coordenação através dos dois átomos de Oxigênios da carboxila (NAKAMOTO, K; MARTELO, E; MORIMOTO, 1961). O valor de Δcm^{-1} das duas frequências de estiramento foi calculado, obtendo-se os valores de 173 cm^{-1} e 239 cm^{-1} para a metionina livre e complexo, respectivamente. Essa observação condiz com a hipótese de que o aminoácido está coordenado ao centro metálico através do grupo carboxílico de modo monodentado, ou seja, por apenas um dos átomos de Oxigênio. Essa conclusão condiz que a estrutura obtida pela difração de raios X, em que a metionina está coordenada através dos átomos de Oxigênio e Enxofre.

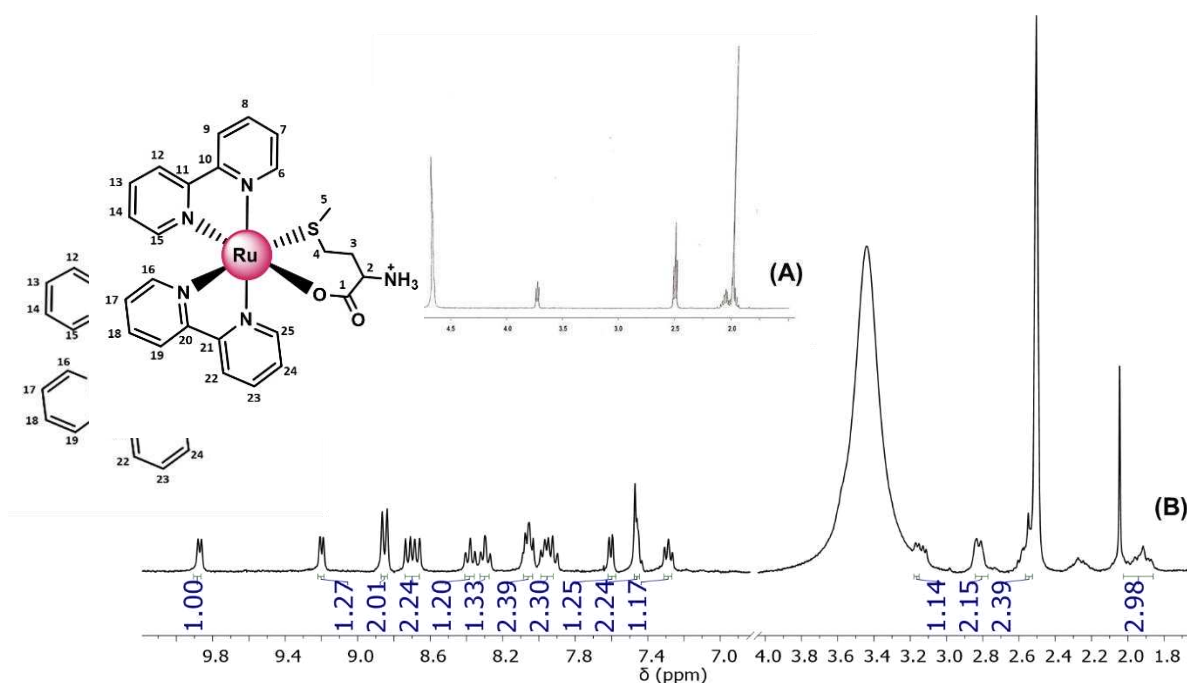
Outra evidência que poderia ser levada em consideração seria a modificação na frequência de estiramento da ligação C-S do grupo $-\text{SCH}_3$. No entanto, essa banda tem baixa intensidade e aparece numa região de 600 a 700 cm^{-1} . Por esses motivos, não foi possível atribuí-la com clareza no espectro da metionina livre e muito menos no espectro do complexo formado devido a outros modos vibracionais que absorvem na mesma região (MCAULIFFE, A; QUAGLIANO, V; VALLARINO, 1966). Em vez disso, notou-se o deslocamento da banda correspondente à deformação angular do grupo metila da metionina ($-\text{SCH}_3$), que no aminoácido livre ocorre em 1347 cm^{-1} e no complexo é deslocada para a região de 1400 cm^{-1} . Supõe-se que este deslocamento seja em decorrência da proximidade do Enxofre ao grupo metila.

Ainda no espectro do complexo, é possível destacar bandas na região de 3400 cm^{-1} , atribuídas a deformação axial ($\delta\text{N-H}$) do grupo amino (PAVIA, 2010) e as bandas de forte intensidade em 843 e 552 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos do contra íon (PF_6^-) dando suporte à carga presente no complexo.

5.2.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

A obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a caracterização deste complexo é de extrema importância, pois considerando a sua estrutura, espera-se sinais em duas regiões distintas do espectro. Isso ocorre devido aos diferentes tipos de prótons e carbonos, os da metionina e das biperidinas. Os primeiros devem ser observados na região de alifáticos, enquanto os segundos, ocorrem na região de aromáticos. Para fins comparativos, foram registrados os espectros de RMN ^1H para a metionina livre e o complexo II, os quais são mostrados na Figura 31 (A) e (B), respectivamente.

Figura 31 - Espectros ^1H RMN da metionina livre (A) e do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$ (B) em DMSO deuterado.



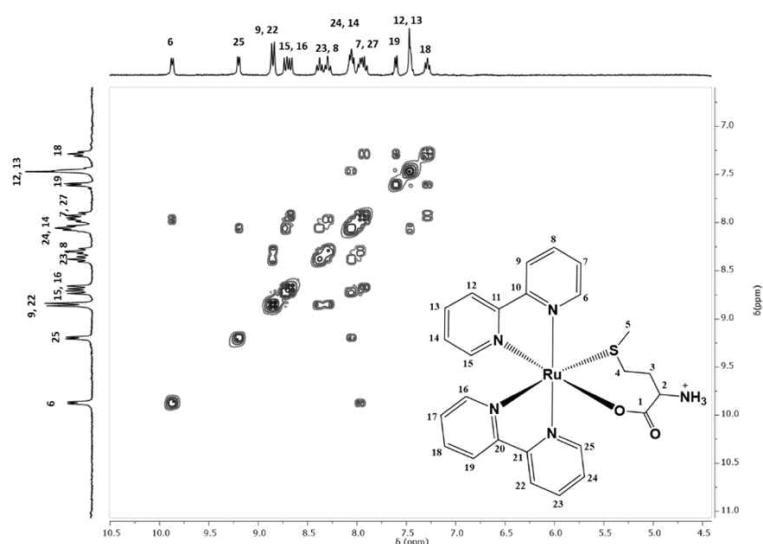
Fonte: a autora.

No espectro (A) da Figura 31, é possível observar quatro sinais referentes aos oito hidrogênios da metionina na região alifática. De acordo com a literatura (CAUBET et al., 1992), a metionina livre apresenta 4 sinais na região de 2,13 a 3,86 ppm, sendo 1 singlete referente - CH_3 próximo ao Enxofre, 1 tripleto atribuído ao $-\text{CH}_2$ (próximo ao Enxofre), 1 multiplete atribuído ao outro grupo $-\text{CH}_2$ e mais um tripleto atribuído ao $-\text{CH}$, onde está ligado o grupo amino. Após a aquisição do espectro para o complexo II, mostrado na Figura 31 (B), nota-se a presença de sinais de prótons em duas regiões distintas. Primeiramente, na região de hidrogênios alifáticos, onde são atribuídos os hidrogênios da metionina coordenada. Embora os sinais não sejam bem definidos, é possível perceber uma correlação com o espectro do ligante livre. Estes sinais ocorrem na faixa de 1,92 a 3,14 ppm, semelhante aos prótons da metionina coordenada para uma série de complexos de Rutênio: $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L-met})](\text{NO}_3)$, $[(\text{bpy})_2\text{Ru}(\text{L-met})]\text{Cl}$ e $[\text{Ru}(\text{L-met})(\text{NO})(\text{PPh}_3)\text{Cl}]\text{Cl}$, onde os hidrogênios da metionina coordenada aparecem numa faixa de 1,97 a 3,51 ppm (JI et al., 2020). Baseando-se neste fato e na semelhança do perfil destes sinais com os do aminoácido livre, sugere-se que a metionina está coordenada e que não há excesso de ligante livre.

Os sinais relativos aos prótons das duas bipyridinas encontram-se na região de aromáticos, com a integração indicando a presença de 16 hidrogênios, coerente com a

conformação *cis* do complexo. De modo semelhante ao complexo anterior, estes sinais foram atribuídos analisando o espectro bidimensional (COSY), apresentado na Figura 32. As tentativas de atribuições são mostradas na Tabela 13.

Figura 32 - Espectro de ^1H RMN bidimensional COSY para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$ em DMSO deuterado.



Fonte: a autora.

Tabela 13 - Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H do complexo complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$.

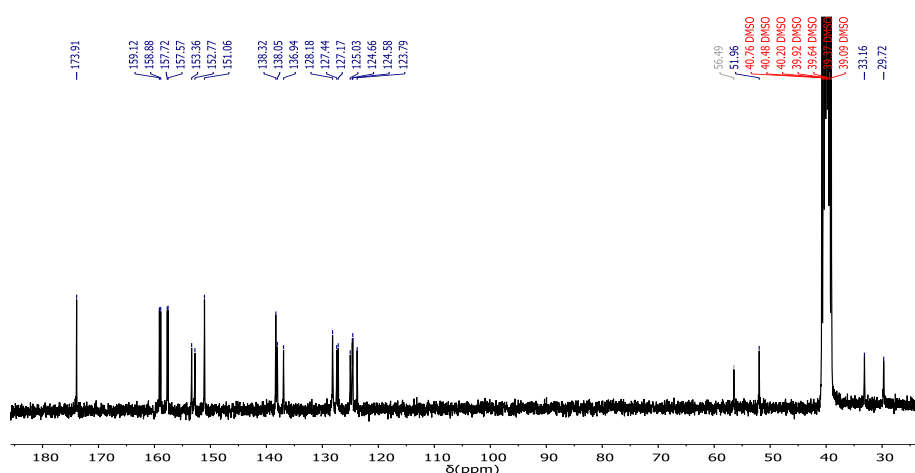
H	δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	δ (ppm)
1	-	10	7,25	19	7,60
2	-	11	7,38	20	7,90
3	-	12	7,47	21	7,16
4	-	13	7,47	22	8,85
5	-	14	8,05	23	8,38
6	9,87	15	8,67	24	8,05
7	7,95	16	8,72	25	9,21
8	8,30	17	7,95	-	-
9	8,85	18	7,28	-	-

Fonte: a autora.

No espectro ^{13}C RMN mostrado na Figura 33, é possível observar os cinco sinais do aminoácido numa faixa de 29,72 a 56,49 ppm e em 173,91 ppm, sendo este último referente à carbonila da metionina. Comparando com o ligante livre, percebe-se que apenas o sinal

referente à metila sofre um deslocamento considerável de 14,80 para 29,72 ppm. Tal comportamento sustenta a evidência de que o aminoácido esteja coordenado através do átomo de Enxofre como ocorre nos complexos [PtMetCl₂] e [PdMetCl₂] em que a metionina coordena-se através dos átomos de Enxofre e Nitrogênio (KRYLOVA; KOVTUNOVA; ROMANENKO, 2008). Os sinais para os 21 carbonos das bipyridinas completam a proposta da estrutura do complexo.

Figura 33 - Espectro de ressonância magnética de ¹³C do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ em DMSO.



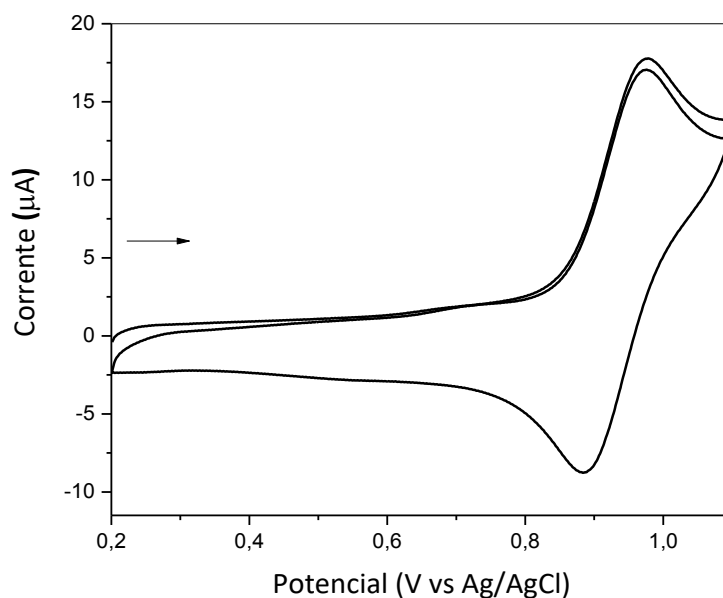
Fonte: a autora.

5.2.5 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas para o complexo II foram obtidas por voltametria cíclica (Figura 34). O experimento foi realizado em meio aquoso, utilizando uma solução 0,10 mol L⁻¹ de NaTFA pH = 2,5 como eletrólito suporte. A varredura mostra a presença de apenas um par de processos, sendo um potencial de pico anódico (E_{pa}) em 0,97 V, referente ao processo de oxidação $Ru^{2+} \rightarrow Ru^{3+} + e^-$ e um potencial de pico catódico (E_{pc}) em 0,88 V, referente ao processo de redução: $Ru^{3+} + e^- \rightarrow Ru^{2+}$. O potencial de meia onda ($E_{1/2}$) para esse processo redox é igual a 0,92 V, sendo considerado *quasi-reversível*, uma vez que $\Delta E_p = 0,09$ V e $i_{pc}/i_{pa} = 2,00$. O deslocamento do potencial em relação ao precursor é esperado, visto que, ocorre a substituição de dois cloretos pelo aminoácido. Esse deslocamento em relação ao precursor pode ser explicado devido ao fraco caráter doador de densidade eletrônica dos átomos de enxofre e oxigênio, quando comparado aos íons cloreto, que são bons doadores σ e π . Deste modo, após a coordenação da metionina, o centro metálico estaria mais deficiente de elétrons, elevando os

valores de potencial de oxidação. Adicionalmente, o enxofre apresenta orbitais d vazios que podem receber densidade do metal, por retrodoação.

Figura 34 - Voltamograma cíclico do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ em solução de NaTFA 0,10 mol L⁻¹, pH = 2,5 a 100 mV s⁻¹.

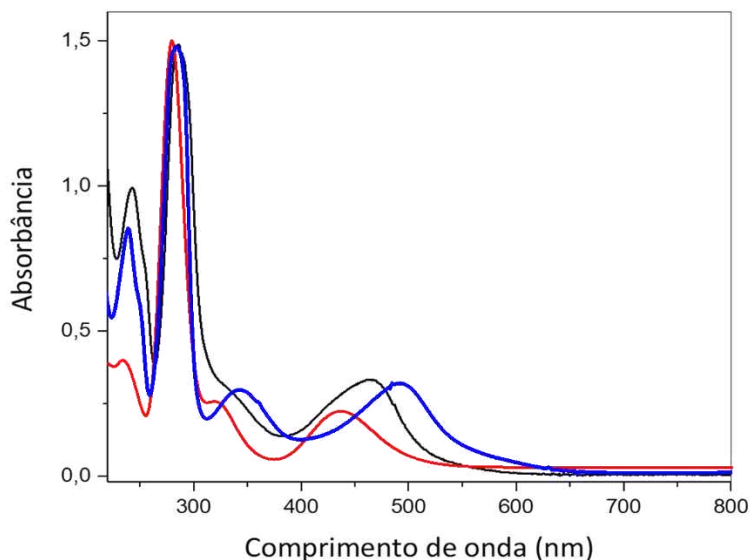


Fonte: a autora.

5.2.6 Espectroscopia eletrônica

A técnica de absorção na região do ultravioleta e visível foi utilizada a fim de adquirir informações associadas as transições eletrônicas do complexo II. Foram obtidos os espectros eletrônicos para o precursor *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl₂)] e complexo II, sendo este experimental e calculado, os quais são apresentados na Figura 35. Como resultado, no espectro experimental são observadas quatro bandas em: 244, 290, 335 e 467 nm. Se comparado ao precursor *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl₂)], o complexo II apresenta um perfil de bandas semelhante, no entanto, observa-se um deslocamento das bandas na região de 335 e 467 nm para regiões de maior energia.

Figura 35 - Espectros eletrônicos calculado (em vermelho), experimental (em preto) para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ em água a uma concentração de $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e espectro eletrônico (em azul) do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl₂)] em água a uma concentração de $3,68 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.



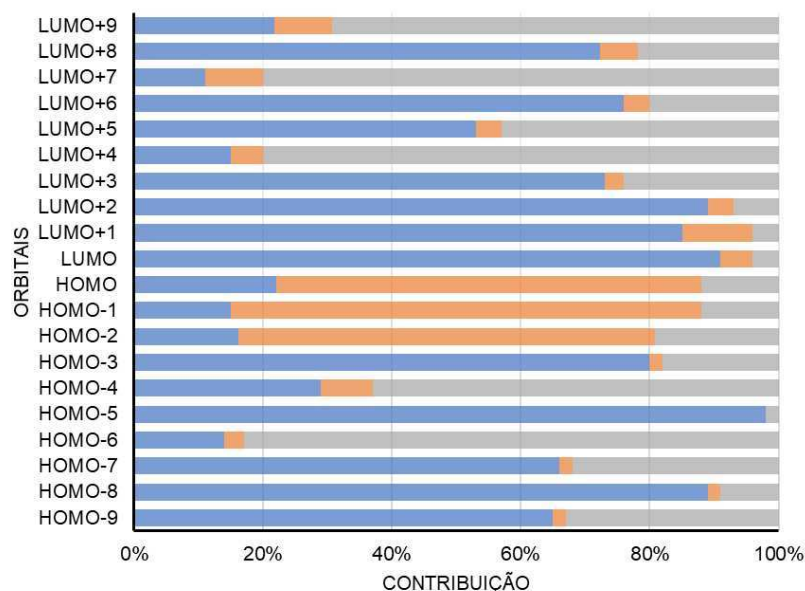
Fonte: a autora.

De acordo com (MEYER; SULLIVAN; SALMON, 1978), o precursor *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl₂)] apresenta em seu espectro quatro bandas atribuídas a cinco principais absorções. Na região de 244 a 289 nm, as bandas são atribuídas as transições intraligantes da bipyridina. A banda em 347 nm, é considerada como uma sobreposição das transições intraligantes e de transferência de carga do Rutênio para as bipyridinas. Em 494 nm, a absorção também é atribuída como uma transferência de carga.

Os perfis dos espectros obtidos tanto experimentalmente como a partir do cálculo teórico, apresentaram semelhanças ao do precursor. Deste modo, as contribuições obtidas por simulação também foram auxiliares na interpretação dos dados, as mesmas encontram-se listadas na Figura 36. A banda situada em 244 nm tem maior contribuição da transição H-3 → L+2 (46%), uma vez que os orbitais H-3 e L+2 tem maior caráter do ligante bipyridina, essa banda é atribuída como IL. A transição em 290 nm tem contribuições dos orbitais H-4 → L+1 (48%) e H-3 → L+1 (29%), sendo a primeira atribuída a uma transição LLCT e a segunda IL, caracterizando assim uma banda com caráter misto. A banda em 335 nm é composta pelas transições H-2 → L+2 (47%) e H-1 → L+7 (16%), em que os orbitais H-2 e H-1 possuem maior contribuição do centro metálico, deste modo é atribuída como MLCT e a banda em 467 nm tem como principal transição HOMO → LUMO (90%), sendo também caracterizada como MLCT. Na Tabela 14 são apresentadas as tentativas de atribuições das bandas nos espectros eletrônicos,

bem como os seus respectivos valores de coeficiente de absorvidade molar, calculados pela Lei de Lambert-Beer.

Figura 36 - Composição dos orbitais moleculares do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ em função dos fragmentos: Ru (em laranja), bpy (em azul) e Met (em cinza).



Fonte: a autora.

Tabela 14 - Dados de UV-Vis para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ em água.

Complexo	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	Atribuições
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂	244	4,36 x 10 ³	$\pi^* \leftarrow \pi(\text{bpy})$
	290	9,65 x 10 ³	$\pi^* \leftarrow \pi(\text{bpy})$ $\pi^* \leftarrow \pi(\text{Met})$
	335	1,09 x 10 ³	$\pi^*(\text{bpy}) \leftarrow d\pi(\text{Ru})$ $\pi^*(\text{bpy}) \leftarrow d\pi(\text{Ru})$
	467	1,24 x 10 ³	$\pi^*(\text{bpy}) \leftarrow d\pi(\text{Ru})$

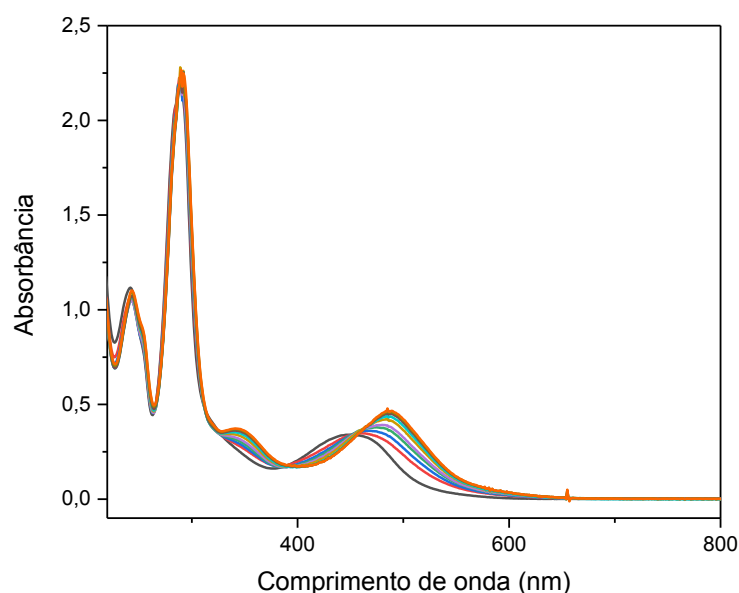
Fonte: a autora.

5.3 Estudo Fotoquímico

Devido às propriedades fotofísicas vantajosas dos complexos polipiridínicos de Ru (II), existe um interesse contínuo na aplicação desses compostos como agentes terapêuticos. No entanto, complexos deste tipo, contendo o aminoácido metionina como ligante, não tiveram suas reações fotoinduzidas estudadas. Deste modo, o estudo fotoquímico foi iniciado com a irradiação da solução aquosa do complexo II com luz azul e verde, $\lambda_{\text{irradiação}} = 453$ e 505 nm. Os espectros eletrônicos registrados durante a irradiação são apresentados na Figura 37, onde é

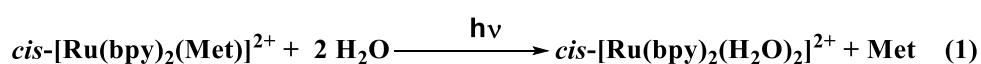
possível observar variação nas bandas atribuídas às transferências de carga do metal para o ligante ($\text{Ru}^{\text{II}} \rightarrow \text{bpy}$). Essas bandas, em 335 e 467 nm são deslocadas para a região de menor energia, em 340 e 483 nm.

Figura 37 - Espectros eletrônicos para a irradiação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$ com luz $\lambda_{\text{irradiação}} = 505 \text{ nm}$, em solução aquosa durante 100 minutos.



Fonte: a autora.

O perfil dos espectros da solução irradiada sugere que ocorre a fotoliberação da metionina e a formação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ de acordo com a reação:

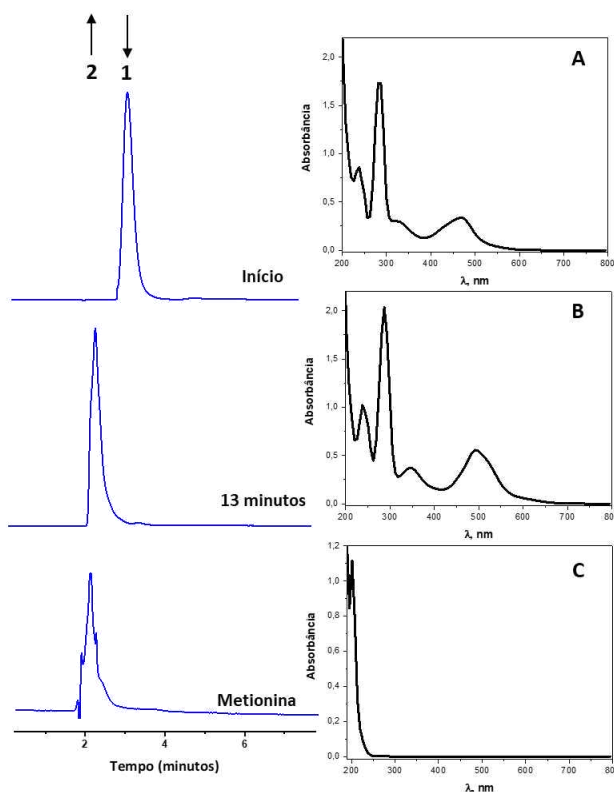


Essa reação fotoquímica apresentou valores de rendimento quântico ($\Phi \text{ Met}$) de: $0,350 \pm 0,005$ e $0,260 \pm 0,005$ para os comprimentos de onda de 453 e 505 nm, respectivamente. Estes valores mostram que a liberação do ligante metionina foi mais eficiente que a liberação do ligante CO (descrita anteriormente para o complexo I), pois neste caso os comprimentos de onda necessários para a reação fotoquímica são maiores. Outro fato importante a se mencionar é que estabilidade do complexo II no escuro o torna mais seletivo, uma vez que a formação do complexo diaqua, que se trata de uma espécie biologicamente ativa, ocorre somente mediante irradiação. Neste sentido, a metionina atua como um grupo protetor ou carreador de droga.

A fotólise também foi acompanhada por CLAE para uma melhor atribuição do produto formado. O experimento foi realizado com uma solução 0,240 mM do complexo no

solvente utilizado como fase móvel, metanol/água (contendo HTFA 0,1%) 45/55% pH = 3,5. Os cromatogramas obtidos antes e após irradiação em 453 nm são mostrados na Figura 38.

Figura 38 - Acompanhamento da reação de fotossustituição do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ por CLAE, com irradiação em 453 nm. Os cromatogramas (em azul) foram monitorados a 250 nm, fase móvel = metanol/água (contendo HTFA 0,1%) 45/55%, pH = 3,5, fluxo = 1,0 mL min⁻¹. Os espectros eletrônicos (em preto) foram obtidos a partir do detector cromatógrafo.



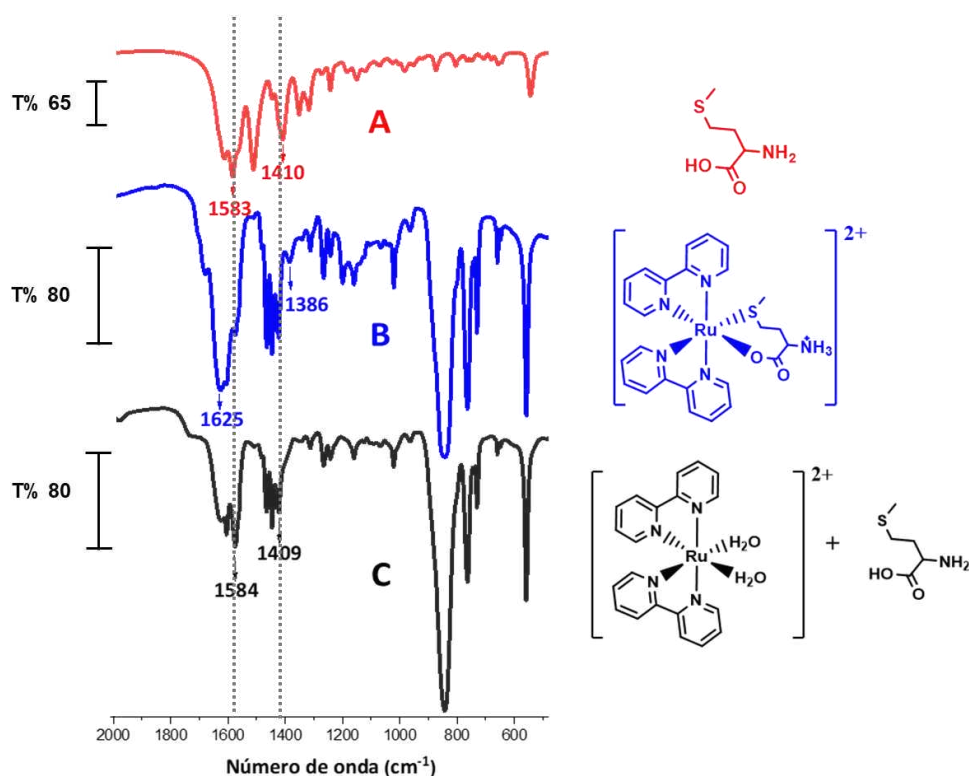
Fonte: a autora.

Antes da irradiação, há a presença de apenas um pico (1) com tempo de retenção igual a 3,2 minutos. Através do espectro eletrônico (A), nota-se que este pico refere-se ao complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂, bem como evidencia a pureza na obtenção do mesmo. Após 13 minutos de irradiação, a solução do complexo foi novamente injetada no cromatógrafo. Como resultado, foi observado o desaparecimento do pico (1) e o surgimento de outro (2) com tempo de retenção em 2,3 minutos, o qual foi designado como o complexo diaqua formado pela liberação do aminoácido, espectro (B). A confirmação do produto da fotólise foi baseada na injeção da amostra autêntica e no estudo usando CLAE para a identificação dos complexos *cis* e *trans*-[Ru(bpy)₂(H₂O)₂]²⁺ usando condições experimentais semelhantes (SAUAIA et al., 2003).

Com a liberação da metionina, esperava-se o surgimento de um pico correspondente ao aminoácido livre, no entanto, este não foi observado. Então, após a injeção do complexo irradiado, foi feita uma injeção da metionina livre, espectro (C). É importante ressaltar que todas as condições experimentais foram mantidas. O pico referente à metionina livre coincide com o do diaqua complexo, motivo pelo qual não foi observada no experimento anterior.

Para dar suporte a este resultado, foi realizado um experimento simples usando a técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho. A solução do complexo em estudo foi irradiada em 453 nm durante 20 minutos, para a formação total do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(H₂O)₂]²⁺. Após esse período, a solução irradiada foi submetida à evaporação até *secura*. O espectro de infravermelho desta amostra foi registrado e comparado aos espectros da metionina livre e coordenada. O resultado é apresentado na Figura 39.

Figura 39 - Espectro vibracionais na região do infravermelho para metionina livre (A), o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (B) e o produto da fotólise isolado (C) após irradiação em 453 nm em pastilha de KBr, em uma ampliação da 480 a 2000 cm⁻¹.



Fonte: a autora.

Sabendo que o aminoácido coordenado pelo grupo carboxila apresenta valores de ($\nu_s\text{CO}$) e ($\nu_{\text{ass}}\text{CO}$) diferentes em comparação aos apresentados para o mesmo grupamento do aminoácido livre (como já discutido anteriormente), esperava-se que após irradiação da solução

do complexo houvesse novamente o deslocamento destes picos ao se liberar o ligante. Assim, o espectro (C) mostra que após a irradiação, os estiramentos foram deslocados para 1584 e 1409 cm^{-1} . Estes valores seguem o mesmo padrão para a metionina livre, sugerindo assim, que houve realmente reação fotoquímica induzindo a fotoliberação do aminoácido.

5.4 Estudo de interação e fotoclivagem com DNA

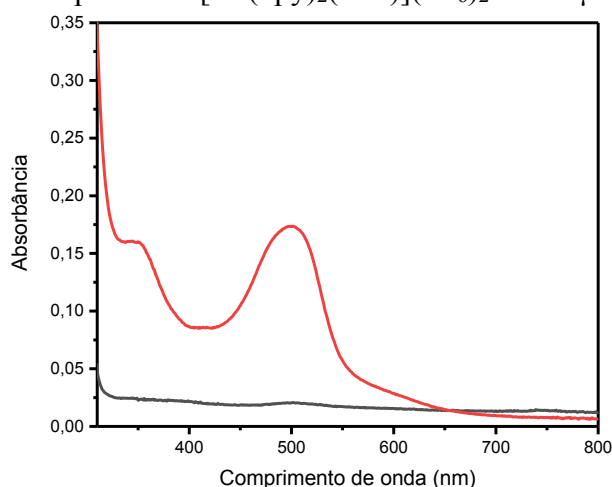
5.4.1 Ensaio de isolamento do complexo-DNA por coluna de exclusão

Para este ensaio, utilizou-se a técnica de exclusão em gel (filtração em gel), sendo a fase estacionária um gel de poliacrilamida. Na separação, as moléculas pequenas penetram nos poros da fase estacionária e as moléculas grandes são excluídas. O DNA tem um tamanho bastante expressivo em relação ao complexo, de modo que, em uma filtração de uma solução contendo os dois, o DNA seria facilmente excluído, enquanto o complexo ficaria retido na coluna. No entanto, se houver interação entre o complexo e o DNA, os dois serão excluídos. Essa constatação pode ser feita através do registro de um espectro eletrônico. Assim, se o complexo interagir com o DNA, suas bandas serão observadas no espectro (STRIEGEL et al., 2009).

Para a realização do experimento, foram preparadas uma solução-estoque do complexo II (1,25 mM) e do DNA de esperma de salmão (1,0 mM) em DMSO/H₂O 3%, a partir destas, foram consideradas duas amostras contendo as concentrações finais: A (500 μM do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ + luz) e B (500 μM do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ + 500 μM de DNA + luz).

As amostras foram irradiadas com luz em 453 nm durante 1 h, após esse período foram incubadas por 24 h a 23°C. Uma alíquota de 50 μL de cada amostra foi aplicada na coluna e teve o seu eluato coletado para posterior diluição em água. Os espectros eletrônicos obtidos são apresentados na Figura 40.

Figura 40 - Espectros eletrônicos para o ensaio de interação com DNA após filtração na coluna de exclusão. Em preto a amostra (500 μM do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$ + luz) e em vermelho (500 μM do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$ + 500 μM de DNA + luz).



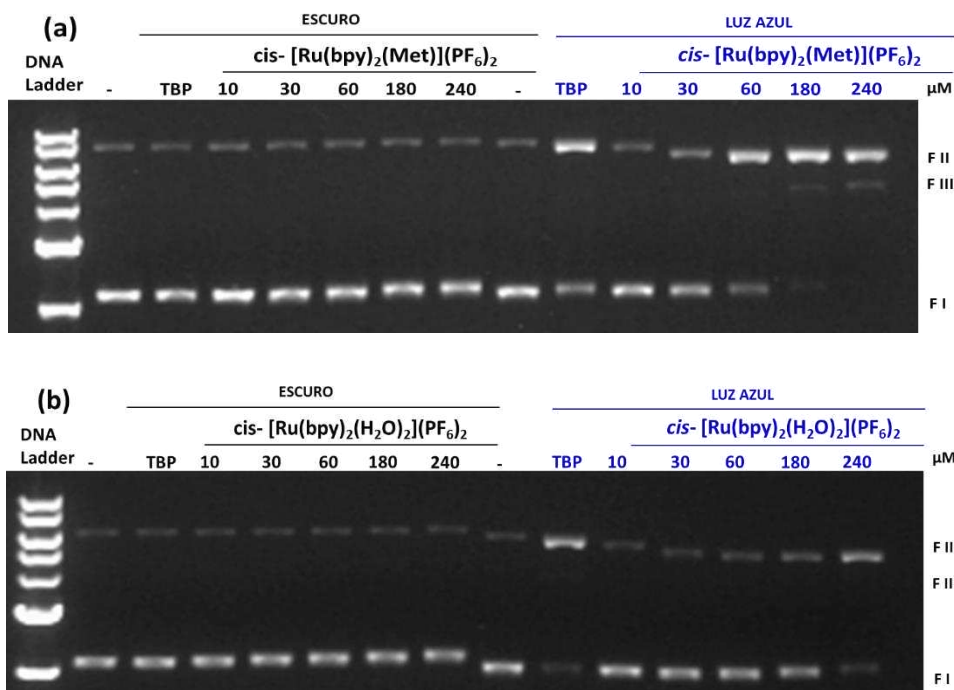
Fonte: a autora.

Como pode ser visto, o espectro (linha preta) corresponde somente à solução irradiada do complexo na ausência do DNA. Não foram observadas bandas proeminentes, o que nos leva a crer que o complexo ficou retido nos poros da fase estacionária devido ao seu pequeno tamanho. Já no espectro (linha vermelha), com a presença da macromolécula, evidenciam-se duas bandas na região de 350 a 500 nm, características das bandas que surgem com a irradiação do complexo II. O resultado sugere que houve interação entre o DNA e o complexo após irradiação, pois o mesmo foi capaz de arrastar o complexo, sendo possível detectar suas propriedades espectroscópicas.

5.4.2 Ensaio de clivagem de DNA

O ensaio de clivagem de DNA foi realizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose, frente ao DNA superenovelado plasmidial pBR322. As diferentes formas do DNA plasmidial possuem mobilidade eletroforética diferentes, com isso é possível separar e analisar os fragmentos no gel. Para ter um parâmetro dos tamanhos de fita e identificar as formas do DNA (FI, FII e FIII), adiciona-se o DNA *ladder* em um poço. Assim, a distância percorrida pelo fragmento é comparada a outro de tamanhos conhecidos (SCHATZCHNEIDER; METZLER-NOLTE, 2009). O experimento foi realizado com a mistura da solução do DNA plasmidial com diferentes concentrações do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Met})](\text{PF}_6)_2$, na ausência e presença de luz, com irradiação em 453 nm durante 1 h. A imagem do gel é apresentada na Figura 41A. Para fins comparativos, o ensaio também foi realizado para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (Figura 41B) nas mesmas condições experimentais.

Figura 41 - Eletroforese em gel de agarose dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ (A) e *cis*-[Ru(bpy)₂(H₂O)₂](PF₆)₂ (B) na ausência de luz e após irradiação por 1 h com luz azul.



Fonte: a autora.

As misturas do DNA plasmidial e dos complexos nas concentrações de: 10, 30, 60, 180 e 240 μM foram divididas em duas séries. Uma delas, permaneceu incubada no escuro por 1h, enquanto a outra foi irradiada. O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (TBP) foi usado como controle. Na ausência de luz, é possível observar que não houve quase nenhuma alteração na mobilidade da fita referente a FI, indicando que não houve clivagem de DNA. O mesmo comportamento é observado para o complexo diaqua.

Após a irradiação do complexo II é possível observar que, a partir da concentração de 30 μM , ocorre o surgimento da banda referente a FII (forma clivada em uma única fita) e diminuição da intensidade da FI. Este comportamento confirma que houve a clivagem do DNA influenciado pela fotorreação. Vale ressaltar que, com aumento da concentração do complexo, esse efeito é acentuado e há formação da banda referente a FIII (forma com dupla clivagem) a 180 e 240 μM . Para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(H₂O)₂]²⁺ irradiado também observou-se um padrão de bandas condizente com a clivagem do DNA a partir de 30 μM , com a formação da FII. No entanto, não há o desaparecimento total das bandas referentes a FI. Neste caso, não foi observada a formação da banda FIII nem mesmo para as concentrações mais elevadas.

Para a série de complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]\text{ClO}_4$, onde L= glicina, alanina, fenilalanina, tirosina e leucina, foi realizado o experimento em gel de agarose utilizando o mesmo DNA plasmidial (pBR322) e irradiação. Como resultado, não foi observada a formação de nenhuma banda referente as formas FII e FIII, ou seja, ao se ligar ao complexo, o plasmídeo pBR322 mantém as características conformacionais do DNA intactas (MAJUMDER; BUTCHER; BHATTACHARYA, 2002) e ao comparar o comportamento do complexo II e o produto da fotólise, o complexo diaqua, nota-se que este último não é capaz de promover clivagem do DNA sem irradiação. Isso sugere que, tanto a metionina, quanto os processos fotoquímicos que ocorrem após sua liberação são requeridos para a clivagem do DNA.

5.5 Atividade antimicrobiana

O estudo da atividade antimicrobiana para o complexo foi realizado na ausência e presença de luz. Os valores das concentrações inibitórias (MIC) e bactericidas mínimas (MBC) foram determinados frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 15.

De imediato, pode-se observar que o complexo apresentou melhor atividade frente às bactérias Gram-positivas. Mesmo não apresentando qualquer atividade contra a *P. aeruginosa*, mostrou alguma atividade inibitória contra *E. coli*. No entanto, a concentração requerida para inibir o crescimento desses microorganismos pode ser considerada elevada, tornando inviável a utilização do composto no caso das bactérias Gram-negativas. Esse fato corrobora com estudos mostrando que complexos de Rutênio no estado de oxidação 2+ são mais ativos frente a bactérias Gram-positivas (LAM et al., 2014; SMITH et al., 2016), sendo explicado pela diferente composição e estrutura das membranas externas dessas bactérias. Como característica específica das bactérias Gram-negativas observa-se uma parede celular que, em conjunto com a membrana citoplasmática forma o “envelope” celular dessas bactérias, o que dificulta a permeabilidade de agentes antimicrobianos sendo esse o mecanismo responsável pela resistência à vários medicamentos para essa classe de bactérias (SNYDER; MCINTOSH, 2000).

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂ frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

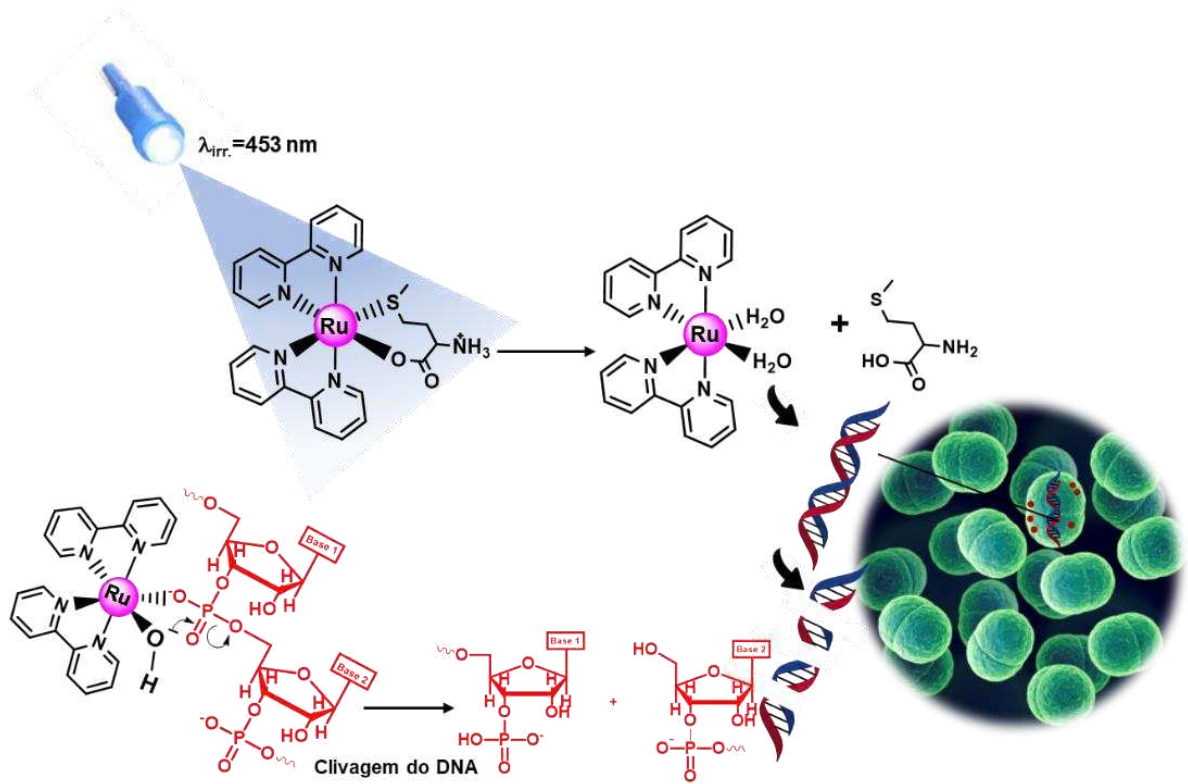
Luz		Microorganismos			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
SIM	MIC	62,5 (73,3)	125 (146,6)	-	500 (586,4)
	MBC	62,5 (73,3)	125 (146,6)	-	-
NÃO	MIC	125 (146,6)	250 (293,2)	-	500 (586,4)
	MBC	125 (146,6)	250 (293,2)	-	-

MIC e MBC são expressos em µg/mL (µM), (-) Atividade não detectada para concentrações maiores que 500 µg/mL.

Fonte: a autora.

Para a obtenção dos resultados com luz foi feita irradiação do complexo II na presença dos microorganismos com luz azul ($\lambda_{irr.}=453$ nm) durante 1 h. Ao comparar os resultados, percebe-se que quando o complexo II foi irradiado, apresentou menores valores de MIC e MBC. Isso mostra uma melhor eficácia na atividade do complexo após irradiação, visto que requer uma concentração menor para inibir o crescimento e matar as bactérias. Os resultados obtidos com os estudos de interação e clivagem de DNA podem ser correlacionados com a atividade antimicrobiana, uma vez que foram observados melhores resultados com a presença de luz nestes experimentos. Um possível mecanismo para a atividade do complexo é mostrado na Figura 42. Uma vez que a clivagem hidrolítica é facilitada pela presença de íons metálicos atuando como ácidos de Lewis e que após a irradiação é formado o complexo diaqua, propõe-se que este se ligue covalentemente ao DNA. A água ou o hidróxido atua como nucleófilo no ataque ao grupo fosfato, seguido da cisão do fio.

Figura 42 - Mecanismo proposto para a atividade antimicrobiana do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂.

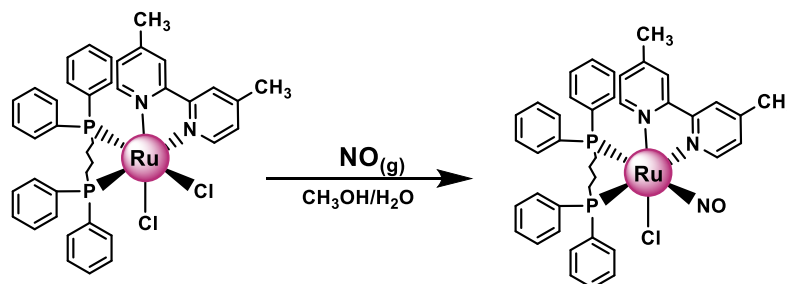


Fonte: a autora.

6 PARTE III – RESULTADOS E DISCUSSÃO PARA O COMPLEXO *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂ (III)

6.1 Síntese do complexo (III)

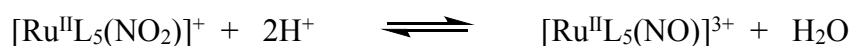
Esquema 3 – Síntese do complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂.



Fonte: a autora.

A obtenção de nitrosilo complexos de Rutênio segue basicamente duas possibilidades de rotas sintéticas:

- Através do borbulhamento de NO gasoso em uma solução contendo o complexo precursor. Se o metal estiver no seu estado de oxidação 3+, o ligante nitrosil, ao se coordenar, irá reduzir o estado de oxidação do metal e formar o fragmento estável (Ru^{II}-NO⁺) (CHENEY; ARMOR, 1977). Para realizar essa síntese, usa-se o sistema para borbulhamento de NO especificado no item 3.4.5;
- Acidificação de uma solução do nitro complexo, ou seja, do precursor contendo o ligante nitrito (NO₂⁻) coordenado ao centro metálico (GODWIN; MEYER, 1971). A reação depende do pH e é reversível, deste modo, trata-se de um equilíbrio ácido-base:



A síntese do complexo III foi publicada no ano de 2018 por Silva e Colaboradores (SILVA et al., 2018). Neste artigo, a obtenção do nitrosilo complexo foi feita pelo segundo método descrito acima, ou seja, interconversão nitrosil-nitro. Além da síntese, a caracterização e estudo de viabilidade das células cancerígenas HCT-9 e A549 foram relatados.

Neste trabalho, uma nova rota sintética foi proposta para o complexo III. A obtenção do nitrosilo complexo foi feita através do borbulhamento de NO gasoso a uma solução do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)], representada no esquema 3. Como resultado da mudança da rota sintética, foi observado um valor de rendimento mais elevado quando comparado ao método da interconversão nitrosil-nitro. Além disso, neste trabalho foi realizado

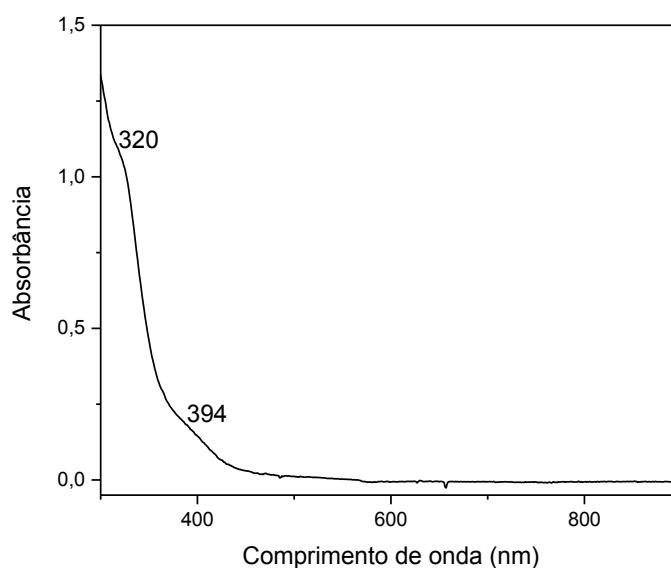
o estudo fotoquímico, geração de oxigênio singleto, clivagem de DNA e atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos levaram a uma interessante comparação entre a atividade do complexo III e seu precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)], sendo possível propor um mecanismo para a ação antimicrobiana do nitrosilo complexo.

6.2 Estudo Fotoquímico

Inicialmente, é necessário apresentar o espectro eletrônico de uma solução do complexo III, uma vez que o estudo fotoquímico foi realizado, primeiramente, através do acompanhamento espectrofotométrico de uma solução do complexo em estudo. Além disso, é importante abordar as atribuições das bandas presentes no espectro para entender como a interação do complexo com luz pode alterar sua estrutura.

O espectro eletrônico do complexo III em metanol é apresentado na Figura 43. Observa-se a presença de duas bandas, uma em 320 nm atribuída a transição $\pi^* \leftarrow \pi$ do ligante bipyridínico e em 394 nm referente a transferência de carga metal ligante do grupo nitrosilo. Outra característica notável é a região de absorção dessas bandas, que ocorrem em menores comprimentos de onda. A presença dessas bandas na região do ultravioleta são devido ao forte caráter acceptor do NO, que estabiliza os orbitais moleculares do metal (SERLI et al., 2003). A escolha do comprimento de onda para a irradiação foi feita com base na absorção de 394 nm, deste modo a irradiação foi realizada com luz azul.

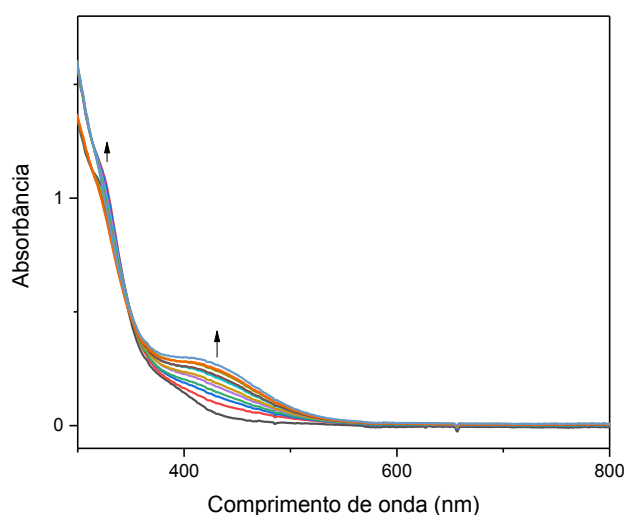
Figura 43 - Espectro eletrônico para o complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF₆)₂ em metanol a uma concentração de $2,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.



Fonte: a autora.

A Figura 44 mostra os espectros obtidos com a irradiação da solução do complexo III em metanol, onde é possível observar o aumento da intensidade da banda em 320 nm, a diminuição da banda em 394 nm e o surgimento de uma nova banda em 430 nm. Sabendo que a banda em 394 nm é atribuída como transferência de carga $\pi^*(\text{NO}^+) \leftarrow d\pi(\text{Ru})$, supõe-se que a irradiação libere o NO da esfera de coordenação. Segundo os autores (ROSE, J. M; MASCHARAK, 2008), a liberação fotoquímica de NO pode ocorrer via dois mecanismos. No primeiro, os produtos da reação são NO e a espécie $[\text{Ru}^{3+}\text{-solvente}]$, enquanto no segundo mecanismo são formados NO e $[\text{Ru}^{2+}\text{-solvente}]$. Os estudos concluem também que o primeiro mecanismo é predominante em nitrosilo complexos de Rutênio que apresentam amina, carboxamida, tiolato e fenolato como ligantes. Já o segundo, é favorecido em complexos contendo ligantes polipiridínicos e base de Schiff. Neste caso, após a fotólise, a espécie Ru^{2+} retornaria da redução espontânea da espécie Ru^{3+} brevemente formada. Para o complexo III, supõe-se o segundo mecanismo, baseando-se na semelhança do metal e ligante polipiridínico presente na esfera de coordenação. A formação da espécie $[\text{Ru}^{2+}\text{-solvente}]$ a partir do Ru^{3+} e NO liberado é bem descrita para o complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{bipy})_2]^{2+}$ (CALLAHAN; MEYER, 1977).

Figura 44 - Espectros eletrônicos para a irradiação do complexo *ct*- $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2$ em metanol, a uma concentração de $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com luz $\lambda_{\text{irradiação}} = 453 \text{ nm}$ durante 50 minutos.

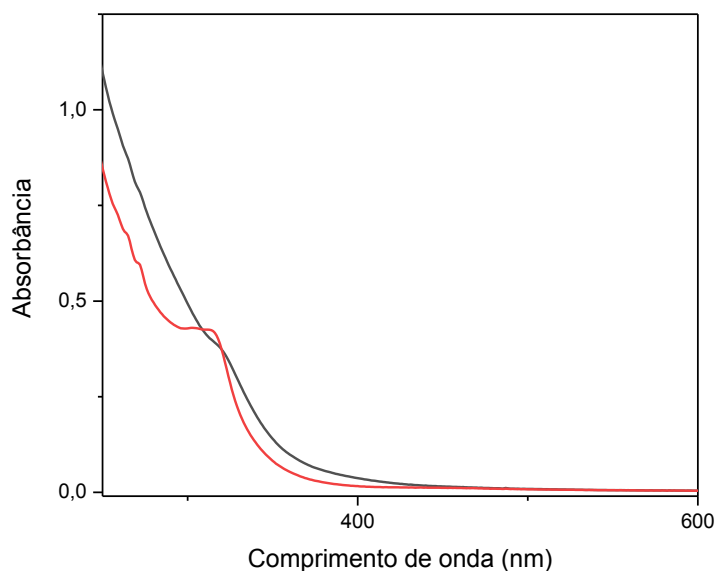


Fonte: a autora.

O complexo III foi submetido a um teste de estabilidade no escuro, onde constatou-se que em uma solução DMSO/ H_2O , o mesmo permanece inalterado por até 1h. Já para um período maior de 24h, esta estabilidade é afetada. Este estudo foi realizado através da análise

do espectro eletrônico do complexo, mostrado na Figura 45. Essa modificação no espectro sugere a liberação térmica do NO.

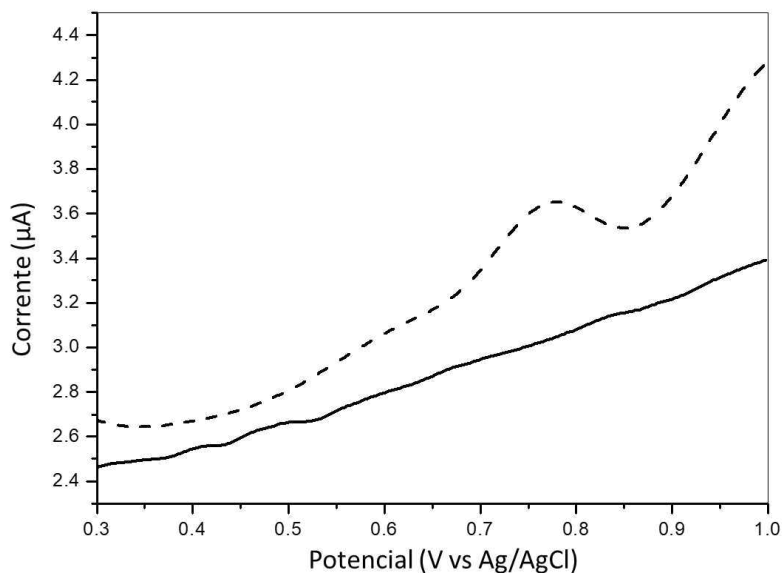
Figura 45 - Espectros eletrônicos do complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF₆)₂ em solução DMSO/H₂O 4%, no tempo inicial (em preto) e após 24h no escuro (em vermelho).



Fonte: a autora.

A liberação de NO como um dos produtos da reação fotoquímica foi evidenciada através de um experimento eletroquímico, a voltametria de pulso diferencial (Figura 46). O sistema utilizado foi o convencional de três eletrodos: um eletrodo de trabalho (carbono vítreo), um de referência (Ag/AgCl) e um contra eletrodo de platina, em uma solução de NaTFA 0,1 mol L⁻¹ pH = 3,0. Inicialmente, foi feita uma varredura anódica na região de 0,3 a 1,0 V, não sendo constatado nenhum processo eletroquímico nessa faixa. A amostra foi então submetida a uma irradiação durante 10 minutos com LED azul (453 nm) e como resultado observou-se o surgimento de um processo anódico em 0,8 V. Esse processo indica a oxidação de óxidos de nitrogênio, neste caso, do NO liberado após irradiação do complexo. O mesmo comportamento é observado para nitrosilo complexos de Rutênio submetidos a este estudo (SANTOS et al., 2011; SOUSA, 2017).

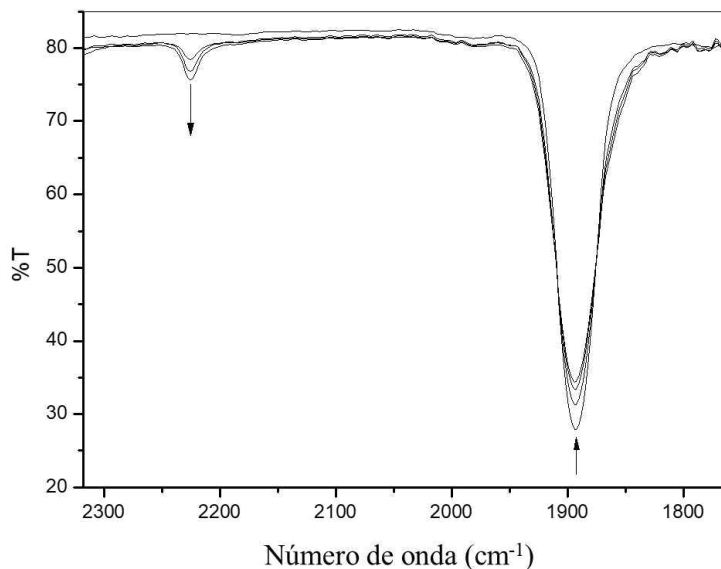
Figura 46 - Voltamograma de Pulso Diferencial do complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF₆)₂ em solução de NaTFA 0,10 mol L⁻¹, pH = 3,0. Voltamograma inicial (linha cheia) e após 10 minutos de irradiação em 463 nm (linha tracejada).



Fonte: a autora.

A técnica de absorção na região do infravermelho é importante para diferenciar o modo de coordenação do óxido nítrico ao centro metálico. No caso do complexo III, verifica-se que o NO⁺ está coordenado ao Rutênio devido a presença de uma banda intensa em 1898 cm⁻¹ (HILL; GODWIN; MEYER, 1971). Sabendo disso, a irradiação em 463 nm do complexo III foi acompanhada no estado sólido, uma vez que o espectro na região do infravermelho é obtido pela dispersão da amostra sólida em pastilha de KBr (Figura 47). Como resultado, notou-se a diminuição da banda referente ao estiramento do νNO⁺ de acordo com o aumento do tempo de irradiação e o aparecimento de uma nova banda em 2226 cm⁻¹, que é atribuída ao estiramento νNO⁺ livre da esfera de coordenação (HOLANDA et al., 2007). Isso indica que o complexo III é capaz de liberar NO com luz azul no estado sólido.

Figura 47 - Espectros de absorção na região do infravermelho para o complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF₆)₂ disperso em pastilha de KBr, sob irradiação com luz azul durante 1h.



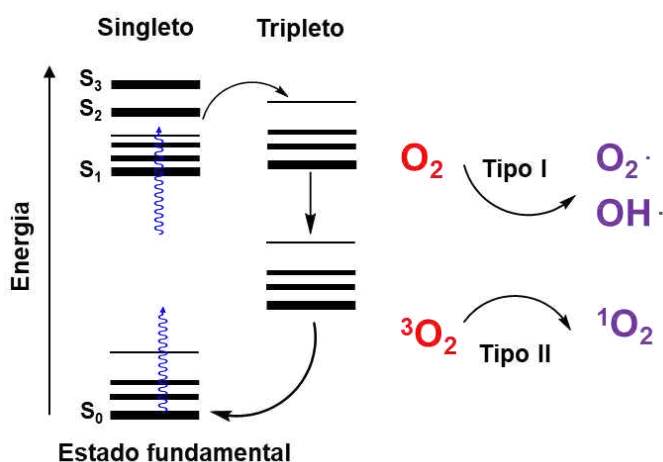
Fonte: a autora.

6.3 Geração de Oxigênio Singleto (¹O₂)

A medida do rendimento quântico de oxigênio singleto foi realizada por um método indireto, consistindo na reação de oxidação do 1,3- difenilisobenzofurano (DPBF). Na presença de ¹O₂, o DPBF reage formando o *o*-dibenzoilbenzeno, um produto que não fluorescente. Assim, a detecção do ¹O₂ pode ser calculada com base na supressão da emissão do DPBF em 475 nm.

Este experimento foi realizado para o complexo III e seu precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)]. Para isso, foram utilizadas alíquotas de 2,0 mL de soluções dos complexos (20 μM), juntamente com o DPBF (20 μM) em cubeta de quartzo. As soluções foram irradiadas com LED azul, o que faz com que o complexo saia do seu estado fundamental (S₀) e passe a um estado excitado singleto mais energético (S*). O íon metálico favorece a conversão intersistema do estado singleto para o tripleto, deste modo, o complexo transfere energia para o oxigênio molecular e isso leva a formação de oxigênio singleto, como representado na Figura 48.

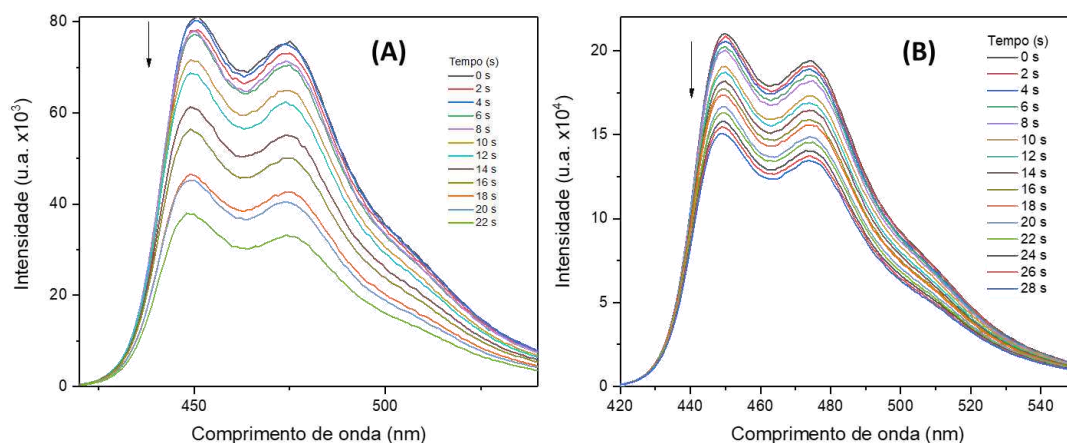
Figura 48 - Representação da conversão intersistema que leva a formação de oxigênio singlete (Diagrama de Jablonski).



Fonte: Adaptado da referência (HESS et al., 2017).

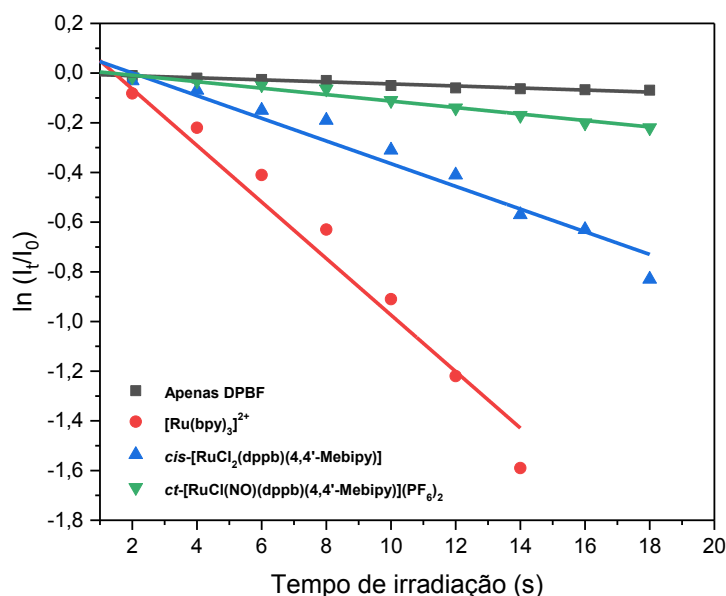
Quando o complexo é capaz de gerar oxigênio, este reage imediatamente com o DPBF de forma irreversível, resultando na supressão da sua emissão. A Figura 49 apresenta os espectros da fotodegradação do DPBF quando irradiado na presença dos complexos e a Figura 50 ilustra as curvas cinéticas.

Figura 49 - Espectros de fluorescência do DPBF (20 μM), em metanol, na presença dos complexos *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)] (A) e *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)NO](PF₆)₂ (B) sob irradiação com LED azul. λ_{exc} = 410 nm.



Fonte: a autora.

Figura 50 - Curva cinética de consumo do DPBF em função do tempo de irradiação com LED azul.



Fonte: a autora.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 49, pode-se inferir que os complexos analisados podem gerar oxigênio singleto, uma vez que mostram uma diminuição na intensidade da banda de emissão com máximo em 475 nm em diferentes tempos de irradiação dos complexos na presença de DPBF. Um gráfico de intensidade da banda de emissão versus tempo de irradiação foi plotado, mostrado na Figura 50. O tempo de decaimento do DPBF foi calculado pelo ajuste exponencial de primeira ordem para 475 nm, que é inversamente proporcional a taxa de formação de oxigênio singleto. Deste modo, conhecendo o rendimento quântico de uma solução padrão, juntamente com o tempo de decaimento, pode-se calcular a eficiência para as demais amostras. O composto padrão utilizado neste experimento foi o $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ que apresenta $\Phi_{\Delta} = 0,87$ em solução de metanol. As equações utilizadas para o cálculo do rendimento estão especificadas no item 3.10.

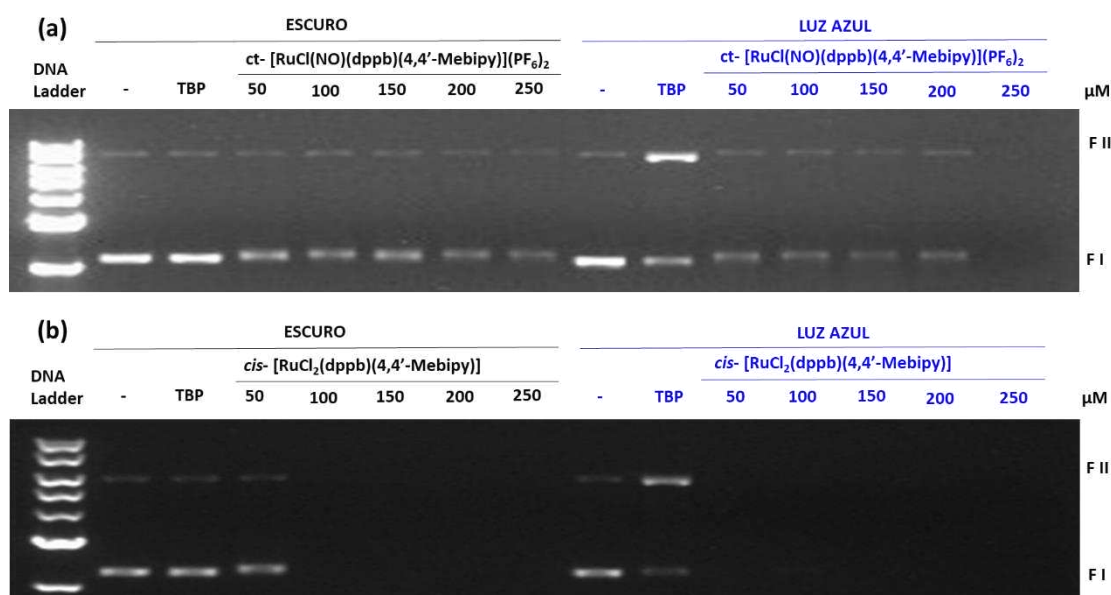
O rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ para o complexo III foi de $\Phi_{\Delta} = 0,09$; inferior ao seu precursor que teve um valor $\Phi_{\Delta} = 0,34$. Isto quer dizer que, o complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{Mebpy})]$ tem maior capacidade de gerar $^1\text{O}_2$, portanto, maior capacidade de causar danos a moléculas biológicas como o DNA quando irradiado. No caso do complexo III, a luz acelera a liberação de moléculas de NO, portanto, espera-se que este complexo seja menos eficiente para gerar oxigênio singleto.

6.4 Estudo de interação e fotoclivagem com DNA

6.4.1 Ensaio de clivagem de DNA

O experimento foi realizado com a mistura da solução do DNA plasmidial com concentrações diferentes do complexo III na ausência e presença de luz, com irradiação em 453 nm durante 1 h. Para fins comparativos, o mesmo procedimento foi realizado para o complexo precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)] nas mesmas condições experimentais. As imagens dos géis obtidos são apresentadas nas Figuras 51A e 51B. As concentrações dos complexos utilizadas foram: 50, 100, 150, 200 e 250 μM. Após o preparo das soluções dos complexos com DNA plasmidial, estas foram separadas em duas séries: uma permaneceu no escuro e a outra foi irradiada com luz azul durante 1 h, antes de ser inserida na cuba para eletroforese. O complexo [Ru(bpy)₃]²⁺ (TBP) foi usado como controle.

Figura 51 - Eletroforese em gel de agarose dos complexos *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂ (A) e *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)] (B) na ausência de luz e após irradiação por 1 h com luz azul.



Fonte: a autora.

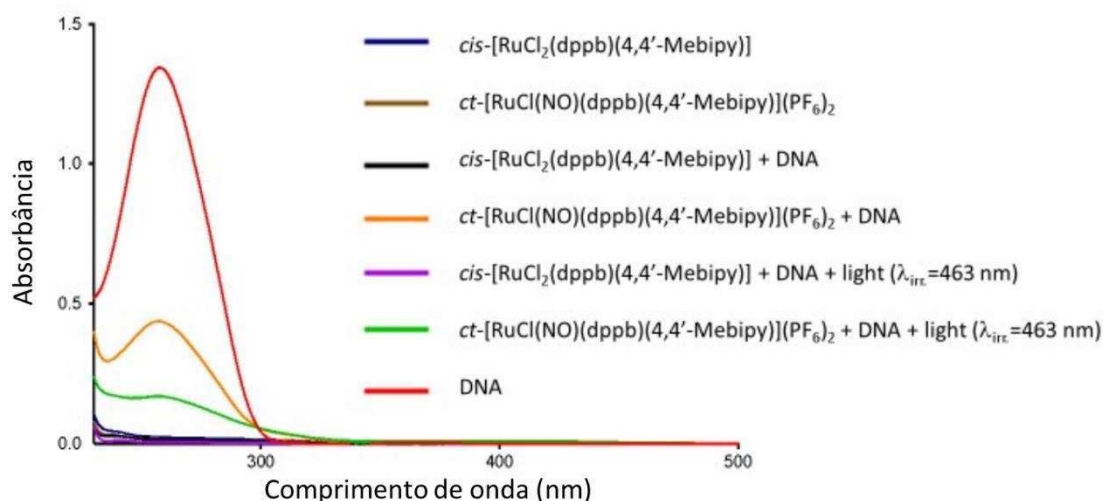
O resultado na corrida eletroforética obtida para o complexo III mostra que não houve formação de bandas para as formas II e III (FII e FIII), que indicariam quebra nas fitas do DNA. No entanto, a banda para a forma superenovelada (FI) praticamente não é vista também. O mesmo resultado foi observado para o complexo precursor, tanto ausência, quanto na presença de luz, mas o processo mostrou-se ser mais eficiente e isso indica que este complexo tem maior capacidade de se ligar ao DNA quando comparado ao complexo III. Quando

nenhuma das formas (FI, FII e FIII) DNA plasmidial não é identificada no gel de agarose, normalmente se atribui a duas possibilidades. A primeira consiste na intercalação dos complexos nas bases nitrogenadas do DNA, substituindo o corante utilizado para fazer a marcação das bandas e causando uma supressão da fluorescência do mesmo. A segunda possibilidade, é quando a ligação dos complexos com o DNA é muito eficiente, causando a clivagem rapidamente. Os fragmentos, por apresentar uma maior mobilidade eletroforética, migram por todo o gel e as bandas não são detectadas ao final do experimento.

6.4.2 Ensaio de isolamento do complexo-DNA por coluna de exclusão

Este experimento foi realizado tanto para complexo III, quanto para seu precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)]. Os complexos foram incubados separadamente com CT-DNA em concentrações equimolares (500 nM) em solução de DMSO/H₂O 3%. As amostras foram irradiadas com LED azul durante 1 h e então permaneceram incubadas por 24h a temperatura ambiente. Após esse período, alíquotas de 50 µL foram aplicadas na coluna de filtração a gel e coletadas depois de eluídas. Como amostras de controle foram utilizados o DNA e complexos isolados. Os espectros eletrônicos obtidos para este experimento estão ilustrados na Figura 52.

Figura 52 - Espectros eletrônicos para o ensaio de interação com DNA após filtração na coluna de exclusão.



Fonte: a autora.

A primeira observação pertinente ao estudo, diz respeito a ausência de bandas de transição eletrônica pertencentes aos complexos para as amostras eluídas. Isso impossibilitaria chegar a conclusão de que haveria interação dos compostos com o DNA. Diante disso, a análise do resultado foi feita na observação da região de absorção do ultravioleta.

O espectro eletrônico da molécula do DNA possui uma banda em 260 nm, atribuída as transições do tipo ($\pi^* \leftarrow \pi$) das suas bases nitrogenadas (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Quando ocorre interação entre um complexo metálico e DNA, podem ser observadas mudanças espectrais na região do UV-visível devido as modificações na estrutura da sua dupla hélice. As alterações espectrais observadas são um aumento na intensidade da absorbância (hipercromismo) ou diminuição na intensidade da absorbância (hipocromismo), as quais podem ainda vir acompanhadas de deslocamentos para a faixa do vermelho (batocromismo) ou para a faixa do azul (hipsocromismo) (REHMAN et al., 2015).

De acordo com os espectros observados na Figura 52, conclui-se que, a banda de absorção do DNA em 260 nm tem sua intensidade diminuída para a amostra do complexo III (traço verde e laranja), que corresponde a mistura do complexo com DNA com e sem luz, respectivamente. Esse resultado sugere que ocorre interação do complexo com o DNA, sendo que esta é mais forte para a alíquota que foi irradiada com luz azul. Já para os espectros correspondentes ao precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)], não são observadas nenhuma banda de transição na região de 260 nm, diferente do controle, contendo apenas DNA.

Este resultado, juntamente com os obtidos no ensaio de clivagem, sugere que os dois complexos degradam o DNA. No entanto, esse processo ocorre de forma mais rápida e eficiente para o precursor. Para que nenhuma absorção seja observada, é sugestivo que este complexo degrade o DNA em fragmentos muito pequenos, mais precisamente abaixo de 22 pares de base, que é o limite da coluna utilizada para o experimento. Já o complexo III, que também degrada o DNA, tem esse efeito potencializado com a irradiação. Isso pode ser explicado pela liberação do NO, que é acelerada com o uso de luz azul, produzindo um complexo análogo ao precursor, que degrada rapidamente o DNA.

6.5 Atividade antimicrobiana

O estudo da atividade antimicrobiana foi realizado para o complexo III e seu precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)], tendo em vista que este apresentou resultados relevantes nos ensaios de interação e clivagem do DNA. Os valores de MIC e MBC foram determinados para uma série de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, na ausência e presença de luz azul. Os resultados são ilustrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Atividade antimicrobiana dos complexos *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)] e *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂ frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Microorganismos	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4-Mebipy)]		<i>ct</i> -[RuCl(NO)(dppb)(4,4-Mebipy)] ²⁺	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	31,2 (39,8)	250,2 (310,7)	7,8 (7,3)	31,2 (29,3)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC700698	62,5 (79,8)	500,0 (638,8)	7,8 (7,3)	125 (117,1)
<i>Staphylococcus aureus</i> JKD6008	7,8 (7,3)	15,6 (19,9)	7,8 (7,3)	15,6 (14,6)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	125,0 (159,7)	250,0 (319,7)	7,8 (7,3)	31,2 (29,3)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984	125,0 (159,7)	250,0 (319,4)	15,6 (7,3)	62,5 (58,6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC11303	-	-	-	-

MIC e MBC são expressos em µg/mL (µM), (-) Atividade não detectada para concentrações maiores que 500 µg/mL.

Fonte: a autora.

Não houve diferença na atividade com a irradiação dos complexos, deste modo, a tabela ilustra apenas um valor de MIC e MBC, os quais variaram de 125,0 a 7,8 µg/mL e 500,0 a 15,6 µg/mL, respectivamente. O nitrosilo complexo apresentou efeito inibitório muito satisfatório para várias cepas das bactérias testadas e esse efeito foi mais pronunciado quando comparado ao seu precursor. Esse resultado sugere que o NO liberado é o responsável por tornar o complexo III mais eficaz, mesmo não havendo melhor atividade com a irradiação durante 1 h. Tem-se que considerar que a suspensão formada pelo complexo e bactérias permanece incubada durante 24 h e o complexo III não permanece estável durante todo esse tempo. Essa observação foi constada através da análise dos espectros eletrônicos, que indicam que após 24 h, o NO é liberado espontaneamente e o sítio de coordenação substituído pelo solvente. Neste caso, pode-se considerar um efeito sinérgico pela combinação do NO liberado e o complexo formado após a sua liberação, que de acordo com os estudos anteriores pode degradar o DNA. A atividade citotóxica do NO é bem descrita (SERLI et al., 2003), ocasionando a apoptose de células tumorais quando liberado dentro destas. No trabalho publicado por Doriguetto e colaboradores (SILVA et al., 2018), a atividade citotóxica do complexo III e seu precursor frente a linhagem Hep G2 (hepatocarcinoma humano) e CCD-1029Sk (fibroblasto normal) foram relatadas. Como resultado, houve uma melhora significativa no valor de IC₅₀ do complexo III (38,41 µM) em relação ao precursor (92,66 µM) para as células Hep G2. A

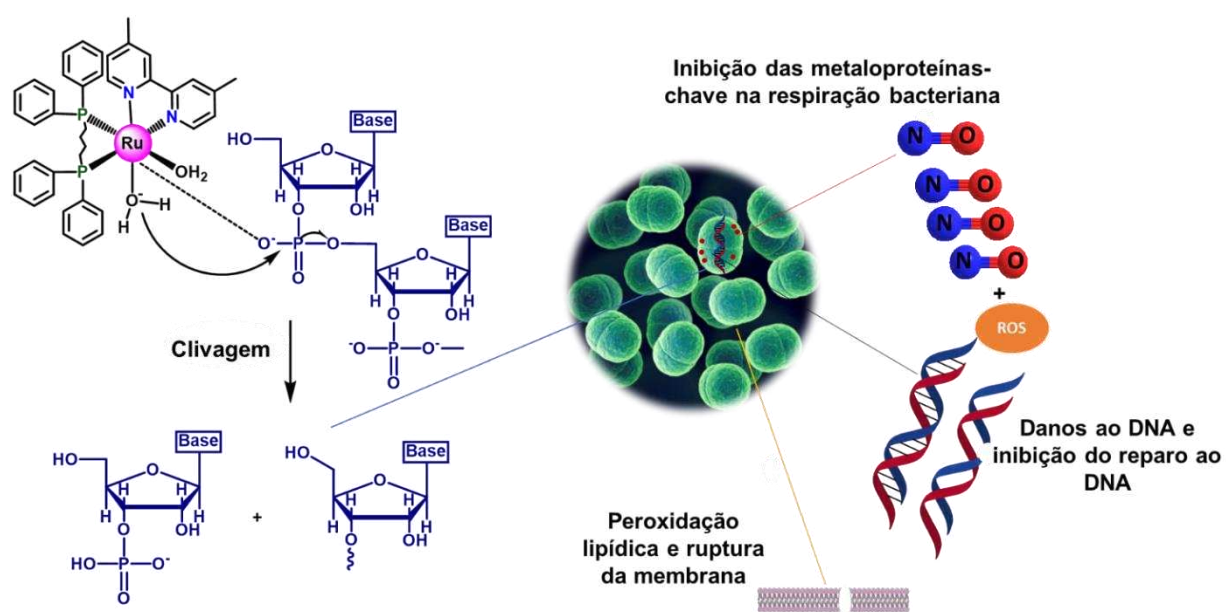
inserção da molécula de NO neste complexo tornou sua atividade muito promissora, obtendo-se um valor de IC₅₀ um pouco abaixo do observado para a cisplatina (38,5 µM) frente a esta mesma linhagem.

Outras características também podem influenciar na eficiência do complexo III quando comparado ao precursor, é o caso da carga dos compostos. O primeiro possui carga +2, enquanto o segundo é neutro, até que seus cloretos sejam trocados por água. Isso pode influenciar na absorção relativa, ligação e reatividade para biomoléculas também (LI; COLLINS; KEENE, 2015). Outra observação importante é que os complexos não apresentaram atividade contra bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), isso pode ser explicado pela diferença na estrutura e composição das membranas da parede celular existente entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Microorganismos Gram-negativos contêm em sua parede celular lipopolissacarídeos, que diminui a permeabilidade de agentes antimicrobianos. Este é um fator considerado como um dos mecanismos de resistência a medicamentos para esse tipo de bactéria (SNYDER; MCINTOSH, 2000).

A Figura 53 mostra a representação de possíveis mecanismos de ação para a atividade antimicrobiana exercida pelo complexo III, onde os principais destaques são a liberação espontânea de NO e formação do complexo diaqua, que cliva o DNA por via hidrolítica. O NO liberado pode reagir com espécies reativas de oxigênio, podendo gerar espécies superoxidativas, como os peroxinitritos. Estes são tóxicos e reativos com enzimas metabólicas e proteínas das bactérias, podendo assim, interromper atividades bacterianas (CARPENTER, A.W., SCHOENFISCH, 2012). Peroxinitritos e outros produtos de reações com NO, como NO₂, podem provocar danos à membrana pela oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, contribuindo para a atividade antimicrobiana (D.O. SCHAIRER, D.O., CHOUAKE, J.S., NOSANCHUK, J.D., FRIEDMAN, 2012). Na forma de radical livre, pode ainda inibir as meloproteínas-chave na respiração bacteriana (YANG, Y., QI, P.K., YANG, Z.L., HUANG, 2015). Além disso, resíduos de cisteína de DNA reagem com NO formando ligações S-NO, modificando proteínas e inibindo reações de reparo do DNA (FANG, 1997). É importante esclarecer que os efeitos do NO são diferentes em células de mamíferos quando comparado a células procariontes. Nos mamíferos, o NO exibe funções citoprotetoras, enquanto nos procariontes há uma maior sensibilidade a essa molécula devido a sua maior dependência de aglomerados ferro-enzofre. Quando ocorre degradação desses aglomerados por NO ou RNOS, ferro é liberado e se liga ao DNA, auxiliando na formação de radicais livres reativos que causam danos a sua estrutura e a membrana (MENDHI et al., 2020). Assim, vale ressaltar

que diante de vários mecanismos, as chances de bactérias desenvolverem resistência ao NO são menores. Consequentemente, estratégias baseadas na liberação de óxido nítrico são excelentes para o combate de infecções causadas por bactérias resistentes.

Figura 53 - Mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana do complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂.



Fonte: a autora.

Os dados coletados para a atividade antimicrobiana obtidos neste trabalho foram compilados com as atividades de complexos trabalhados durante o mestrado. Os resultados são ilustrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Ação antimicrobiana para complexos de Rutênio mediante irradiação com luz azul.

Complexo	Luz azul		Microorganismos			
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(CO)] Complexo I	Sim	MIC	-	-	-	-
		MBC	-	-	-	-
	Não	MIC	-	-	-	-
		MBC	-	-	-	-
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Met)](PF ₆) ₂ Complexo II	Sim	MIC	62,5 (73,3)	125 (146,6)	-	500 (586,4)
		MBC	62,5 (73,3)	125 (146,6)	-	-
	Não	MIC	125 (146,6)	250 (293,2)	-	500 (586,4)
		MBC	125 (146,6)	250 (293,2)	-	-
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(Mebpy)]	Sim	MIC	31,2 (39,8)	125,0 (159,7)	-	-
		MBC	250,2 (310,7)	250,0 (319,7)	-	-
	Não	MIC	31,2 (39,8)	125,0 (159,7)	-	-
		MBC	250,2 (310,7)	250,0 (319,7)	-	-
<i>ct</i> - [RuCl(dppb)(Mebpy)NO] (PF ₆) ₂ Complexo III	Sim	MIC	7,8 (7,3)	7,8 (7,3)	-	-
		MBC	31,2 (29,3)	31,2 (29,3)	-	-
	Não	MIC	7,8 (7,3)	7,8 (7,3)	-	-
		MBC	31,2 (29,3)	31,2 (29,3)	-	-
<i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (clbzy)(Cl)](PF ₆)	Sim	MIC	500	500	-	*
		MBC	-	500	-	*
	Não	MIC	500	250	-	*
		MBC	-	-	-	*
<i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (4-bzpy)(Cl)](PF ₆)	Sim	MIC	250	250	-	*
		MBC	250	-	-	*
	Não	MIC	250	125	-	*
		MBC	250	250	-	*
<i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (4-bzpy)(CO)](PF ₆) ₂	Sim	MIC	-	-	-	*
		MBC	-	-	-	*
	Não	MIC	-	-	-	*
		MBC	-	-	-	*

MIC e MBC são expressos em µg/mL (µM)

(-) Atividade não detectada para concentrações maiores que 500 µg/mL

(*) Cepa não testada

Fonte: a autora.

Todos os complexos sintetizados têm o Rutênio em comum como o metal na esfera de coordenação. A variação ocorre com os ligantes auxiliares e principais, como: polipiridínicos, difosfínicos, monóxido de carbono e óxido de nitrogênio. Alguns fatores têm sido relatados para descrever a atividade antimicrobiana de complexos de Rutênio, entre eles, natureza do ligante, lipofilicidade, carga total do complexo e produção de oxigênio singlete. A presença de ligantes que se coordenam de forma bidentada, aumenta a eficiência antimicrobiana de complexos se comparados a aqueles com ligantes monodentados. Isso acontece porque a quelatação reduz a polaridade do centro metálico, pois sua carga positiva será compartilhada com os grupos doadores, deslocando os elétrons em todo o ligante. Deste modo, a lipofilicidade será aumentada, o que facilita a entrada de complexos metálicos nas camadas lipídicas da membrana bacteriana (LAM et al., 2014). Já para a carga total do complexo, verifica-se que a ação antimicrobiana decresce na ordem: catiônico > neutro > aniônico (EFTHIMIADOU et al., 2007). Para a série de complexos apresentada na Tabela 16, observa-se que todos os compostos apresentam, no mínimo, dois ligantes bidentados. Quanto a carga total, praticamente todos os complexos mostram-se como íon complexos catiônicos, exceto os compostos de coordenação *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] e *cis*-[RuCl₂(dppb)(Me bpy)] que são neutros. Comparando esse ponto, os dois complexos mais ativos, tratam-se dos compostos difosfínicos neutro (precursor) e catiônico (complexo III), sendo este último o mais eficiente.

O terceiro complexo que apresentou atividade razoável foi o *cis*-[Ru(bpy)₂(Met)](PF₆)₂, mostrando ser mais eficiente após a irradiação. O complexo apresenta em sua estrutura duas bipyridinas, que são ligantes bidentados, juntamente com o aminoácido metionina, que entre suas formas de coordenação, mostra-se de forma bidentada para este complexo. Portanto, são três ligantes bidentados, sendo este o único íon complexo catiônico da série que apresenta esta característica. Até o momento, não foi relatado a ação antimicrobiana de complexo com aminoácidos. De acordo com os estudos, a atividade deste complexo pode estar correlacionada a interação e clivagem do DNA, que é favorecida com a irradiação. Com a saída da metionina da esfera de coordenação, forma-se o complexo diaqua, que se liga covalentemente ao DNA. Vale destacar que este foi o único complexo a apresentar alguma capacidade de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa *E. Coli*, com um valor de MIC igual a 500 µg/mL. Esse valor não sofreu alteração com a irradiação, propondo que a atividade frente a essa cepa não está relacionada com algum dano causado ao DNA, mas possivelmente a ruptura da membrana bacteriana.

Os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Clbzpy)(Cl)](PF₆) e *cis*-[Ru(bpy)₂(4-bzpy)(Cl)](PF₆) têm em sua esfera de coordenação duas bipyridinas como ligantes bidentados e Clbzpy e 4-bzpy como monodentados. Os dois complexos apresentaram atividade antimicrobiana semelhante e somente frente a bactérias Gram-positivas (SOUSA et al., 2018). As propriedades fotoquímicas e de ligação a nucleobases também foram estudadas e concluiu-se que, após irradiação com luz azul, o centro metálico se liga a guanina. Este comportamento sugeriu então, que os complexos pudessem funcionar como novos agentes anticróbios fotoativáveis. Mesmo formando fortes interações com o DNA após irradiação, a atividade contra os microorganismos parece ser explicada por danos causados a membrana bacteriana, já que não foi observada uma melhor eficácia com a exposição a luz.

Apesar de um grande número de compostos carbonílicos apresentarem-se como bons agentes bactericidas, os compostos carbonílicos *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(CO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(4-bzpy)(CO)](PF₆)₂ não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana frente as cepas testadas. Ambos, comprovadamente liberam CO quando irradiados, no entanto, os produtos da fotorreação não foram capazes de inibir ou matar bactérias.

Diferentemente das carbonilas metálicas, o nitrosilo complexo *ct*-[RuCl(dppb)(Mebpy)(NO)](PF₆)₂ e seu precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Mebpy)] foram os que obtiveram menores valores de concentração para inibir e matar as bactérias. Comparando os dois, destaca-se o complexo III, com MIC e MBC variando de 7,8 a 31,2 µg/mL para bactérias Gram-positivas. Como foi discutido anteriormente, sugere-se que os produtos da reação fotoquímica sejam os responsáveis pela melhor eficiência deste complexo, sendo um deles, o NO liberado.

O NO liberado fotoquimicamente se difunde rapidamente em meio biológico e é rapidamente consumido por uma variedade de mecanismos, entre eles, oxidação a nitrito e nitrato. Deste modo, seu tempo de meia-vida é curto e os efeitos do NO liberado são localizados (FORD, 2018). No caso do CO, os alvos mais prováveis são os centros metálicos, como o grupo heme, onde sua coordenação afeta transporte de oxigênio, inibindo processos como a respiração mitocondrial, além de afetar enzimas de sinalização celular e fatores de transcrição (FORD, 2018). Ou seja, a molécula de NO é mais reativa que o CO e isso pode, de certa forma, explicar a maior atividade do nitrosilo complexo. Os ligantes auxiliares bipyridina e difosfina também desempenham função determinante para o sistema. A atividade antimicrobiana e antibiofilme de uma série de compostos de Rutênio do tipo *cis*-[RuCl₂(dppb)(NN-R)]²⁺ (ANDRADE, L., 2018) foi avaliada contra as mesmas cepas testadas neste trabalho. Como resultado, os

complexos exibiram atividade somente frente a bactérias Gram-positivas, com MIC variando de 7,8 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e MBC de 31,25 a 125 $\mu\text{g/mL}$. Resultados bem próximos do obtido para o complexo III, no entanto, sem o NO na esfera de coordenação.

No estudo realizado por (DA SILVEIRA CARVALHO et al., 2017) avaliou-se a atividade do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{dppz})]^+$ com e sem irradiação. Os valores de MIC variaram de 1,23 a 9,82 $\mu\text{g/mL}$ para bactérias Gram-positivas, bem próximo de agentes antimicrobianos de referência. Não houve alteração nos valores de MIC após irradiação, indicando que o CO não participou do processo. O complexo também não apresentou eficiência contra as bactérias Gram-negativas.

Assim, baseado-se nas características desses complexos, pode-se dizer que o ligante bifosfínico confere ao sistema características lipofílicas, que melhoram a absorção destes complexos pelas células bacterianas Gram-positivas, de modo que estes apresentaram melhores atividades bacteriostática e bactericida quando comparados aos que contém a bipyridina como ligante.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os complexos I e II, inéditos, foram sintetizados e caracterizados. Ao complexo III, já publicado, foram realizadas adaptações na rota sintética. Essas adaptações permitiram diminuir as etapas do procedimento experimental e aumentar o rendimento do produto final.

Os resultados obtidos por meio das técnicas de espectroscopia eletrônica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , voltametria cíclica e difração de raios x confirmaram as estruturas propostas para os complexos. Sobretudo, a técnica de difração de raios x foi decisiva para a elucidação do modo e através de quais átomos o aminoácido metionina se encontrava coordenado ao centro metálico no complexo II.

A coordenação dos ligantes piridínicos nos complexos I e II foi confirmada por meio dos espectros de ^1H e COSY e estes dados foram coerentes com as estruturas obtidas por difração de raios x. Através desta técnica, foi ainda possível visualizar a presença de seis moléculas de água na cela unitária do complexo I, característica que fortemente explica a alta solubilidade deste complexo em água. Os espectros eletrônicos obtidos estão em conformidade com os obtidos teoricamente. As absorções e valores de coeficiente de absorvidade molar são semelhantes aos reportados na literatura para complexos do mesmo tipo.

Os espectros de absorção na região do infravermelho também confirmaram a presença dos ligantes coordenados ao Rutênio, em destaque, os ligantes monóxido de carbono e óxido de nítrico, que apresentam estiramentos característicos dependendo do modo de coordenação. Nos voltamogramas, observou-se que a presença dos ligantes π -aceptores influenciam na densidade eletrônica do centro metálico, estabilizando-o no estado reduzido. Isso ocorre devido a retrodoação entre o centro metálico e esses ligantes.

O estudo fotoquímico para o complexo I sugere a liberação de monóxido de carbono após irradiação com luz UV ($\lambda_{\text{irr.}} = 300, 350$ e 395 nm). A reação foi acompanhada por espectroscopia na região do UV-Vis e CLAE, indicando a formação do aqua complexo após liberação de CO. Os ensaios com mioglobina e hemina, utilizando métodos espectroscópico e eletroquímico, respectivamente, foram experimentos específicos e conclusivos para detectar que o ligante liberado mediante irradiação tratava-se do CO. Infelizmente, apesar do complexo apresentar características desejáveis para uma molécula liberadora de monóxido de carbono, como: solubilidade em água, estabilidade no escuro e liberação de CO somente mediante irradiação, o composto não apresentou atividade bactericida ou bacteriostática na ausência ou presença de luz em uma concentração inferior a $500 \mu\text{g/mL}$.

O complexo II mostrou fotorreatividade após irradiação com luz UV (395 nm), azul (453nm) e verde (505 nm). A reação fotoquímica foi acompanhada por espectroscopia na região do UV-Vis e CLAE, indicando a liberação da metionina. Este fato é interessante, uma vez que o aminoácido pode ser usado como um “photo-uncaging”, funcionando como um grupo de bloqueio liberado apenas com irradiação. Adicionalmente, o fotoproduto *cis*-[Ru(bpy)₂(H₂O)₂]²⁺ mostrou evidências de interação com o DNA e promoveu fotoclivagem em concentrações moderadas. Estes resultados reforçam a correlação entre a ligação com DNA e atividade antimicrobiana, pois o complexo mostrou uma promissora atividade bacteriostática e bactericida contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), que foi melhorada mediante irradiação com luz azul ($\lambda_{irr.} = 453$ nm).

O complexo III, já relatado na literatura, teve neste trabalho como foco o seu estudo fotoquímico e atividade antimicrobiana. A liberação de NO foi constatada com a irradiação com luz azul ($\lambda_{irr.} = 453$ nm) através das técnicas de espectroscopia eletrônica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e eletroquímica. A irradiação do complexo no estado sólido mostrou a diminuição do estiramento do ν_{NO^+} , indicando a liberação do mesmo. Ao mesmo tempo, foi observado o surgimento de um pico referente ao NO livre. O voltamograma de pulso diferencial mostrou um pico anódico em 0,8 V após a irradiação da solução, característico de óxidos de nitrogênio. Este resultado corrobora com as demais técnicas para evidenciar que a ligante liberado trata-se do NO. A atividade antimicrobiana do complexo III e do seu precursor foram testadas frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mesmo apresentou uma atividade antimicrobiana superior ao seu precursor, indicando que o NO liberado influenciou no resultado.

O ensaio de geração de oxigênio singlete, demonstrou que o complexo III é menos eficiente que o seu precursor, portanto, a produção dessa espécie não seria a responsável pela atividade exercida pelo complexo III, quanto a sua ação antimicrobiana. Já os experimentos de isolamento do complexo-DNA e clivagem, indicam que há interação tanto do precursor quanto do nitrosilo complexo com DNA. Sendo que, para este último, foi observado que a irradiação potencializava esse efeito. Estes resultados sugerem que o complexo III é promissor como bacteriostático sob ativação de luz na região do visível.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. D. et al. Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 56, p. 9084–9096, 2017.
- ALESSIO, E. et al. Ruthenium Antimetastatic Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 4, p. 1525–1535, 2004.
- ALESSIO, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds : A Personal. **European Journal of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 55, p. 1549–1560, 2017.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, [s.l.], v. 45, p. 62–69, 2001.
- ANASTASSOPOULOU, J. Metal-DNA interactions. **Journal of Molecular Structure**, [s.l.], v. 651–653, p. 19–26, 2003.
- ANDRADE, L. A. **Atividade antibacteriana e antibiofilme de complexos de Rutênio do tipo cis-[RuCl₂(dppb)(NN-R)]²⁺ sobre bactérias resistentes e o efeito destes combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais. Fortaleza, 2018.
- BARD, A. J; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods**, Fundamentals and Applications. 1980.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Publishing Group**, [s.l.], v. 13, p. 42–51, 2014.
- BOYLE, N. M. O.; TENDERHOLT, A. L.; LANGNER, K. M. Software News and Updates cclib : A Library for Package-Independent Computational Chemistry Algorithms. 2007.
- BRADNER, W. T. Mitomycin C : a clinical update. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 5, p. 35–50, 2001.
- CALLAHAN, R. W.; MEYER, T. J. Reversible Electron Transfer in Ruthenium Nitrosyl Complexes. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 16, p. 574–581, 1977.
- CARAMORI, G. F. ET AL. Ruthenium nitrosyl complexes containing pyridinefunctionalized carbenes - A theoretical insight. **Journal of Organometallic Chemistry**, [s.l.], v. 799, p. 54–60, 2015.
- CARPENTER, A.W., SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, p. 3742–3752, 2012.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s.l.], v. 1, p. 279–293, 2004.
- CAUBET, A. et al. Methionine and Histidine Pd(II) and Pt(II) Complexes: Crystal Structures and Spectroscopic Properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 48, p. 135–152, 1992.
- CAVUOTO, P.; FENECH, M. F. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. **Cancer Treatment**

Reviews, [s.l], v. 38, p. 726–736, 2012.

CELLARIER, E. et al. Methionine dependency and cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l], v. 7372, p. 489–499, 2003.

CHEN, T. et al. Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. **Inorganic Chemistry**, [s.l], v. 49, p. 6366–6368, 2010.

CHENEY, R. P.; ARMOR, J. N. Reactivity of Coordinated Nitrosyls. 6. Preparation, Characterization, and Reduction of Nitrosylpentaquaoruthenium(3+) and Reduction of Various Ruthenium Ammine Nitrosyls. **Inorganic Chemistry**, [s.l], v. 16, p. 3338–3344, 1977.

CHIN, B. Y.; OTTERBEIN, L. E. Carbon monoxide is a poison . . . to microbes ! CO as a bactericidal molecule. **Current Opinion in Pharmacology**, [s.l], p. 490–500, 2009.

CLARKE, M. J. Inorganic Chemistry in Biology and Medicine. **American Chemical Society**, n. Chapter 10, [s.l], p. 157–180, 1980.

COE, B. J.; GLENWRIGHT, S. J. Trans-effects in octahedral transition metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l], v. 203, p. 5–80, 2000.

CROSBY, G. A.; DEMAS, J. N. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. **The Journal of Physical Chemistry**, [s.l], v. 75, p. 991–1024, 1971.

CUNHA, S. Métodos simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração de raios X. **Química Nova**, [s.l], v. 31, p. 906–909, 2008.

SCHAIRES, D.O., CHOUAKE, J.S., NOSANCHUK, J.D., FRIEDMAN, A. J. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. **virulence**, [s.l], v. 3, p. 271–279, 2012.

DA SILVEIRA CARVALHO, J. M. et al. A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity. **New Journal of Chemistry**, [s.l], v. 41, p. 13085–13095, 2017.

DAVIDGE, K. S. et al. Carbon monoxide-releasing antibacterial molecules target respiration and global transcriptional regulators. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l], v. 284, p. 4516–4524, 2009.

DOLOMANOV, O. V. et al. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, [s.l], v. 42, p. 339–341, 2009.

DRYDEN, M. International Journal of Antimicrobial Agents Reactive oxygen species : a novel antimicrobial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l], v. 51, p. 299–303, 2018.

EFTHIMIADOU, E. K. et al. Mononuclear copper (II) complexes with quinolones and nitrogen-donor heterocyclic ligands : Synthesis , characterization , biological activity and interaction with DNA. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l], v. 360, p. 4093–4102, 2007.

FANG, F. . Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **Journal of Clinical Investigation**, [s.l], v. 99, p. 2818–2825, 1997.

FORD, P. C. Metal complex strategies for photo-uncaging the small molecule bioregulators nitric oxide and carbon monoxide. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l], v. 376, p. 548–

564, 2018.

FRENKING, G.; KOCH, W.; LI, X. A Moller – Plesset study of the electron affinities of the diatomic hydrides XH (X = Li), A Moller-Plesset study of the electron affinities of the diatomic hydrides XH. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 84, p. 3224–3229, 1986.

GAGNE, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an Internal Standard for Electrochemical. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 19, p. 2854–2855, 1980.

GARCÍA DE LA ROSA, A. et al. Stable hemin embedded in Nafion® films for the catalytic reduction of trichloroacetic acid under hydrodynamic conditions. **Electrochemistry Communications**, [s.l.], v. 7, p. 853–856, 2005.

Gaussian 9. **Wallingford**, v. 1 CD, 2009.

GaussView, Version 5. **Semichem Inc. Shawnee Mission**, v. 1 CD, 2009.

GOBETTO, R. et al. X-ray structures and complete NMR assignment by DFT calculations of [Os(bpy)₂(CO)Cl]PF₆ and [Os(bpy)₂(CO)H]PF₆ complexes. **Organometallics**, [s.l.], v. 22, p. 4012–4019, 2003.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. Nitrosyl-Nitrite Interconversion in Ruthenium Complexes. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 10, p. 2150–2153, 1971.

GOLDBACH, R. E. et al. N-acetylmethionine and biotin as photocleavable protective groups for ruthenium polypyridyl complexes. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 17, p. 9924–9929, 2011.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of biochemical and biophysical methods**, [s.l.], v. 65, p. 45–80, 2005.

GONG, G. et al. Influence of methionine – ruthenium complex on the fibril formation of human islet amyloid polypeptide. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 24, p. 179–189, 2019.

GOWDA, K. R. . et al. Mechanism of DNA Binding and Cleavage, Biomedicine and Biotechnology. **Biomedicine and Biotechnology**, [s.l.], v. 2, p. 1–9, 2014.

HARTMANN, J. T.; LIPP, H. P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 4, p. 889–901, 2003.

HATCHARD, C. G; PARKER, C. A. A new sensitive chemical actinometer - II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences**, [s.l.], v. 235, p. 518–536, 1956.

HAY, P. J. et al. Ab initio effective core potentials for molecular calculations . Potentials for K to Au including the outermost core orbitals Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 82, p. 299–310, 1985.

HESS, J. et al. Evaluation of the Medicinal Potential of Two Ruthenium(II) Polypyridine Complexes as One- and Two-Photon Photodynamic Therapy Photosensitizers. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 23, p. 9888–9896, 2017.

HILL, C.; GODWIN, B. Y. J. B.; MEYER, T. J. The Preparation of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 10, p. 1966–1969, 1971.

- HOLANDA, A. K. M. **Síntese, caracterização e estudo da liberação fotoquímica de óxido nítrico por nitrosilo complexos de Ru e Fe e pelo composto [cyclam(NO)4]**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2006.
- HOLANDA, A. K. M. et al. Crystal structure, electrochemical and photochemical studies of the trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl₂ complex (cyclam = 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane). **Polyhedron**, [s.l.], v. 26, p. 4653–4658, 2007.
- INABA, H.; FUJITA, K.; UENO, T. Design of biomaterials for intracellular delivery of carbon monoxide. **Biomaterials science**, [s.l.], p. 1423–1438, 2015.
- JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. 2. ed. [s.l.] Nova Jérσία: John Wiley, 2007.
- Jl, J. et al. Syntheses, structures and photocatalytic properties of ruthenium complexes bearing L-methionine ligands. **Journal of Organometallic Chemistry**, [s.l.], v. 907, p. 121078, 2020.
- KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T. W. Platinum drug distribution in cancer cells and tumors. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 109, p. 4911–4920, 2009.
- KRYLOVA, L. F.; KOVTUNOVA, L. M.; ROMANENKO, G. V. Pt(II) and Pd(II) complexes with β-alanine. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [s.l.], v. 2008, p. 1–10, 2008.
- LAM, P. L. et al. Development of ruthenium(II) complexes as topical antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 43, p. 3949–3957, 2014.
- LEIJEN, S. et al. Phase I / II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest New Drugs**, [s.l.], v. 33, p. 201–214, 2015.
- LI, F. et al. In vitro susceptibility and cellular uptake for a new class of antimicrobial agents: Dinuclear ruthenium(II) complexes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 67, p. 2686–2695, 2012.
- LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 44, p. 2529–2542, 2015.
- LI, S. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron ameliorate ischemia e reperfusion injury in the mouse fatty liver model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 470, p. 900–906, 2016.
- LING, K. et al. Carbon Monoxide and Its Controlled Release: Therapeutic Application, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs). **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 61, p. 2611–2635, 2018.
- LLANGURI, R. et al. Electrochemical and spectroscopic investigations of oxime complexes of bis(bipyridyl)ruthenium(II). **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 315, p. 53–65, 2001.
- MAJUMDER, K.; BUTCHER, R. J.; BHATTACHARYA, S. Chemistry of some amino acid complexes of ruthenium, synthesis, characterization, and DNA binding properties. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 41, p. 4605–4609, 2002.
- MANN, B. E.; MOTTERLINI, R. CO and NO in medicine. **Chemical Communications**, [s.l.], n. 41, p. 4197–4208, 2007.

MARTINS, P. H. R. **Avaliação de interação e clivagem de DNA por complexos de Rutênio**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.

MCAULIFFE, A; QUAGLIANO, V; VALLARINO, M. Metal Complexes of the Amino Acid DL-Methionine. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 5, p. 1996–2003, 1966.

MEEROVICH, G. A. et al. PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF BACTERIA AND BIOFILMS USING CATIONIC. **Journal of Physics: Conference Series**, [s.l.], v. 691, p. 012011, 2016.

MENDHI, J. et al. Dose controlled nitric oxide-based strategies for antibacterial property in biomedical devices. **Applied Materials Today**, [s.l.], v. 19, p. 100562, 2020.

MEYER, T. J.; SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J. Mixed Phosphine 2, 2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 17, p. 3334–3341, 1978.

MIESSLER, G. L. **Química Inorgânica**. 5. ed. São Paulo: Person, 2014.

MITAL, M.; ZIORA, Z. Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 375, p. 434–458, 2018.

MIZUKAMI, S. et al. Photocontrolled compound release system using caged antimicrobial peptide. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 132, p. 9524–9525, 2010.

MONRO, S. et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 119, p. 797–828, 2019.

MOTTERLINI, R. et al. Carbon Monoxide – Releasing Molecules Characterization of Biochemical and Vascular Activities. **Circulation Research**, [s.l.], v. 90, p. 17–24, 2002.

NAKAMOTO, K; MARTELO, E; MORIMOTO, Y. Infrared Spectra of Aqueous Solutions . I . Metal Chelate Compounds of Amino Acids. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 83, p. 4528–4532, 1961.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. John Wiley ed. New York: [s.n.].

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, [s.l.], p. 1872–1892, 2006.

NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 18, p. 291–309, 2001.

NOBRE, S. et al. Antimicrobial Action of Carbon Monoxide-Releasing Compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 51, p. 4303–4307, 2007.

OBIRAI, J. C. et al. UV-visible and electrochemical monitoring of carbon monoxide release by donor complexes to myoglobin solutions and to electrodes modified with films containing hemin. **Electroanalysis**, [s.l.], v. 18, p. 1689–1695, 2006.

OLIVEIRA, A. M. **Síntese, Caracterização e estudo de reatividade dos complexos cis-[Ru(bpy)2(TU)(H2O)](PF6)2 e cis-[Ru(bpy)2(TU)(NO)](PF6)3**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, C. M. **Simetria de Moléculas e Cristais: fundamentos da espectroscopia**

vibracional. Bookman ed. Porto Alegre: [s.n.].

OOYAMA, D. et al. Structural and spectroscopic characterization of ruthenium (II) complexes with methyl , formyl , and acetyl groups as model species in multi-step CO₂ reduction. **Journal of Organometallic Chemistry**, [s.l.], v. 619, p. 299–304, 2001.

OYAMA, D. et al. One-pot synthesis of cis-bis(2,2'- bipyridine)carbonylruthenium(II) complexes from a carbonato precursor: X-ray crystal structures and electron transfer processes of the series complexes. **Journal of Coordination Chemistry**, [s.l.], v. 65, p. 78–86, 2012.

PAILLOUS, N.; VICENDO, P. Mechanisms of photosensitized DNA cleavage. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, [s.l.], v. 20, p. 203–209, 1993.

PANDEY, K., K. Transition metal nitrosyls in pollution control in organic synthesis and in pollution control. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 51, p. 69–98, 1983.

PATALENSZKI, J. et al. Half-sandwich complexes of ruthenium, osmium, rhodium and iridium with dl-methionine or S-methyl-l-cysteine: A solid state and solution equilibrium study. **RSC Advances**, [s.l.], v. 5, p. 8094–8107, 2015.

PATHWAYS, A. et al. Carbon Monoxide Protects Against Cardiac Ischemia–Reperfusion Injury In Vivo via MAPK and Akt– eNOS Pathways. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, [s.l.], p. 1848–1853, 2004.

PAVIA, D. L. **Introdução a espectroscopia**. 4. ed. Washington: Cengage Learning, 2010.

PITIÉ, M.; PRATVIEL, G. Activation of DNA carbon - Hydrogen bonds by metal complexes. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 110, p. 1018–1059, 2010.

QUEIROZ, S. L. et al. The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: Ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylened. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 267, p. 209–221, 1998.

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug – DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 576, p. 49–60, 2015.

REISNER, E. et al. Isomeric [RuCl₂(dmsO)₂(indazole)₂] complexes: ruthenium(II)-mediated coupling reaction of acetonitrile with 1H-indazole. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 2, p. 2355–2364, 2005.

RICCARDI, C. et al. Ru III Complexes for Anticancer Therapy : The Importance of Being Nucleolipidic. **European Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 2017, p. 1100–1119, 2017.

RIMMER, R. D.; PIERRI, A. E.; FORD, P. C. Photochemically activated carbon monoxide release for biological targets . Toward developing air-stable photoCORMs labilized by visible light. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 256, p. 1509–1519, 2012.

RIORDAN, K. O.; AKILOV, O. E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s.l.], v. 2, p. 247–262, 2005.

ROSE, J. M; MASCHARAK, K. P. Photoactive Ruthenium Nitrosyls: Effects of Light and Potential Application as NO Donors. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 252, p. 2093–2114, 2008.

- SALASSA, L. et al. EXAFS, DFT, light-induced nucleobase binding, and cytotoxicity of the photoactive complex cis-[Ru(bpy)₂(CO)Cl]⁺. **Organometallics**, [s.l.], v. 29, p. 6703–6710, 2010.
- SANTOS, E. R. et al. Cytotoxic activity and structural features of Ru (II)/ phosphine / amino acid complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 182, p. 48–60, 2018.
- SANTOS, V. N. et al. Study of a gold electrode modified by trans - [Ru (NH 3) 4 (Ist) SO 4] + to produce an electrochemical sensor for nitric oxide. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 56, p. 5686–5692, 2011.
- SAUAIA, G. et al. Use of HPLC in the identification of cis and crystal structure of cis - [Ru(H₂O)₂(bpy)₂](PF₆)₂. **Inorganic Chemistry Communications**, [s.l.], v. 6, p. 864–868, 2003.
- SCHATZCHNEIDER, U.; METZLER-NOLTE, N. **Bioinorganic Chemistry: A Practical Course**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009.
- SCHATZSCHNEIDER, U. Novel lead structures and activation mechanisms for CO-releasing molecules (CORMs). **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], p. 1638–1650, 2015.
- SERLI, B. et al. Coordination and release of NO by ruthenium-dimethylsulfoxide complexes - Implications for antimetastases activity. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 245, p. 73–83, 2003.
- SHELDRICK, G. M. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. **Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography**, [s.l.], v. 71, p. 3–8, 2015.
- SHEN, J. et al. A Liposome Encapsulated Ruthenium Polypyridine Complex as a Theranostic Platform for Triple-Negative Breast Cancer. **Nano Letters**, [s.l.], v. 17, p. 2913–2920, 2017.
- SIGMAN, D. Chemical Nucleases: New Reagents In Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, [s.l.], v. 59, p. 207–236, 1990.
- SILVA, F. O. N. **Estudo cinético da reação dos complexos cis-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ e cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)](PF₆) com redutores biológicos**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2008.
- SILVA, H. V. R. et al. Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, [s.l.], v. 144, p. 55–65, 2018.
- SILVA, J. J. N. et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas ' s disease : enzyme inhibition and in vitro / in vivo trypanocidal activity. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 160, p. 260–269, 2010.
- SILVA, M. DO S. DE P. et al. Synthesis and physical properties of ruthenium bipyridine complexes with TCNQ and TCNE ligands. **Polyhedron**, [s.l.], v. 28, p. 661–664, 2009.
- SIRACUSA, R. et al. Carbon Monoxide : from Poison to Clinical Trials. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 42, p. 329–339, 2021.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 124, p. 1–19, 2013.

- SMITH, N. A. et al. Combatting AMR: photoactivatable ruthenium(ii)-isoniazid complex exhibits rapid selective antimycobacterial activity. **Chemical Science**, [s.l], v. 8, p. 395–404, 2016.
- SNYDER, D. S.; MCINTOSH, T. J. The lipopolysaccharide barrier: Correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. **Biochemistry**, [s.l], v. 39, p. 11777–11787, 2000.
- SOUSA, A. P. A Potential Visible-Light NO Releaser: Synthesis, Reactivity and Vasodilator Properties. **Journal of Brazilian Chemical Society**, [s.l], v. 28, p. 2117–2129, 2017.
- SOUSA, A. P. DE et al. Antimicrobial activity of cis - [Ru (bpy) 2 (L) (L 0)] n + complexes , where L = 4- (4-chlorobenzoyl) pyridine or 4- (benzoyl) pyridine and L 0 = Cl À or CO. **Polyhedron**, [s.l], v. 144, p. 88–94, 2018.
- SPINGLER, B. et al. Some thoughts about the single crystal growth of small molecules. **Crystal Engineering Communications**, [s.l], v. 14, p. 751–757, 2012.
- STRIEGEL, A. M. et al. **Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography**. [s.l.] Wiley, 2009.
- TANAKA, H. et al. Comparative Study on Crystal Structures of [Ru(bpy)₂(CO)₂](PF₆)₂, [Ru(bpy)₂(CO)(C(O)OCH₃)]B(C₆H₅)₄ CH₃CN, and [Ru(bpyh(CO)(CO₂)]₃H₂O (bpy 2,2'-Bipyridyl). **Inorganic Chemistry**, [s.l], v. 32, p. 1508–1512, 1993.
- TANIELIAN, C.; WOLFF, C.; ESCH, M. Singlet oxygen production in water: Aggregation and charge-transfer effects. **Journal of Physical Chemistry**, [s.l], v. 100, p. 6555–6560, 1996.
- TAUCHMAN, J. et al. Arene ruthenium complexes with phosphinoferrrocene amino acid conjugates: Synthesis, characterization and cytotoxicity. **Journal of Organometallic Chemistry**, [s.l], v. 723, p. 233–238, 2013.
- TAVARES, A. F. N.; NOBRE, L. S.; SARAIVA, L. M. A role for reactive oxygen species in the antibacterial properties of carbon monoxide-releasing molecules. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l], v. 336, p. 1–10, 2012.
- TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, [s.l], v. 61, p. 748–755, 1968.
- THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide : Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, [s.l], v. 45, p. 18–31, 2008.
- TOMA, H. E. **Química de coordenação, organometálica e catálise. Volume 4**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2016.
- VAN WAMEL, W. J. B. Staphylococcus aureus infections, some second thoughts. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s.l], v. 30, p. 303–308, 2017.
- VÍTEK, L. et al. Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, p. 369–375, 2014.
- WADT, W. R. et al. Ab initio effective core potentials for molecular calculations . Potentials for main group elements Na to Bi Ab Initio effective core potentials for molecular calculations . Potentials for main group elements Na to Bi. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l], v. 82, p. 284–298, 1985.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 42, p. 13–28, 1998.

WALSH, J. L.; DURHAM, B. Trans Isomers of Ruthenium (II) Complexes Containing Two Bipyridine Ligands. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 21, p. 329–332, 1982.

WARD, J. S. et al. Visible-Light-Induced CO Release from a Therapeutically Viable Tryptophan-Derived Manganese (I) Carbonyl (TryptoCORM) Exhibiting Potent Inhibition against E . coli. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 20, p. 15061–15068, 2014.

WAREHAM, L. K. et al. The Broad-Spectrum Antimicrobial Potential of [Mn(CO) 4 (S 2 CNMe(CH 2 CO 2 H))], a Water-Soluble CO-Releasing Molecule (CORM-401): Intracellular Accumulation, Transcriptomic and Statistical Analyses, and Membrane Polarization. **Antioxidants and Redox Signaling**, [s.l.], v. 28, p. 1286–1308, 2018.

YAN, H. et al. Emerging Delivery Strategies of Carbon Monoxide for Therapeutic Applications: from CO Gas to CO Releasing Nanomaterials. **Small**, [s.l.], v. 15, p. 1–22, 2019.

YANG, Y., QI, P.K., YANG, Z.L., HUANG, N. Nitric oxide based strategies for applications of biomedical devices. **Biosurface and Biotribology**, [s.l.], p. 177–201, 2015.

YOSHIDA, S. et al. Effect of combination therapy with a methionine-mitomycin C conjugate and a methionine-deficient diet on tumor growth. **In Vivo**, [s.l.], v. 12, p. 351–355, 1998.

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 7345, p. 4565–4579, 2007.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s.l.], v. 7, p. 481–489, 2003.