



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Projeto Final de Curso
IQWX01

**NANOPARTÍCULAS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ FUNCIONALIZADAS COM COMPLEXO DE
RUTÊNIO: UMA POTENCIAL Sonda DE IMAGEAMENTO CELULAR**

Gustavo Henrique Correia dos Santos

Rio de Janeiro
2019

**NANOPARTÍCULAS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ FUNCIONALIZADAS COM COMPLEXO DE
RUTÊNIO: UMA POTENCIAL Sonda DE IMAGEAMENTO CELULAR**

Gustavo Henrique Correia dos Santos

Projeto final de curso apresentado como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação de Nanci Câmara de Lucas Garden e Rodolfo Inêz Teixeira.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Rio de Janeiro
2019

Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ funcionalizadas com complexos de rutênio: uma potencial sonda de imageamento celular”, defendido por Gustavo Henrique Correia dos Santos, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

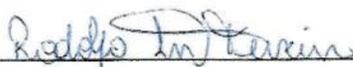
Aprovado por:



Profª Dra. Nanci Câmara de Lucas Garden

Orientadora

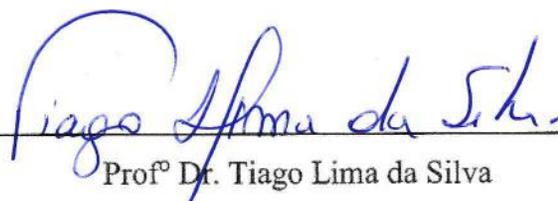
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Rodolfo Inêz Teixeira

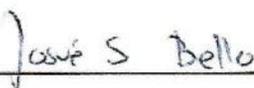
Orientador

Universidade Federal do Rio de Janeiro



Profº Dr. Tiago Lima da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro



Profº Dr. Josue Sebastián Bello Forero

Universidade Federal do Rio de Janeiro

“O mundo inteiro somos eu e você.”

Elizabeth Garton Scanlon, em *O mundo inteiro*.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a minha mãe Glorinha e minha irmã Giselle por presentear, uma criança curiosa com um incrível microscópio de brinquedo, o que possibilitou alimentar ainda mais sua curiosidade e permitiu que fosse dado o primeiro passo direto para a realização do presente trabalho, lá em 2003. Junto ao meu irmão Diego e meu pai Sérgio, compõem um núcleo familiar que forneceu o suporte que tornou possível a minha formação.

À Beatriz Alves de Araujo, a pessoa que mais esteve comigo ao longo desses seis anos de graduação. Seriam necessários muito mais do que gráficos, quadros e tabelas para agradecer tudo que fez por mim ao longo desse tempo. Agradeço por aturar as minhas crises, dar suporte emocional necessário para estar de pé hoje e se preocupar comigo mais do que eu. Beatriz me ajuda a compreender o que é a vida e a lidar com essa questão. É uma honra compartilhar o breve período da existência com uma pessoa tão fantástica. Mais uma vez, obrigado por tudo.

A Rafael de Paula Campos e Maira Nudelman, pessoas incríveis com quem tive a oportunidade de conviver um período de tempo menor do que gostaria no Instituto de Química, e que deixaram uma saudade imensa.

Aos amigos Alex, Rabelo, Marcos, Priori, Igor, Thaissa, Luis, Marcos, Roger, Juliana, Kleber, Camilla, Magé, Bruno, Xavier, Dantas, Julia, Juliana, Ana, Ramon, Paulo, Amanda, Pedro, Bixete, Toca, Karol, Glauber, Douglas, Jaime, Geisa, Janela, Tarouq, Marcela, Lucão, Rodrigo e mais um monte de gente que eu esqueci. Mais do que conhecimento, nos últimos seis anos acumulei muitos amigos. Pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a produção de conhecimento aqui documentado, seja com conselhos, apoio técnico ou sorrisos.

Aos professores Marchiori, Lucidalva e Tiago, pelo conhecimento transmitido e pelos exemplos de profissionalismo e humanidade.

À toda estrutura de permanência estudantil que me garantiu estar na universidade. Sem políticas de assistência estudantil não haveria esse trabalho.

Aos meus orientadores Prof^a Dra. Nanci Câmara de Lucas Garden e Rodolfo Inêz Teixeira, que acreditaram no meu potencial e reservaram boa parte de seus tempos curtos para tornar possível esse projeto. Desempenharam com maestria a função de orientação que superou muito as minhas expectativas. Muito Obrigado por me conduzir à realização desse trabalho incrível.

Ao Laboratório de Fotoquímica David E. Nicodem, pelo ambiente de crescimento profissional fantástico que é.

À Plataforma Analítica da Farmanguinhos-Fiocruz por permitir a obtenção de espectros de massas de alta resolução.

Ao Laboratório de Infravermelho do Instituto de Química pelas análises de infravermelho.

Ao Laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear de Líquidos do Instituto de Química pela obtenção dos dados de RMN.

Ao Laboratório de Difração de Raios-X pela obtenção dos dados de Difração de Raios X.

Por fim, à comunidade do Instituto de Química pela estrutura e sobretudo, pelo acolhimento.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: NANOPARTÍCULAS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ FUNCIONALIZADAS COM COMPLEXO DE RUTÊNIO: UMA POTENCIAL Sonda DE IMAGEAMENTO CELULAR

ALUNO: Gustavo Henrique Correia dos Santos

ORIENTADORES: Nanci Câmara de Lucas Garden (DQO – Instituto de Química – UFRJ) e Rodolfo Inêz Teixeira (PGQu – Instituto de Química – UFRJ).

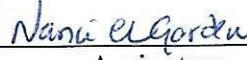
DATA DA DEFESA: 13/08/2019

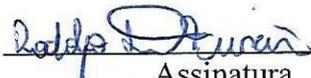
PALAVRAS-CHAVE: Fotofísica, fluorescência, complexo de rutênio, imageamento celular

Este trabalho descreve a síntese e caracterização do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$, bem como o estudo de suas propriedades fotofísicas em solução, comparando-as com as propriedades em estado sólido e quando ligado à superfície de nanopartículas de Fe_3O_4 encapsulada com SiO_2 , discutindo os resultados sob a perspectiva da aplicação desse composto em imageamento celular. De acordo com espectros de emissão e de absorção de luz na região do UV-Visível e Ressonância Magnética Nuclear, o trabalho propõe que o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}]^{2+}$ sofre mudanças estruturais em solução, que interferem em seu perfil de emissão, promovendo duas emissões de transferência de carga do metal para o ligante, quando excitado em 430 nm, provenientes de espécies distintas, uma banda de emissão em torno de 580 nm e outra em torno de 800 nm. Tais alterações são sensíveis à polaridade do solvente e ao pH do meio. O estudo exhibe resultados que indicam que apenas a forma emissiva em 800 nm está presente em estado sólido, enquanto se ligado à superfície da nanopartícula apresenta a outra forma, que emite em 580 nm.

Autorizamos a divulgação no Repositório Institucional da UFRJ-Pantheon.

Aluno: 
Assinatura

Orientadora: 
Assinatura

Orientador: 
Assinatura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo Geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1	Materiais	8
3.2	Síntese do 4-(piridil-2-metileno)amino)anilina (4PMAA)	8
3.3	Síntese do [Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂	9
3.4	Síntese da Fe₃O₄@SiO₂-[Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂	10
3.4.1	Síntese de Fe₃O₄@SiO₂	10
3.4.2	Funcionalização de Fe₃O₄@SiO₂	11
3.4.2.1	Fe₃O₄@SiO₂-NH₂	11
3.4.2.2	Fe₃O₄@SiO₂-COOH	11
3.4.2.3	Fe₃O₄@SiO₂-Ru	11
3.5	Caracterização Fotofísica	12
3.5.1	Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível	12
3.5.2	Espectroscopia de refletância difusa no estado sólido na região do UV-Visível 13	
3.5.3	Espectroscopia de emissão	13
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1	Síntese e caracterização de [Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂	14
4.2	Síntese e caracterização de Fe₃O₄@SiO₂-[Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂	17
4.3	Caracterização Fotofísica	24
5	CONCLUSÕES	36
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7	ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de estrutura cristalina de Fe_3O_4 . (adaptado de CALLISTER, 2007)	2
Figura 2. Complexos de rutênio em fase de testes clínicos.	4
Figura 3. Complexos de rutênio estudados como possíveis fármacos teranósticos.	5
Figura 4. Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	7
Figura 5. Reação de formação do 4PMAA	9
Figura 6. Reação de formação do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	10
Figura 7. Formação do $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	11
Figura 8. Síntese de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	12
Figura 9. Espectro FTIR de 4PMAA e $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	15
Figura 10. Representação do APTES ligado à $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	18
Figura 11. Representação da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -COOH	18
Figura 12. Representação da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	19
Figura 13. Difratoograma de pó para Fe_3O_4 (preto), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (azul) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - NH_2 (vermelho).	20
Figura 14. Espectros FTIR para Fe_3O_4 (preto), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (azul), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - NH_2 (vermelho), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -COOH (verde) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ (laranja).	21
Figura 15. Espectro de absorção dos complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ (preto), 2,2-bipiridina (vermelho), 4PMAA (verde) e $\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$ (azul)	24
Figura 16. Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes solventes.	25
Figura 17. Espectro de emissão normalizado em de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes solventes.	27
Figura 18. Espectros TRES de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em MeCN com excitação em 450nm..	29
Figura 19. Hipótese da alteração na esfera de coordenação de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$. ..	30
Figura 20. Espectro de emissão de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes valores de pH..	31
Figura 21. Espectro de emissão em estado sólido de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	32
Figura 22. Espectro de emissão normalizado de uma solução em MeCN $\sim 1 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ (preto) e $\sim 1 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ (azul) do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	32

Figura 23. Ampliação da região dos sinais de ^1H RMN do 4PMAA no complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO- d_6 (vermelho) e acetona- d_6 (azul).	34
Figura 24. Espectro de absorção (esquerda) e de emissão (direita) em estado sólido de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2-[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	35
Figura A1. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em água.	40
Figura A2. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em etanol.	41
Figura A3. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em acetona.	42
Figura A4. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em acetonitrila.	43
Figura A5. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DCM.	44
Figura A6. Espectro ^1H RMN de 4PMAA em DMSO- d_6	45
Figura A7. Espectro ^{13}C RMN de 4PMAA em DMSO- d_6	45
Figura A8. Espectro ^1H RMN de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO- d_6	46
Figura A9. Espectro ^{13}C RMN de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO- d_6	46
Figura A10. Espectro ^1H RMN de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em acetona- d_6	47
Figura A11. Espectro COSY de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO- d_6	47
Figura A12. Espectro HRMS de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	48
Figura A13. Espectro de refletância $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2-[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$	48
Figura A14. Espectro de emissão do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO.....	49
Figura A15. Decaimento do sinal de emissão em relação ao tempo monitorando no comprimento de onda de excitação (azul), em 574 nm (preto) e 770 nm(vermelho) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em MeCN.	49
Figura A16. Espectro FTIR de 4PMAA e PCAH.	50

Figura A17. Espectros FTIR ampliado na região de menor número de onda de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (azul), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (vermelho), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ (verde) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-[Ru(bipy)}_2\text{4PMAA)](PF}_6\text{)}_2$ (laranja). 50

Figura A18. Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo $\text{[Ru(bipy)}_2\text{4PMAA)](PF}_6\text{)}_2$ em diferentes solventes em diferentes valores de pH 51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Orientação dos momentos magnéticos dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} na Fe_3O_4	2
Tabela 2. Sinais de RMN do 4PMAA em DMSO- d_6	14
Tabela 3. Sinais de RMN do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO- d_6	16
Tabela 4. Estimativa de tamanho de partícula através da equação de Scherrer	21
Tabela 5. Sinais nos espectros de FTIR para (1) Fe_3O_4 , (2) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, (3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ e (4) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$, em que δ se refere à deformação e ν ao estiramento.	22
Tabela 6. $\log \epsilon$ dos comprimentos de onda de absorção máximos (λ_{max}) do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e do ligante 4PMAA em diferentes solventes.	26
Tabela 7. Comprimentos de onda máximos das emissões (λ_{em}) e valores de tempo de vida (τ).	28

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da tecnologia de nanomateriais nas últimas décadas tornou possível a utilização de nanomateriais em aplicações tecnológicas (AGHAZADEH; GANJALI, 2018) e médicas (WIERZBINSKI *et al.*, 2018). Muitos materiais têm sido constantemente estudados, contudo um considerável destaque tem sido dado às nanopartículas magnéticas, uma vez que suas propriedades magnéticas em conjunto com propriedades mesoscópicas mecânicas e térmicas fazem com que estas ofereçam alto potencial para diversas aplicações, tais como processos catalíticos, biomedicina e ressonância magnética (LAURENT *et al.*, 2008).

Diversas modificações vêm sendo realizadas para alterar as propriedades desses materiais dependendo das aplicações desejadas, tornando-os, por exemplo, biocompatíveis e biosseletivos (LAURENT *et al.*, 2008). Exemplos incluem sistemas do tipo *core-shell*, que no caso das nanopartículas magnéticas, principalmente de magnetita (Fe_3O_4), podem ser encapsuladas em sílica, polímeros ou metais nobres (ALCALÁ; REAL, 2006; LIN *et al.*, 2001; NGABONI OKASSA *et al.*, 2005). Uma vez que Fe_3O_4 sofre rápida biodegradação em meios celulares com valores de pH e concentrações salinas diferentes, nanopartículas desse material podem apresentar alta toxicidade (LI *et al.*, 2013). O encapsulamento com materiais biologicamente mais inertes, como SiO_2 , promove a diminuição do contato entre Fe_3O_4 e o meio intracelular, aumentando sua biocompatibilidade, fazendo com que os mecanismos de toxicidade da célula não sejam ativados. (LECHEVALLIER *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2013).

Dentre os óxidos de metais de transição com propriedades magnéticas, como os de níquel e de cobalto, os óxidos de ferro são os que apresentam menor toxicidade, além de serem os menos suscetíveis a oxidação (TARTAJ *et al.*, 2003). Em especial, as propriedades magnéticas intensas da Fe_3O_4 são provenientes da sua estrutura cristalina de espinélio inverso, em que os átomos de oxigênio apresentam estrutura cúbica compacta, formando sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B). O alinhamento espacial antiparalelo dos momentos magnéticos entre os íons Fe^{3+} e os íons Fe^{2+} na estrutura cristalina faz com que a magnetização resultante nesse caso seja nula. Contudo, os íons Fe^{2+} presentes nos outros sítios octaédricos não sofrem esse efeito de anulação, fazendo com que os momentos magnéticos desses íons estejam alinhados na mesma direção (Figura 1, Tabela 1). Como as propriedades magnéticas desse material está intrinsicamente ligada à sua estrutura cristalina, tais propriedades estão relacionadas a fatores morfológicos como tamanho e área superficial. A redução no tamanho desses materiais promove a criação de domínios magnéticos de

polarização em uma dada direção, dando origem a um material superparamagnético, que respondem eficientemente a presença de um campo magnético externo (CALLISTER, 2007).

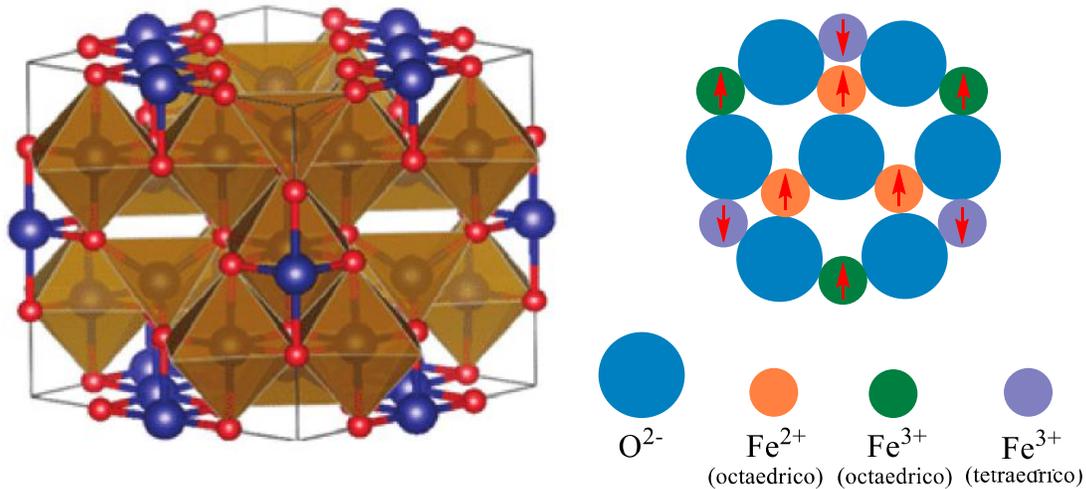


Figura 1. Esquemas da estrutura cristalina de Fe_3O_4 (adaptado de CALLISTER, 2007).

Tabela 1. Orientação dos momentos magnéticos dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} na Fe_3O_4 .

Cátion	Sítio Octaédrico	Sítio Tetraédrico	Resultante
Fe^{3+}	↑↑↑↑↑↑	↓↓↓↓↓↓	Cancelado
Fe^{2+}	↑↑↑↑↑↑	-	↑↑↑↑↑↑

Os sistemas de Fe_3O_4 encapsulados têm se mostrado relevantes no desenvolvimento de materiais para aplicações medicinais (KANDIBANDA *et al.*, 2018). Além disso, outras modificações podem ser feitas na superfície desses materiais como, por exemplo, a funcionalização da superfície por compostos orgânicos ou inorgânicos, fornecendo não só propriedades para a aplicação desejada, como uma melhor resistência a agregação magnética e aumento na absorção celular (LAURENT *et al.*, 2008). Neste contexto, uma classe que vem recebendo destaque são as nanopartículas que apresentam grupos luminescentes funcionalizados. Estas nanopartículas, denominadas luminomagnéticas, combinam as características individuais de cada sensor, cuja associação poderá ser utilizada para obtenção de imagens *in vivo* e *in vitro* tais como imagem por ressonância magnética (MRI, do ingles

Magnetic Resonance Imaging) e microscopia de fluorescência (DU *et al.*, 2017; LECHEVALLIER *et al.*, 2017; WIERZBINSKI *et al.*, 2018). Esses materiais multifuncionais podem ser utilizados em biomedicina ou nanomedicina, podendo servir como uma ferramenta simultânea de diagnóstico e terapia (LI *et al.*, 2013).

A técnica de microscopia de imagem por fluorescência resolvida no tempo (FLIM, do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) consiste na obtenção, ao longo do tempo, de múltiplos sinais de fluorescência geradas pela excitação de um determinado fluoróforo adicionado ao sistema (ELIZABETH BAGGALEY, JULIA A. WEINSTEIN, 2013). Em um primeiro momento um pulso de laser é incidido sobre uma determinada amostra e promove a excitação das moléculas presentes e posterior emissão do fluoróforo, além da emissão de possíveis espécies luminescentes presentes na amostra, conhecida como autofluorescência. Se o tempo de vida da emissão do fluoróforo for suficientemente mais longo que o tempo da autofluorescência, é possível separar os dois sinais de emissão. Se o processamento dos múltiplos sinais de emissão for realizado com resolução temporal da ordem de microssegundos, ou centenas de nanossegundos, é possível então separar a autofluorescência da amostra da emissão do fluoróforo adicionado, tornando viável a produção de uma imagem onde quer que o fluoróforo esteja localizado na amostra (ELIZABETH BAGGALEY, JULIA A. WEINSTEIN, 2013). Complexos polipiridínicos de rutênio em geral apresentam fotoestabilidade e longos tempos de vida de luminescência na região do visível (>100 ns), característicos de emissões de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, do inglês *Metal to Ligand Charge Transfer*) (KO *et al.*, 2019), tornando-os bons candidatos para que sejam utilizados na obtenção de imagens por FLIM.

Modificações na estrutura dos fluoróforos de forma a otimizar determinados parâmetros na obtenção de imagens por FLIM é uma outra vantagem dos complexos metálicos para este tipo de aplicação, dada a facilidade destes compostos em coordenar diferentes ligantes em uma configuração tridimensional precisa. Desta forma, é possível, alterar a estrutura de um complexo para, por exemplo, que sua emissão esteja no comprimento de onda de maior permeabilidade da matriz, como na região do vermelho ou infravermelho, aumentando assim a intensidade do sinal gerado e melhorando a qualidade da imagem obtida. Outro exemplo reside em modificações que possam aumentar a afinidade do fluoróforo por determinada região celular a ser estudada, de forma a se obter imagens de certas estruturas celular internas, como mitocôndrias, ou mesmo detectar a presença localizada de determinada espécie. Dessa forma, complexos de rutênio se apresentam como uma alternativa atrativa para esta aplicação, uma vez que sua complexidade molecular pode fornecer a modulação de

parâmetros desejáveis para um bom fluoróforo na FLIM (ELIZABETH BAGGALEY, JULIA A. WEINSTEIN, 2013).

No contexto de imageamento de células, a FLIM é uma técnica poderosa para obtenção de imagens de tumores *in vivo*, o que permite acompanhar regressão de câncer. Complexos polipiridínicos de rutênio já são utilizados no imageamento de tumores *in vivo* e na determinação de concentração de O₂ utilizando FLIM (FOSTER *et al.*, 2009). Além disso, os complexos deste tipo têm sido amplamente estudados como candidatos a drogas anticâncer. Como resultado, recentemente o primeiro complexo de rutênio (NAMI-A, Figura 2) foi liberado para testes clínicos para tratamento de câncer, como câncer de mama e de próstata. Porém sua baixa resposta terapêutica resultou na paralisação dos estudos clínicos (BACAC *et al.*, 2004; ZENG *et al.*, 2017). Atualmente, outros complexos como TLD-1433, KP1019 e o KP1319 (Figura 2) vem apresentando bons resultados em testes clínicos (BYTZEK *et al.*, 2016; GROESSL *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2017).

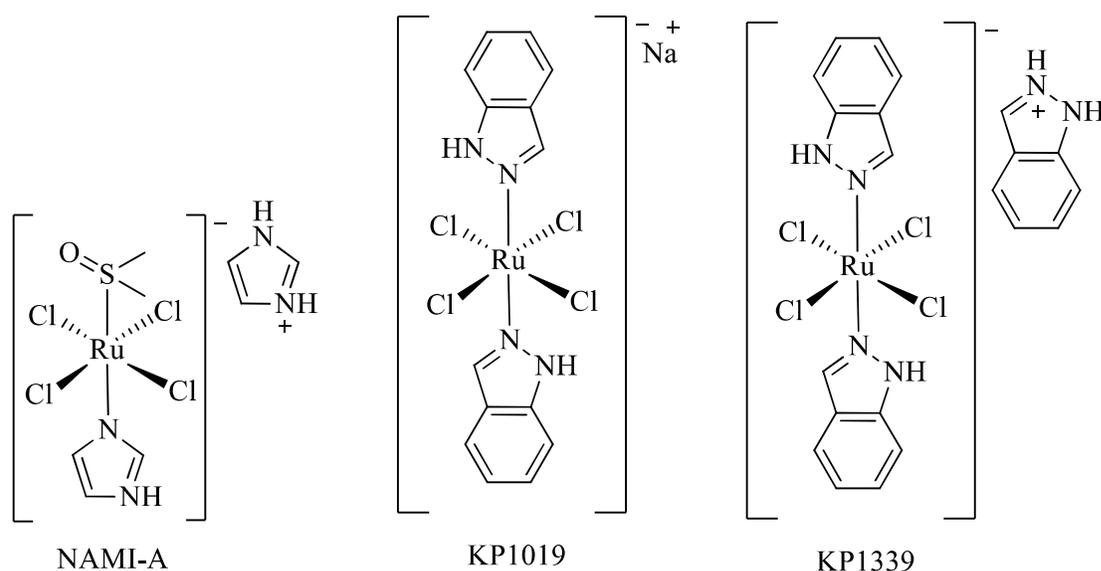


Figura 2. Complexos de rutênio em fase de testes clínicos.

A possibilidade de imageamento celular dos complexos de rutênio associado com seu potencial farmacológico permite que esses complexos possam atuar ao mesmo tempo como ferramenta terapêutica e diagnóstica, em um conceito conhecido como Teranóstica (FOSTER *et al.*, 2009; TSUI *et al.*, 2015, ZHAO *et al.*, 2019). Uma outra vantagem deste método, e que ao utilizar uma mesma substância como ferramenta terapêutica e diagnóstica anula a

possibilidade de efeitos causados pela interação entre uma droga e um agente de diagnóstico. Uma gama de complexos de rutênio desta classe tem sido estudados como fármacos teranósticos, dois exemplos se encontram na figura 3 (FOSTER *et al.*, 2009; TSUI *et al.*, 2015).

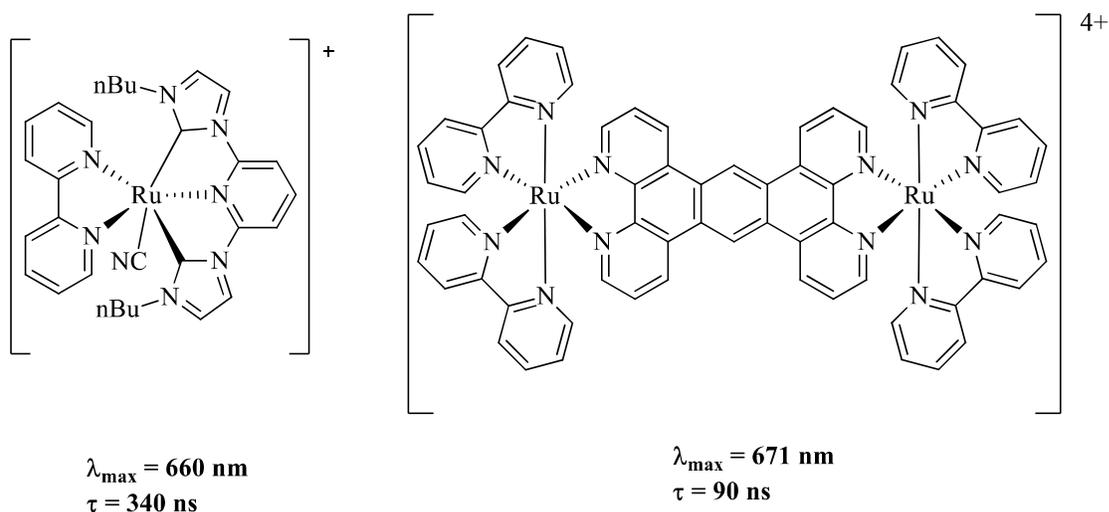


Figura 3. Complexos de rutênio estudados como possíveis fármacos teranósticos.

Muitas vezes a toxicidade dos complexos de rutênio e a dificuldade na liberação localizada são uma barreira para o uso desta substância em aplicações diagnósticas e terapêuticas. Entretanto, uma estratégia para carrear medicamento para sua área de atuação têm sido a utilização de nanopartículas magnéticas com moléculas de interesse suportadas em sua superfície. Com isso, é possível acumular o medicamento na área desejada com a aplicação de um campo magnético na região, evitando o problema de toxicidade e fixando o princípio ativo. É frequente a utilização de nanopartículas de Fe_3O_4 , em virtude da sua natureza superparamagnética, contudo recoberta com uma camada de SiO_2 para uma menor toxicidade (LAURENT *et al.*, 2008). No contexto apresentado anteriormente, com as devidas modificações é possível suportar uma nanopartícula de Fe_3O_4 com complexos de rutênio e dar origem a uma sonda luminescente que pode ser direcionada onde se aponta um campo magnético, produzindo uma ação localizada.

Neste sentido, o presente trabalho visa o estudo das características fotofísicas de um complexo de rutênio livre e funcionalizado em nanopartículas *core-shell* $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. O grupo $-\text{NH}_2$ do ligante 4-((piridin-2-ilmetileno)amino)anilina (4PMAA), permite a ligação do complexo à superfície da nanopartículas através da formação de uma amida. Complexos semelhantes já foram relatados na literatura (HOTZE *et al.*, 2006; MARJANI *et al.*, 2009; LEE; LEE, 2019), contudo suas propriedades fotofísicas ainda não foram bem exploradas, tampouco quando funcionalizadas em superfícies de nanopartículas. A relativa simplicidade da estrutura do complexo, apresenta uma boa plataforma para estudo da fotofísica desse tipo de sistema para tal aplicação. À luz da utilização de complexos como esse como ferramenta teranóstica, a compreensão de sua fotofísica é grande importância assim como entender as modificações nas propriedades fotofísicas quando ligado à superfície da nanopartículas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral sintetizar, caracterizar e analisar as propriedades fotofísicas do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ (Figura 4) livre e suportado em uma nanopartícula core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ sob a perspectiva de utilização deste material como sonda de imageamento celular.

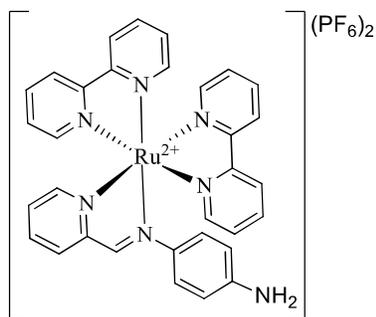


Figura 4. Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$

2.2. Objetivo Específicos

- Sintetizar e caracterizar o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$.
- Estudar em solução e em estado sólido as propriedades espectroscópicas (absorção, emissão e tempo de vida de emissão) do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$.
- Sintetizar nanopartícula *core-shell* $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e funcionalizar com o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$.
- Estudar as propriedades espectroscópicas (absorção, emissão, tempo de vida de emissão) da nanopartícula funcionalizada no estado sólido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os principais solventes e/ou reagentes utilizados durante o procedimento experimental como: acetonitrila (MeCN), etanol (EtOH), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), Tolueno, Diclorometano (DCM), foram grau PA obtidos pelos fornecedores VETEC[®] ou TEDIA[®] e utilizados sem purificação prévia. Os principais solventes utilizado na parte espectroscópica como: Acetona, acetonitrila (MeCN), diclorometano (DCM), metanol (MeOH), etanol (EtOH) e dimetilsulfóxido (DMSO), foram grau UV/HPLC obtidos pela TEDIA[®] e utilizados sem purificação prévia. Os reagentes aldeído picolínico (PCAH), *p*-aminoanilina (pFDA), KPF₆, ácido oleico, tetraetilortosilicato (TEOS), (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES), anidrido succínico, FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O e *N,N'*-dodiclohexilcarbodiimida (DCC). Os reagentes foram obtidos pelos fornecedores Sigma Aldrich[®] e usados sem purificação. O reagente Ru(bipy)₂Cl₂ foi previamente sintetizado pelo grupo de acordo com procedimento da literatura (SULLIVAN; SALMON; MEYER, 1978).

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C e COSY foram realizados em espectrômetro BRUKER DPX 200, 300 e 500 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são referidos em partes por milhão (ppm) a partir do padrão interno tetrametilsilano (TMS). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica. Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos pelo Laboratório de Infravermelho do departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da UFRJ utilizando um espectroscópio de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) Nicolet 505 Magma. Os espectros de FTIR foram obtidos em pastilha de KBr. As análises de DRX foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios-X do departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da UFRJ, utilizando difratômetro Ultima IV (Rigaku) com filtro de Ni e radiação de emissão Kα do Cu (0,1542 nm). Os espectros de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*) foram feitos pelo Laboratório de Espectrometria de Massas da Fiocruz.

3.2. Síntese do 4-(piridil-2-metileno)amino)anilina (4PMAA)

Na síntese do 4PMAA foi adotado o procedimento adaptado do descrito por K. Marjani *et al* (MARJANI; MOUSAVI; NAMAZIAN, 2011).

Uma solução de 4,34 g de picolinaldeído (PCAH; 41 mmol) em 30 mL de etanol foi misturada a uma solução de 4,54 g *p*-fenilenodiamina (42 mmol) em 40 mL de etanol em um balão de 250 mL. A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente e a reação foi acompanhada por cromatografia de camada fina (CCF). Ao longo da reação observou-se formação de precipitado. Após 1,5 horas não foi mais observado mais o reagente PCAH na CCF e a reação foi encerrada, formando um precipitado amarelo que foi filtrado e lavado com 20 mL de etanol a frio. O sólido foi recristalizado utilizando 5 mL de benzeno obtendo-se cristais amarelos (7,59g; 38,5 mmol; rendimento: 95%). O produto foi caracterizado por FTIR, ^1H RMN e ^{13}C RMN.

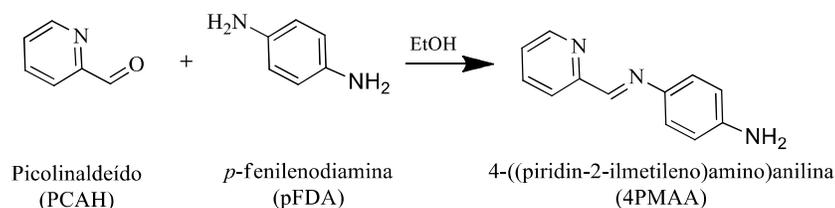


Figura 5. Reação de formação do 4PMAA

3.3. Síntese do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$

A uma solução de 0,4079 g de 4PMAA (2,1 mmol) em 10 mL de EtOH:H₂O 1:1, em um balão de 100 mL, foi adicionada gota-a-gota 50 mL de uma solução de 0,8770 g de Ru(bipy)₂Cl₂ (1,8 mmol) em EtOH:H₂O 1:1. A reação foi mantida em refluxo sob agitação por 3 horas e em seguida foi adicionada solução aquosa saturada de 1,0029 g de KPF₆ e a mistura foi mantida em aquecimento sob agitação por 30 min, que após resfriada até temperatura ambiente, dando origem a um precipitado marrom. O solvente foi reduzido em evaporador rotatório e o precipitado foi filtrado e lavado com água gelada. O sólido obtido foi seco ao ar, ressolubilizado em 20 mL de acetona e, em seguida, tolueno foi adicionado até precipitação do complexo. O sólido obtido foi filtrado e recristalizado em 10 mL de acetona dando origem a 1,5440 g (1,71 mmol, 95%) de cristais castanhos laminares. O sólido foi caracterizado por FTIR, ^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY, e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*).

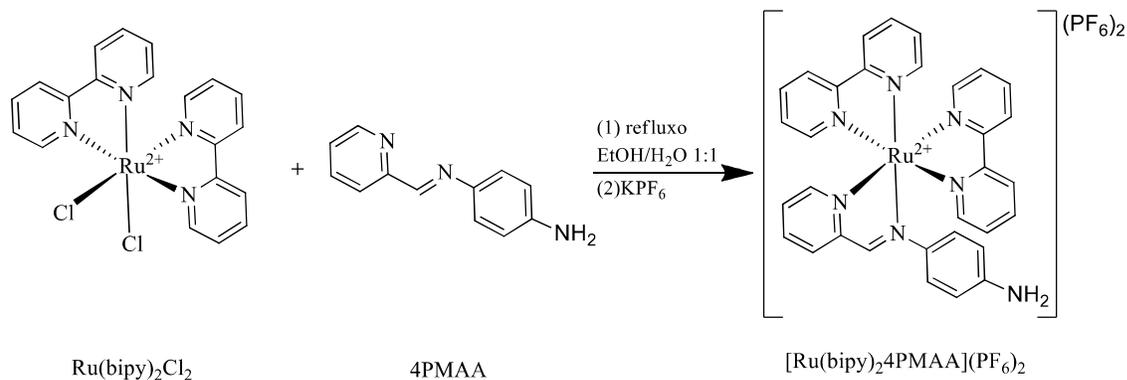


Figura 6. Reação de formação do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$.

3.4. Síntese da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$

3.4.1. Síntese de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

A síntese de nanopartículas de magnetita foi realizada a partir do método de coprecipitação de Fe^{3+} e Fe^{2+} em meio básico, utilizando ácido oleico como surfactante. O procedimento foi adaptado da literatura (HE *et al.*, 2005). Em um balão de 100mL, 1,3527 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5,00 mmol) e 0,69488 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,50 mmol) foram dissolvidos em 50 mL de uma mistura (1:1) de etanol e água deionizada previamente desoxigenados utilizando argônio. A esta mistura, mantida sob atmosfera de argônio, foram adicionados 2 mL de ácido oleico e em seguida 10 mL de $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq.})}$ (30% m/m). Um precipitado preto foi formado instantaneamente. A mistura foi mantida em agitação magnética e sob atmosfera de argônio por 45 minutos. O sólido foi separado magneticamente, lavado com etanol, água e novamente com etanol, e em seguida seco a pressão reduzida. O sólido seco foi caracterizado por FTIR e DRX.

Para a formação da camada de sílica em torno da nanopartícula magnética, as nanopartículas de magnetita foram lavadas com EtOH e o sólido foi redisperso usando ultrassom em uma mistura desoxigenada de EtOH:H₂O (3:1) contendo 2 mL de ácido oleico. Após ajustar o pH da mistura para 9 utilizando amônia, foram adicionados 4 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) e a reação foi mantida a 50 °C por 10 horas e por mais 13 horas sob agitação a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio. O sólido foi separado magneticamente, lavado com EtOH, seco em pressão reduzida e caracterizada por FTIR e DRX.

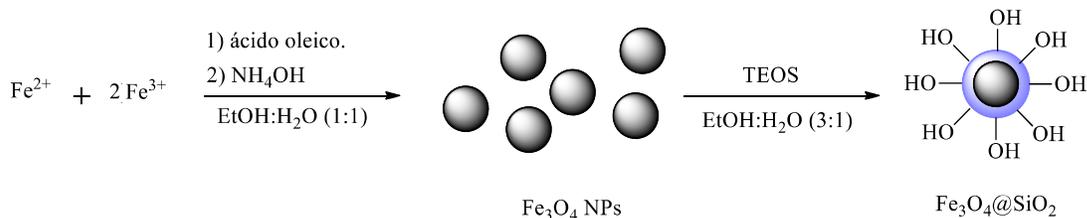


Figura 7. Formação do $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

3.4.2. Funcionalização de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

3.4.2.1. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

O sólido obtido na sessão foi transferido para um balão de 250 mL e lavado com dimetilformamida (DMF). O sólido foi então redisperso em 200 mL de uma mistura DMF:tolueno (2:1) utilizando ultrassom e a mistura foi deoxigenada por passagem de argônio. A esta mistura foram adicionados 8 mL de (3-aminopropil)-trietoxissilano (APTES) gota a gota e a mistura mantida sob refluxo e agitação por 26 horas. Ao fim da reação o sólido foi separado magneticamente, seco em pressão reduzida e caracterizado por FTIR e DRX.

3.4.2.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$

A nanopartícula funcionalizada com grupos amino obtida previamente ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) foi transferida para um balão de 500 mL, lavada duas vezes com etanol e redispersa em 200 mL de uma mistura EtOH:H₂O (1:1) utilizando ultrassom e aquecida em refluxo por 1 hora. A suspensão foi resfriada a temperatura ambiente, levada a ultrassom por 15 minutos, e em seguida foram adicionados 4,7883 g de anidrido succínico. A reação foi mantida sob agitação em atmosfera de argônio por 24 horas. Ao fim da reação o sólido foi separado magneticamente, seco em pressão reduzida e caracterizado por FTIR.

3.4.2.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ru}$

A nanopartícula funcionalizada com grupo carboxílico obtida previamente ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$), foi lavada duas vezes com etanol, duas vezes com diclorometano (DCM) e redispersa em DCM. Foram adicionados 1,0313 g de *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida

(DCC). A suspensão foi mantida por 20 horas em refluxo e sob atmosfera de argônio. Em seguida o sólido foi separado magneticamente, lavado com DCM e redisperso em DCM. Foram adicionados 0,3003 g de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e a reação foi mantida em refluxo sob agitação por mais 24 horas. Ao fim da reação todo material foi separado magneticamente e lavado duas vezes com acetona e seco em pressão reduzida. Houve mudança na coloração do material. Em seguida o material foi lavado com acetona em aparelho de Soxhlet por 48 horas. Foram obtidos 0,0893 g de um sólido alaranjado, que foi caracterizado por FTIR e refletância difusa.

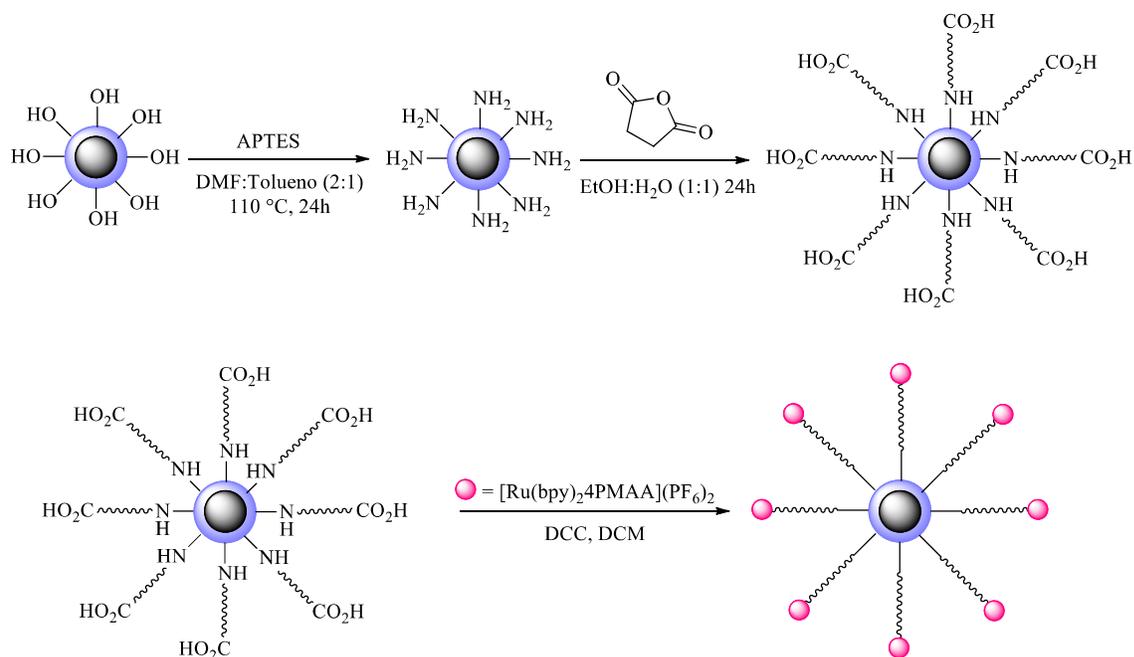


Figura 8. Síntese de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$

3.5. Caracterização Fotofísica

3.5.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível

Os espectros de absorção na região do UV-Visível foram registrados em um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-2450. Para tal, foram utilizados os solventes água, etanol, acetona, acetonitrila e diclorometano, nos quais foram obtidos os coeficientes de absorvidade molar (ϵ) para os máximos de absorvância, tanto para 4PMAA quanto para o

complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$, de acordo com a lei de Lambert-Beer. Além disso, também foram obtidos os espectros em diferentes valores de pH utilizando solução tampão universal para os valores de pH 4, 6, 8 e 10, preparadas a partir de H_3PO_4 , H_3BO_3 , ácido acético e NaOH (LURIE, 1975), e tampão PBS comercial para o pH 7.

3.5.2. Espectroscopia de refletância difusa na região do UV-Visível

Os espectros de refletância difusa para o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e para as nanopartículas funcionalizadas, foram registrados em um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-2450 equipado com ISR-240A para medidas de refletância difusa. Para tal foi utilizado BaSO_4 como padrão de refletância.

3.5.3. Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão foram registrados em um fluorímetro Edinburgh Instruments FS5. Para o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ foram utilizados os solventes água, etanol, acetona, acetonitrila e diclorometano com excitação em torno de 430 nm. Também foram obtidos espectros de emissão em soluções aquosas valores de pH variados, utilizando solução tampão universal, preparadas a partir de H_3PO_4 , H_3BO_3 , ácido acético e NaOH. Além disso, foram registrados os espectros de excitação para as emissões em 575 e 780 nm. Também foram registrados os espectros de emissão no estado sólido da nanopartículas funcionalizada com o $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$. As medidas no estado sólido foram registradas utilizando fluorímetro Edinburgh Instruments modelo FS5 acoplado com suporte para amostras sólidas SC-10 em configuração *front-face*.

Foram obtidos tempos de vida das emissões em espectrômetro Edinburgh Instruments modelo F980. Os decaimentos de fluorescência foram monitorados a temperatura ambiente utilizando espectrofluorímetro Edinburgh Instruments modelo F980 e excitação com laser modelo Fianium WhiteLase da NKT Photonics. Os valores de tempo de vida foram obtidos a partir do sinal de decaimento de emissão monoexponencial, monitorado nos comprimentos de onda máximos de emissão, utilizando o *software* do equipamento para analisar e minimizar os valores de χ^2 .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e caracterização de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$

A síntese do ligante 4-(piridina-2-ilmetileno)amino)anilina (4PMAA) gerou um produto amarelo com bom rendimento (95%) e seus espectros de RMN e FTIR (Figura 9 e Figuras A6, A7 e A16 em anexo) apresentam boa correlação com indicado na literatura (MARJANI; MOUSAVI; NAMAZIAN, 2011). A formação de imina é confirmada pelo desaparecimento do pico do PCAH em 1712 cm^{-1} , referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$, e aparecimento de pico em 1635 cm^{-1} , referente ao estiramento $\text{C}=\text{N}_{\text{imina}}$. Além disso, o espectro do 4PMAA apresenta os valores de estiramento para N-H entre 3300 e 3400 cm^{-1} , indicando que a formação de imina se deu apenas em um dos nitrogênios da *p*-fenilenodiamina. O espectro de RMN apresenta um sinal em 8,64 ppm, indicando a formação da imina e o sinal em 5,40 mostra que a outra amina não condensou com o PCAH. A atribuição dos sinais de RMN está dispostas na tabela 2.

Tabela 2. Sinais de RMN do 4PMAA em DMSO-d_6 .

Sinal	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Sinal	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
a	8,64 (d, J = 4,0 Hz)	1	154,18
b	7,87 (t, J = 7,6 Hz)	2	120,77
c	7,41 (m)	3	125,02
d	8,08 (d, J = 7,9 Hz)	4	137,20
e	8,59 (s)	5	155,51
f	7,22 (d, J = 8,5 Hz)	6	123,52
g	6,61 (d, J = 8,5 Hz)	7	114,53
h	5,40 (s)	8	149,91
		9	138,68
		10	149,37

Os dados de FTIR para o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ indicam o deslocamento do pico da imina do 4PMAA, de 1635 cm^{-1} para 1625 cm^{-1} no complexo. Esse deslocamento se deve ao compartilhamento de elétrons do nitrogênio com o rutênio, fazendo com que a ligação $\text{C}=\text{N}_{\text{imina}}$ seja alongada e promovendo uma queda de energia do modo de estiramento dessa ligação. Picos atribuídos ao anel piridínico também apresentam deslocamento, em 1448 e 1310 cm^{-1} , indicando uma variação em relação aos picos na 4PMAA que mostravam estiramentos em 1438 e 1297 cm^{-1} quando não complexados. Isso se dá em virtude da ligação do nitrogênio do heterociclo promover tensionamento discreto no anel, alterando a energia dos estiramentos de suas ligações $\text{C}=\text{N}_{\text{piridina}}$, entretanto não há como distinguir picos do anel piridínico do 4PMAA dos picos da bipyridinas já presentes no complexo, apesar de apresentar valores compatíveis com deslocamentos já observados na literatura para complexação com outros metais que promovem efeitos semelhantes (MARJANI *et al.*, 2009; NH; LEE; LEE, 2019). Também é observado um pico de baixa transmitância em 840 cm^{-1} , referente ao PF_6^- .

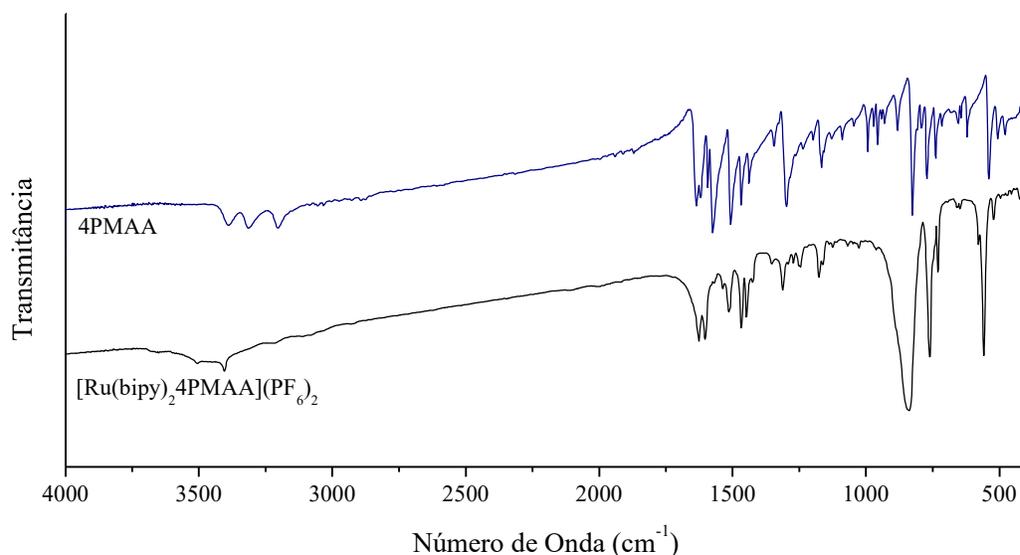


Figura 9. Espectro FTIR de 4PMAA e $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$.

Os espectros de ^1H RMN e ^{13}C do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ apresentam boa correlação com complexos similares reportados na literatura. (HOTZE *et al.*, 2006) A formação do complexo pode ser confirmada se observando os deslocamentos nos sinais atribuídos ao hidrogênio da imina em relação ao 4PMAA livre. No espectro de ^1H RMN, o sinal da imina em $9,09\text{ ppm}$ é deslocado para esquerda em relação ao sinal para este núcleo no

4PMAA livre, em 8,59 ppm, o que significa um efeito de desblindagem desse núcleo, causado pela formação de ligação entre o nitrogênio da imina com o centro metálico. O mesmo efeito de deslocamento é observado no sinal para o carbono que faz a ligação dupla com o nitrogênio da imina no ^{13}C RMN. O sinal em 155,51 ppm, atribuído ao carbono da imina no 4PMAA livre, é deslocado para 164,74 ppm após a complexação em virtude da formação de ligação entre o nitrogênio e o centro metálico. Outro sinal importante é a permanência de sinais para os hidrogênios do grupo amino em 5,44 ppm evidenciando que o par de elétrons da amina não sofre complexação com o rutênio. A atribuição dos sinais está indicada na tabela 3 e fornece informações que confirmam a estrutura hipotética do complexo, e todos as atribuições foram confirmadas por COSY (Figura A11 em anexo).

Tabela 3. Sinais de RMN do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em DMSO-d_6 .

Sinal	δ ^1H (ppm)
-NH ₂	5,47 (s, 2H)
<i>o</i> -ph	6,42 (d, J = 8.2 Hz, 2H)
<i>m</i> -ph	6,16 (d, J = 8.3 Hz, 2H)
4D	7,39 (t, J = 6,7 Hz 1H)
4B	7,51 (q, J = 7,5 Hz, 2H)
5A, 5B, 5C, 3 4PMAA, 3A, 3C	7,57 – 7,90 (m, 6H)
5D	7,98 (t, J = 7,9 Hz, 1H)
4 4PMAA, 5 4PMAA, 4A, 4C, 3B, 3D	8,07-8,34 (m, 4H)
6A	8,40 (d, J = 7,9 Hz, 1H)
6C	8,49 (d, J = 8,2 Hz, 1H)
6B	8,56 (d, J = 5,5 Hz, 1H)
6D	8,61 (d, J = 8,2 Hz, 1H)
6 4PMAA	8,88 (t, J = 8,0 Hz, 2H)
Imina	9,12 (s, 1H)

O espectro HRMS apresenta picos de m/z em 756,0789 e 924,0305, sem nenhum outro sinal significativo (Figura A12 em anexo). Esses sinais foram atribuídos as espécies $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)^+$ e $\text{Na}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2^+$, respectivamente, o que indica que o produto possui apenas o complexo desejado, uma vez os picos no HRMS apresentam informação similar com a massa molecular teórica calculada para o complexo ($900,615 \text{ g mol}^{-1}$).

4.2. Síntese e caracterização de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$

Na etapa inicial é a formação de nanopartículas de magnetita, cuidados devem ser tomados em relação presença de oxigênio, uma vez que pode ocorrer oxidação e a nanopartícula ser transformada em maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), que é um óxido com propriedades magnéticas menos intensas.

O método adotado é a síntese clássica por coprecipitação, em que se obtém partículas de Fe_3O_4 reagindo uma mistura entre Fe^{3+} e Fe^{2+} (2:1) em meio básico em atmosfera não oxidante.



Para se obter material nanoparticulado deste sólido é necessário manter separados os núcleos de formação no início de sua precipitação. Por conta disso, é comum a utilização de surfactantes aniônicos de cadeia longa, de modo que se adsorvam à superfície das partículas formadas e mantenham-nas afastadas, evitando aglomeração. Na formação de nanopartículas de magnetita, essa estratégia é mais crítica por conta da forte atração magnética entre as partículas, o que tende a favorecer a aglomeração.

No procedimento para a síntese das nanopartículas magnéticas se utiliza o ácido oleico como surfactante, o que é uma estratégia comumente adotada para o método de coprecipitação. O ácido oleico interage fortemente com as hidroxilas da superfície da magnetita, e impede a aglomeração das partículas. A capacidade de manter separados os núcleos de magnetita recém formados é inversamente proporcional ao tamanho de partícula produzida, uma vez que núcleos que são isolados das forças de atração entre si, não se unem e não formam partículas maiores.

A formação de nanopartículas de magnetita na coprecipitação deve ser separada em duas etapas: uma breve etapa de afloramento de núcleos de magnetita, em que o aumento do pH leva à supersaturação crítica e promove a formação de núcleos, e a etapa de difusão lenta do soluto sobre a superfície das partículas, que proporciona aumento do tamanho das partículas até atingir o tamanho de equilíbrio.

O processo de formação do recobrimento da nanopartícula de Fe_3O_4 com sílica (SiO_2) ocorre via hidrólise do TEOS que se adsorve na superfície da nanopartícula, de acordo com a representação apresentada na figura 10. Uma vez recoberta com SiO_2 , a oxidação da superfície de Fe_3O_4 é inibida, prevenindo assim a formação de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Assim como na Fe_3O_4 , as hidroxilas da superfície da SiO_2 permitem a modificação química com APTES, funcionalizando a superfície com grupos $-\text{NH}_2$ terminais.

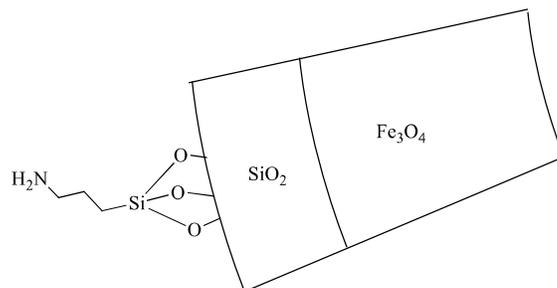


Figura 10. Representação do APTES ligado à $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Seguido da formação de $-\text{NH}_2$ terminais, a reação com anidrido succínico promove a abertura do anidrido e formação de amida. Com isso, o grupo terminal na nanopartícula é o grupo $-\text{COOH}$ livre para formar uma nova amida com o 4PMAA no complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$.

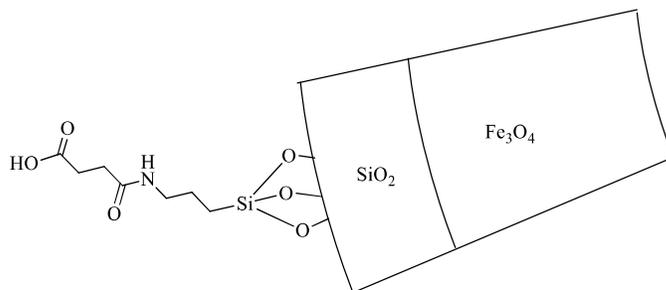


Figura 11. Representação da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$

É importante notar que ao longo do processo de funcionalização o tamanho das moléculas ligadas à superfície é cada vez maior, o que auxilia na manutenção da estabilidade da suspensão frente à agregação promovida pela força magnética da $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$, bem como a camada de sílica. Contudo, é fato que as modificações alteram as propriedades magnéticas da Fe_3O_4 .

Por fim, com o a nanopartícula funcionalizada com $-\text{COOH}$, torna-se possível a reação de esterificação com o complexo, utilizando *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

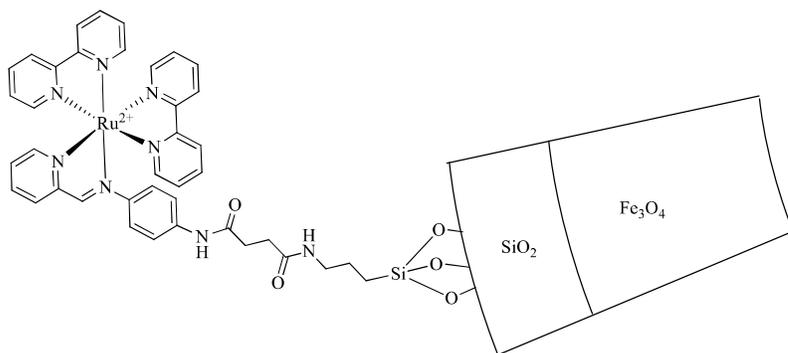


Figura 12. Representação da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2\text{-}[\text{Ru}(\text{bipy})_24\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$

Os difratogramas obtidos para os materiais preparados (Figura 13) apresetaram alta correlação com o apresentado na literatura para Fe_3O_4 (HE *et al.*, 2005). Não foi possível observar mudanças significativas nos difratogramas que representassem a formação de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. De acordo com o difratograma para $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, observar tais diferenças não é uma tarefa fácil para formação de pouca quantidades de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, tendo em vista que ambas estruturas fornecem difratogramas similares, salvo picos de difração em baixa intensidade em relação ao pico de maior intensidade. Contudo, há dois picos entre 20° e 30° no difratograma referente a $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ que não estão presentes no difratograma de Fe_3O_4 puro. Além disso, a intensidade relativa dos picos em relação ao pico de maior intensidade também está de acordo com o esperado para a magnetita (Fe_3O_4). Estes resultados indicam que no processo de formação de Fe_3O_4 não foi detectado a formação de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Após o recobrimento da nanopartícula magnética com SiO_2 , observa-se uma banda larga entre 20° e 30° no difratograma (Figura 13). Essa banda é atribuída na literatura à sílica amorfa formada, evidenciando a formação de SiO_2 . Após a funcionalização com o APTES, observa-se que a estrutura cristalina se mantém, apresentando apenas um leve aumento na banda entre os 20° e 30° , esperado devido a camada extra formada pelo APTES. Como a partir

dessa etapa a superfície das nanopartículas não apresentam mais exposição ao oxigênio, não existe o risco de formação de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

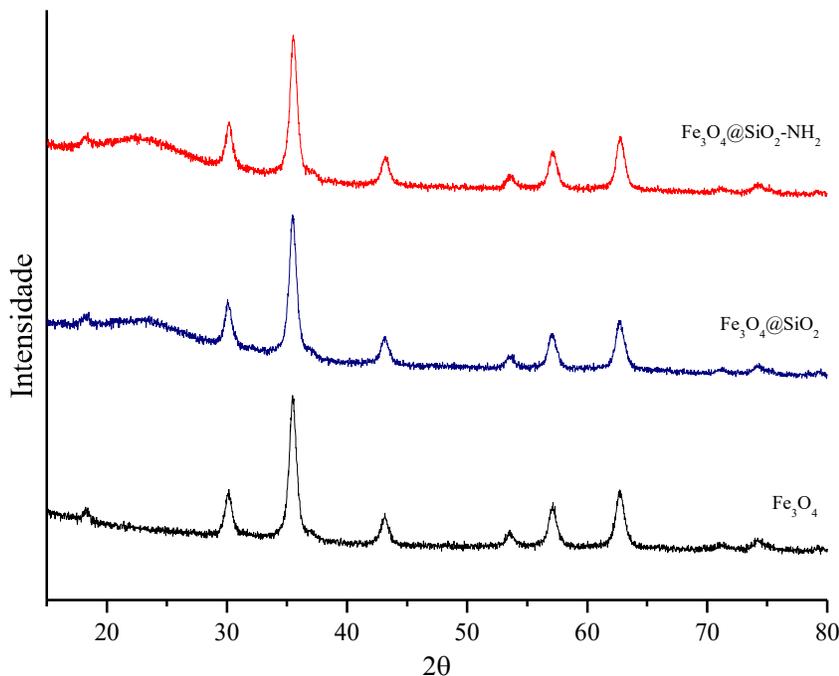


Figura 13. Difratoograma de pó para Fe_3O_4 (preto), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (azul) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (vermelho).

Ainda pelo difratograma, é possível estimar o tamanho das nanopartículas através da equação de Scherrer (LAURENT *et al.*, 2008), que relaciona a largura a meia altura (FWHM, do inglês, *full width at half maximum*) dos picos (β) com o tamanho do cristalito (D) que produz a difração.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Em que θ é o ângulo de Bragg referente à difração, λ é o comprimento de onda difratado, 0,15406 nm referente a emissão $K_{\alpha 1}$ do Cu, e K é a constante de forma, que varia de acordo com a forma do modelo de cristalito utilizado e com a simetria espacial dos cristais analisados. Para estimar o tamanho do cristalito, o fator K utilizado foi de 0,94 (HE *et al.*, 2005; LAURENT *et al.*, 2008), que apresenta boa correlação com os dados estruturais para o tipo de nanopartícula analisado, considerando uma geometria esférica para o cristalito.

Na estimativa, foram utilizados os 6 picos mais intensos da Fe_3O_4 pura, foi obido uma média de 19,61 nm para a nanopartícula. Vale ressaltar que esse é um valor estimado e que

leva em consideração que as nanopartículas apresentam homogeneidade morfológica e isometria. Em virtude disso, este é um valor estimado, uma vez que não leva em consideração o efeito de agregação das nanopartículas.

Tabela 4. Estimativa de tamanho de partícula através da equação de Scherrer.

2θ	FWHM	D (nm)
30,25	0,3183	24,10
35,63	0,3279	23,07
43,30	0,3427	21,55
53,71	0,4011	17,67
57,26	0,4129	16,89
62,87	0,4477	15,14
Média de tamanho:		19,61

A partir dos espectros de FTIR obtidos para os materiais (Figura 14) foi possível acompanhar a formação de ligações, determinando se a funcionalização foi efetiva. A ampliação da região entre 2000 e 500 cm^{-1} pode ser encontrada na figura A17.

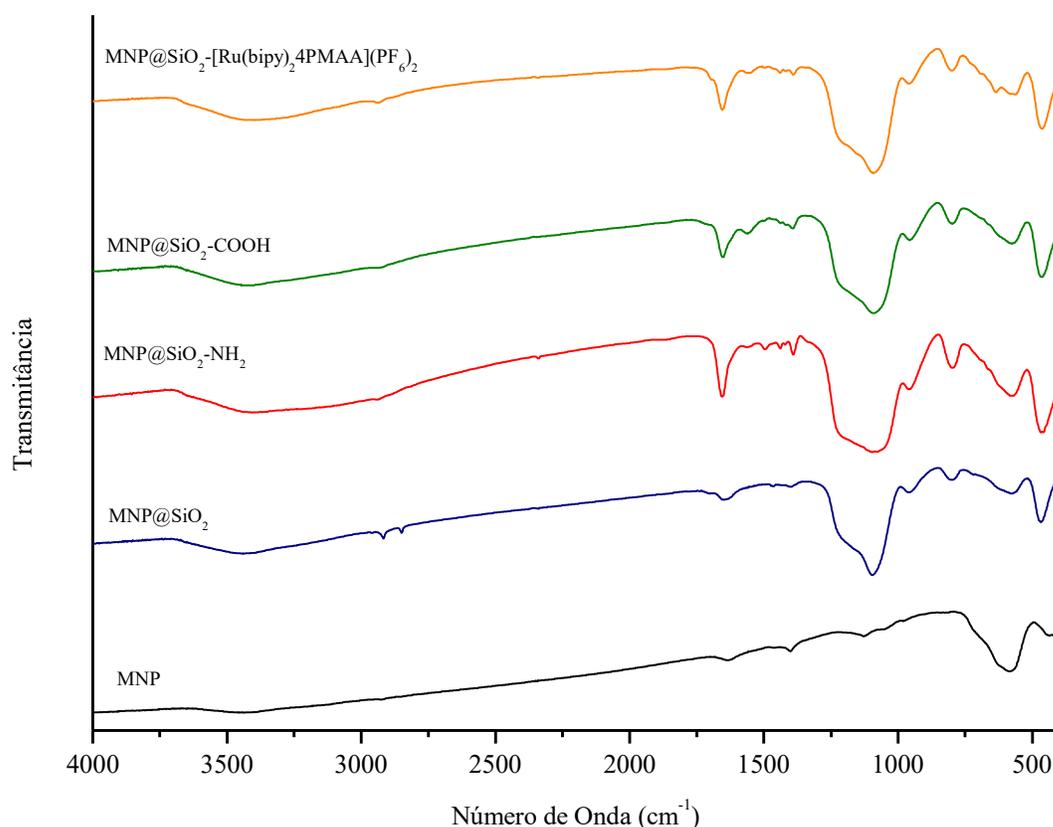


Figura 14. Espectros FTIR para Fe_3O_4 (preto), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (azul), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (vermelho), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ (verde) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-[Ru(bipy)}_2\text{4PMAA)](PF}_6\text{)}_2$ (laranja).

Os principais picos do espectro se encontram na tabela 5, bem como os modos vibracionais aos quais os picos são atribuídos.

Tabela 5. Sinais nos espectros de FTIR para Fe₃O₄ (1), Fe₃O₄@SiO₂ (2), Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ (3) e Fe₃O₄@SiO₂-COOH (4), em que δ se refere à deformação e ν ao estiramento.

Picos no FTIR (cm ⁻¹)				Atribuição	Referência
1	2	3	4		
3.438	3.446	3.409	3.426	ν OH	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
2.923	2.918			ν_s -CH ₂ (Ácido Oleico)	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
2.852	2.848			ν_{as} -CH ₂ (Ácido Oleico)	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
	1.702			ν C=O (Ácido Oleico)	(HE <i>et al.</i> , 2005)
			1.718	δ -NHCO-	(HE <i>et al.</i> , 2005)
	1.648	1.654	1.654	δ H ₂ O	(HE <i>et al.</i> , 2005)
1.631	1.630			δ H ₂ O	(HE <i>et al.</i> , 2005)
		1.560	1.560	ν -NHCO-(APTES)	(HE <i>et al.</i> , 2005)
		1.496	1.498	δ CH (APTES)	FTIR do APTES
1.459	1.473	1.469		δ CH (Ácido Oleico)	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
	1.463				(YANG <i>et al.</i> , 2010)
		1.438	1.438		
		1.421	1.421	δ CH (APTES)	FTIR do APTES
1.400	1.400	1.392	1.392	δ CH ₃	(SOARES <i>et al.</i> , 2014)
		1.332	1.334	δ CH (APTES)	FTIR do APTES
	1.217	1.223	1.222	δ Si-O-Si	(HE <i>et al.</i> , 2005)
1.126				δ CH (Ácido Oleico)	(HE <i>et al.</i> , 2005)
	1.097	1.094	1.093	δ Si-O-Si	(HE <i>et al.</i> , 2005)
	960	956	956	δ Si-O-Si	(KANDIBANDA <i>et al.</i> , 2018)
	798	798	796	δ Si-O-Si	(HE <i>et al.</i> , 2005)
629	628	629	629	Fe-O	(EBRAHIMINEZHAD <i>et al.</i> , 2013)
582	576	574	574	Fe-O	(YIMIN <i>et al.</i> , 2018)
437	468	464	464	Fe-O	(EBRAHIMINEZHAD <i>et al.</i> , 2013)

Ao longo dos cinco espectros FTIR obtidos, observam-se picos de transmitância mínima em torno de 3500 cm⁻¹. Essa baixa transmitância é atribuída aos estiramentos –OH tanto das hidroxilas nas superfícies quanto aos da água presentes nessas superfícies. A água adsorve fortemente nas superfícies, mesmo com a nanopartícula seca sob vácuo. Os três sinais atribuídos à deformação Si-O-Si da camada de SiO₂ estão presentes no espectro, em 1097, 960 e 798 cm⁻¹, o que também indica a formação de SiO₂.

Apesar da omissão parcial devido a banda da água na região de 3500 cm^{-1} , pode-se observar um conjunto de picos na região de estiramento C-H em torno de 2900 cm^{-1} evidenciando, em sua maioria, a presença de ácido oleico. Esse efeito é reduzido a partir da etapa de formação de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, apesar da presença de picos nesta região que possam ser atribuídos aos estiramentos C-H do APTES e ácido succínico. Há também um pico de alta intensidade em 1630 cm^{-1} atribuído a deformação OH da água.

Uma atenção especial deve ser dada ao pico em 1560 cm^{-1} que surge a partir da produção de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ que se refere à C=O da amida formada, bem como o pico em 1718 cm^{-1} , atribuído ao estiramento de C=O da carboxila terminal. Ambos sinais indicam a formação da amida e abertura do anidrido succínico.

Por conta da baixa quantidade, não há muita diferença no FTIR da nanopartícula funcionalizada com $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$, salvo o pico em 1718 cm^{-1} que é substituído por outro pico mais fino e de maior intensidade em 1698 cm^{-1} , atribuído ao estiramento do C=O da amida formada, indicando que a -NH_2 do complexo se ligou à carbonila.

4.3. Caracterização Fotofísica

A Figura 15 mostra os espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$, dos ligantes 2,2'-bipiridina, 4PMAA e do precursor $\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$ em acetonitrila. Para o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ observou-se bandas muito próximas entre 225 e 260 nm, com valores máximos de 245 nm ($\log \epsilon = 4,51$) e 253 nm ($\log \epsilon = 4,50$). Também é possível observar no espectro de absorção uma banda com máximo em 285 nm ($\log \epsilon = 4,78$), referente à transição do ligante 2,2'-bipiridina (HOTZE *et al.*, 2006). Na região de menor energia, é possível observar uma banda de absorção larga na região entre 370 e 500 nm, com máximo entre 425 nm ($\log \epsilon = 4,89$), em água, e 443 nm ($\log \epsilon = 5,20$), em etanol (Figura 16), que apresenta uma estrutura assimétrica, evidenciando sobreposição de mais de uma absorção. Essa transição, não observada nos ligantes, foi atribuída como a absorção $^3\text{MLCT}$ do complexo, e é consistente com valores já relatados na literatura (HOTZE *et al.*, 2006). Além disso, é possível observar que a banda $^3\text{MLCT}$ na região de 450 nm do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ possui energia diferente do complexo $\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$, utilizado como precursor, evidenciando que houve alteração na esfera de coordenação, o que corrobora que a troca dos cloros pelo ligante 4PMAA ocorreu.

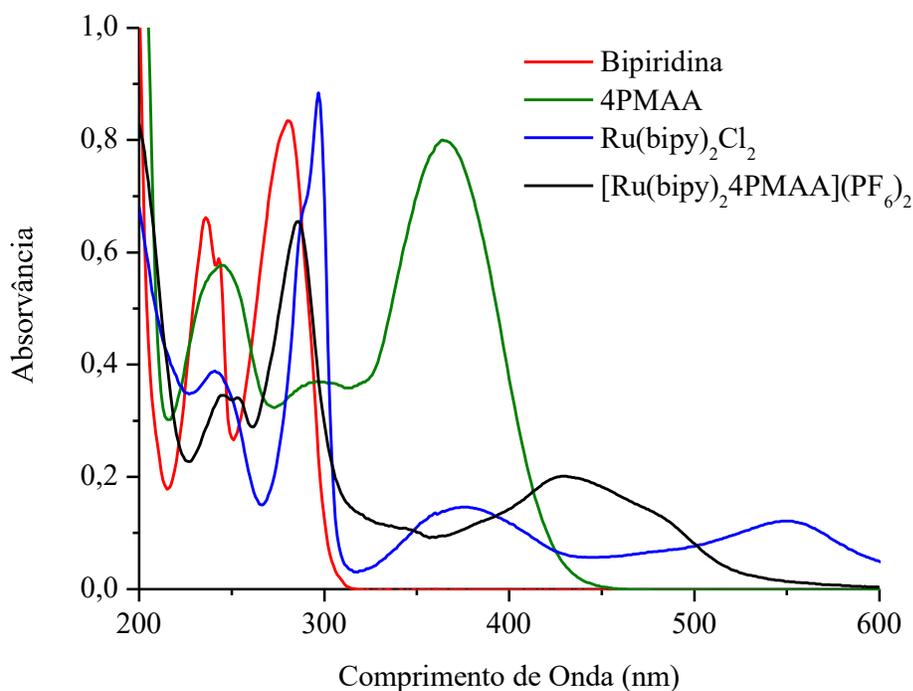


Figura 15. Espectro de absorção de soluções ($\sim 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em MeCN do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ (preto), 2,2'-bipiridina (vermelho), 4PMAA (verde) e $\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$ (azul).

A absorção do complexo foi medida em solventes de diferentes polaridades (Figura 16). Para a banda com máximo em 245 nm, é observado que aumentando a polaridade do solvente a absorção apresenta ligeiro deslocamento de 3 nm para maiores energias, nota-se também o deslocamento tímido de 4 nm para a absorção com máximo em 285 nm. A banda em 430 nm também não apresentou mudanças significativas com a polaridade do solvente, entretanto sofre mudanças significativas em água, sendo possível observar uma separação mais pronunciada de um componente em 474 nm no espectro em água quando comparado com os outros solventes. Em etanol, embora não seja possível observar a separação dos dois componentes na $^3\text{MLCT}$, a banda está deslocada para comprimento de onda de menor energia, indicando uma maior contribuição do componente em 474 nm.

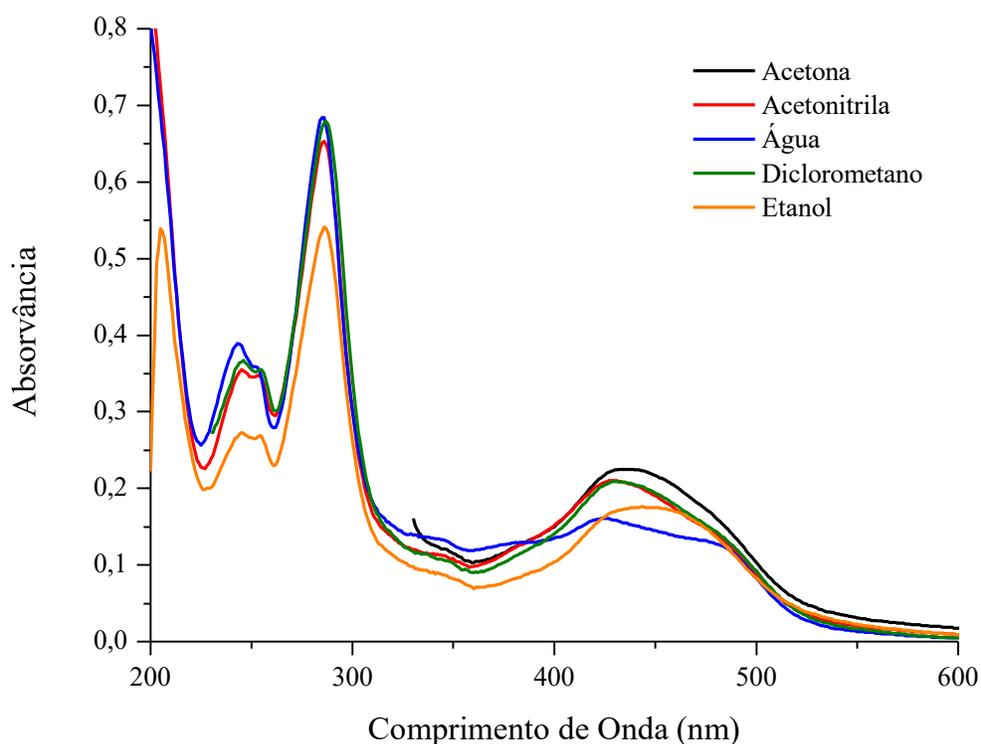


Figura 16. Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes solventes. Concentração: $\sim 10 \mu\text{mol L}^{-1}$

Os valores de $\log \epsilon$ para cada máximo de absorção do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e do ligante 4PMAA em diferentes solventes estão apresentados na tabela 6. É possível observar para todas as transições altos valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ). Para as bandas em 243, 253 e 283 nm os altos valores obtidos para o complexo (entre 60.000 e 350.000) é congruente com o fato das transições permitidas dos ligantes estarem sobrepostas nesta

região. Para a banda na região de 430 nm, o alto valor de ϵ está de acordo com a atribuição da banda como $^3\text{MLCT}$, uma vez que transições d-d são proibidas por simetria (Regra de Laporte), e apresentam valores de ϵ mais baixos (VALEUR, 2001).

Tabela 6. $\log \epsilon$ dos comprimentos de onda de absorção máximos (λ_{max}) do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e do ligante 4PMAA em diferentes solventes.

$[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2 \lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} (\log \epsilon)$			
Água	Etanol	Acetonitrila	Diclorometano
243 (5,24)	245 (5,39)	245 (4,51)	246 (5,28)
253 (5,21)	254 (5,38)	253 (4,50)	255 (5,27)
283 (5,48)	286 (5,69)	285 (4,78)	287 (5,55)
425 (4,89)	443 (5,20)	430 (4,27)	430 (5,04)
4PMAA $\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} (\log \epsilon)$			
Água	Etanol	Acetonitrila	Diclorometano
237 (4,17)	247 (4,07)	244 (4,10)	244 (4,11)
270 (3,69)	290 (3,83)	293 (3,92)	291 (4,20)
-	375 (4,19)	364 (4,22)	362 (3,94)

Experimentos de espectroscopia de emissão do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em acetonitrila mostraram duas bandas de emissão, uma em torno de 575 nm e outro em torno de 770 nm. Complexos de rutênio em geral apresentam emissão em comprimentos de onda maiores do que 500 nm, com tempos relativamente longos (>100 ns em média), que são geralmente associados às transições de transferência de carga do metal para o ligante via estado triplete ($^3\text{MLCT}$) (BALZANI; CAMPAGNA, 2007). Desta forma, as emissões observadas foram atribuídas a $^3\text{MLTC}$, devido a energia dessas transições e ao fato dos ligantes não apresentarem emissão de fluorescência. Os valores obtidos para os tempos de meia vida dessa emissão se mostraram abaixo do esperado para transições desse tipo, em torno de 8 ns para a banda de 575 nm e 40 ns para a banda de 770 nm (Figura A15 em anexo). Os valores de tempo de meia vida não sofreram alteração quando a amostra é irradiada em atmosfera de argônio, mostrando que os estados excitados não são suprimidos por oxigênio.

Desta forma, o baixo valor de tempo de vida de emissão da banda em 770 nm pode estar associada à baixa energia do estado, o que resulta no rápido decaimento para o estado fundamental (HOTZE *et al.*, 2006). O baixo tempo de vida da banda em 575 nm pode estar associado a supressão deste estado por algum componente do sistema. A presença de dois tempos de meia vida distintos sugere a presença de mais de uma espécie no sistema.

Para melhor compreender o comportamento do sistema, o espectro de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ foi obtido em solventes de diferentes polaridades (Figura 17). A figura mostra a intensidade relativa da banda em 770 nm em comparação com a banda em 575 nm. É possível observar uma maior intensidade da emissão em 770 nm em água e etanol, enquanto que em acetonitrila e em acetona a predominância é da emissão em 575 nm. A razão entre as bandas de emissão nos diferentes solventes também não é compatível com a presença de apenas uma espécie, no entanto, o surgimento da banda em 575 nm é consistente com mudanças na esfera de coordenação do rutênio, já relatados anteriormente para ligantes baseados em iminas e bipyridinas (CHOUDHURY; DEB; GOSWAMI, 1994; HOTZE *et al.*, 2006; TACHIYASHIKI; IKEZAWA; MIZUMACHI, 1994). Resultados indicam que compostos de coordenação semelhantes podem sofrer substituição total ou parcial do ligante contendo a imina, dando origem a um novo complexo com emissão na região verde do espectro visível (HOTZE *et al.*, 2006).

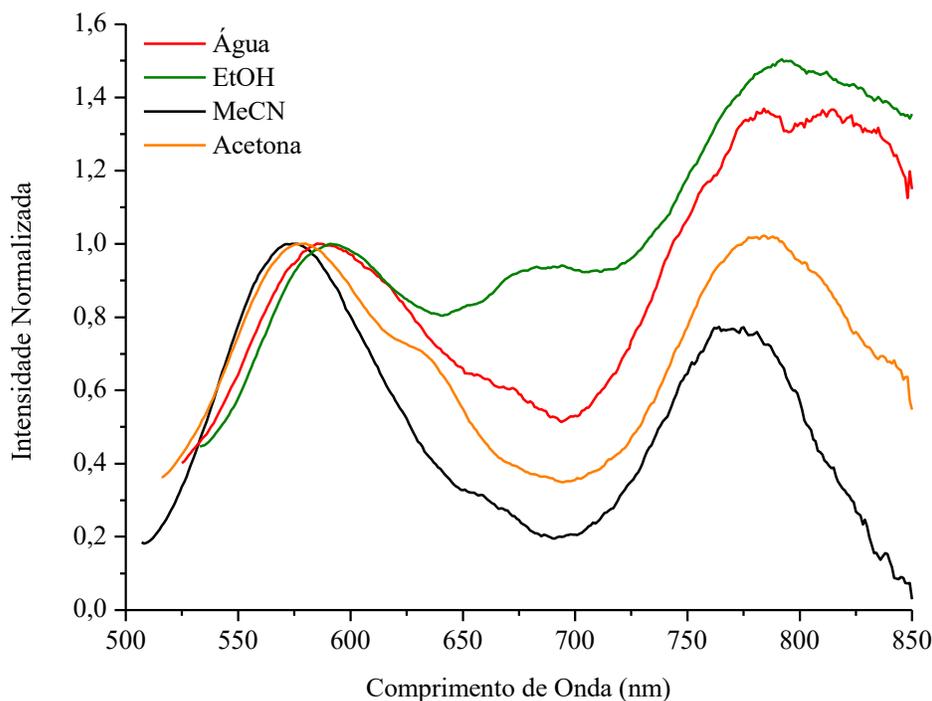


Figura 17. Espectro de emissão normalizado em de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes solventes.

As propriedades fotofísicas para o complexo [Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7. Comprimentos de onda máximos das emissões (λ_{em}) e valores de tempo de vida (τ).

Solvente	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	τ (ns)
Água	430	587	2,80
		802	15,07
Etanol	430	591	-
		793	-
Acetonitrila	443	575	8,37
		770	46,03
Acetona	434	578	-
		783	-

Foram obtidos espectros de emissão resolvida no tempo (TRES, do inglês *Time Resolved Emission Spectroscopy*) em acetonitrila a fim de observar a dependência das bandas de emissão em relação ao tempo. Como pode ser observado na figura 18, o espectro de emissão em tempo curto (até 20 ns) mostra somente o componente em 575 nm. A partir de 40 ns até 60 ns, foi possível observar o surgimento da banda em 770 nm. A partir de 80 ns somente o componente em 770 nm. Esses resultados mostram claramente a existência de duas espécies distintas no sistema, em contraste com os dados de RMN e HRMS que mostram a presença de somente uma espécie.

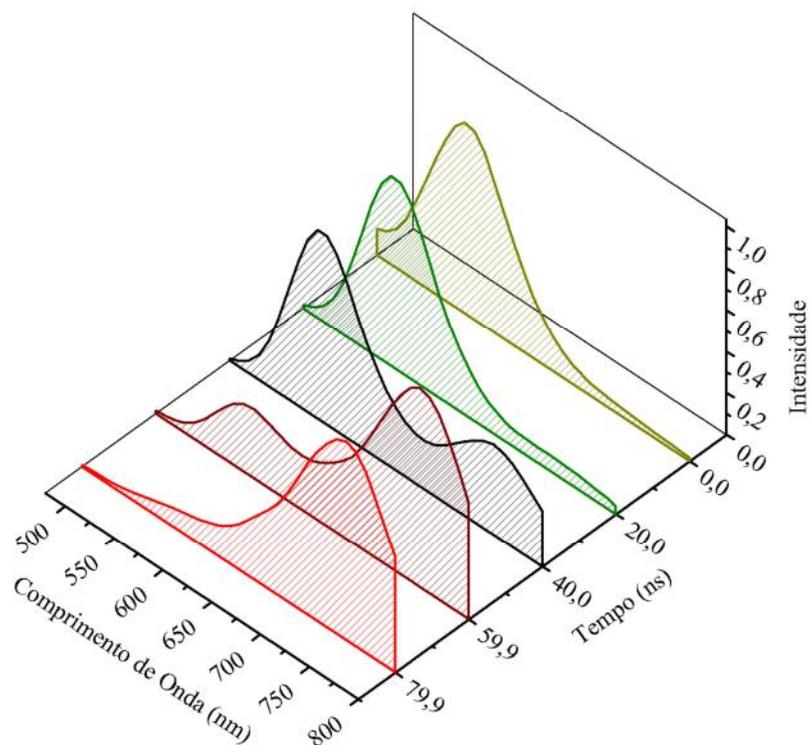


Figura 18. Espectros TRES de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em MeCN com excitação em 450nm.

Dados os resultados apresentados, a hipótese levantada é que existe um equilíbrio em solução entre o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e um outro complexo que emite em 575 nm, que pode ser resultado da quebra de ligação entre metal e um dos nitrogênios do 4PMAA, seguida de coordenação com um novo ligante R, que pode ser proveniente de uma possível molécula de água (ou solvente) presente na estrutura cristalina, comum em complexos de coordenação (Figura 19).

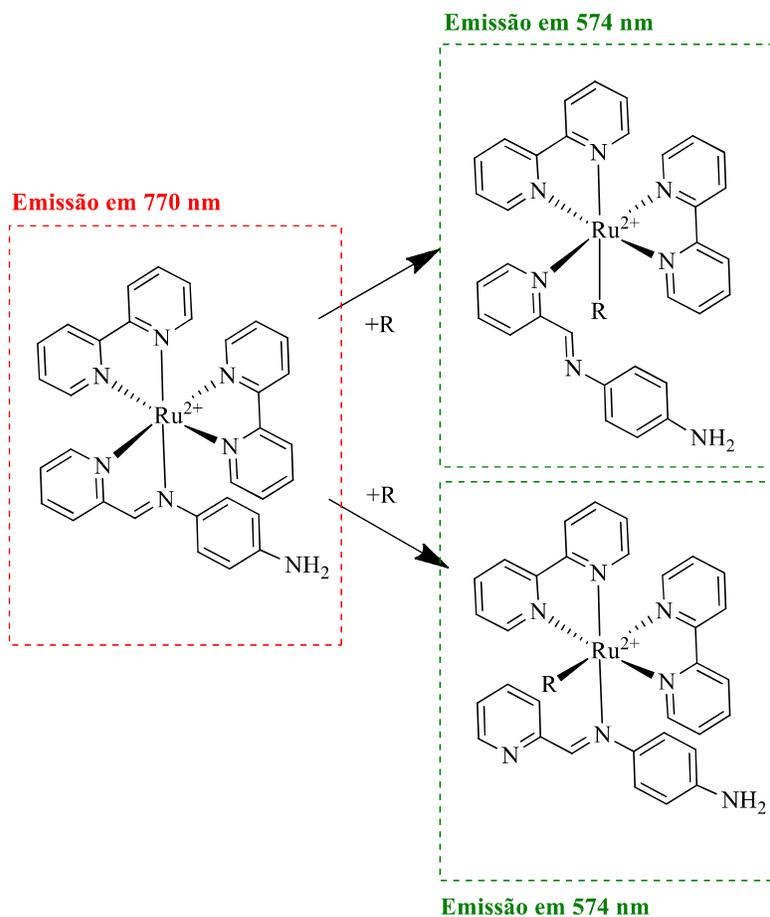


Figura 19. Hipótese da alteração na esfera de coordenação de $[Ru(bipy)_2(4PMAA)](PF_6)_2$.

Para verificar a hipótese do equilíbrio foram realizados experimentos de variação de pH (Figura 20). Observou-se que em valores de pH ácidos a espécie predominante é a que emite em 590 nm. Nesse caso, o meio ácido favorece a protonação do nitrogênio, facilitando a descoordenação de um dos nitrogênios do 4PMAA, favorecendo a formação do complexo monodentado que emite em 590 nm. Já em pH 7 foi observado predominantemente a espécie bidentada que emite em 800 nm. Porém, em valores de pH maiores que 7 também foi possível observar um leve aumento da espécie que emite em 590 nm, provavelmente devido a coordenação do grupo hidroxila. Contudo estes experimentos não fornecem informações sobre qual nitrogênio se desliga do rutênio.

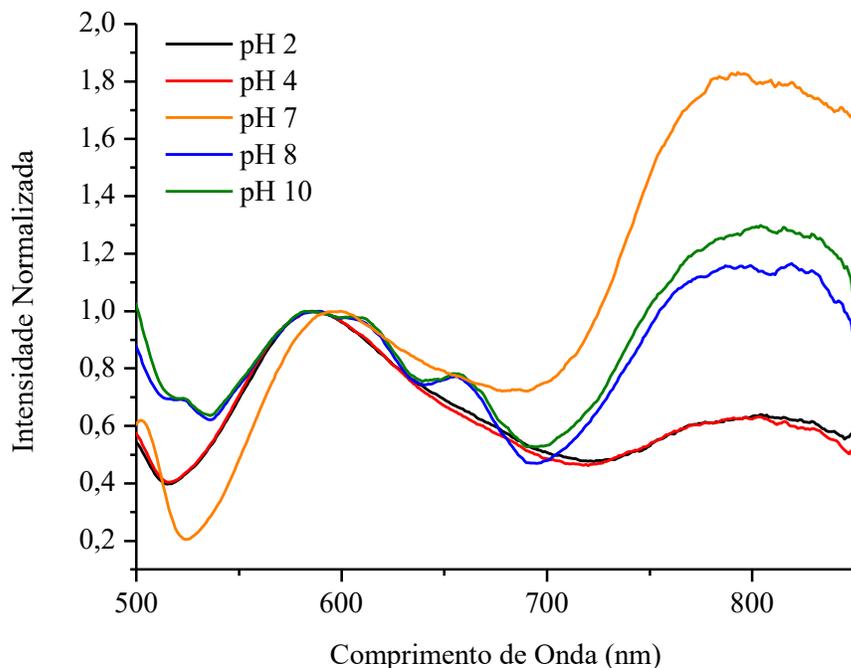


Figura 20. Espectro de emissão de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes valores de pH.

O fato deste complexo apresentar duas emissões em regiões distintas e sensíveis ao pH o torna um possível candidato a ser utilizado em meio biológico no mapeamento de células tumorais, onde os valores de pH são mais ácidos (pH 6,8) quando comparados com as células saudáveis (pH 7,4) (KO *et al.*, 2019). Além disso, a emissão no infravermelho é de maior penetração para a maioria das matrizes celulares, facilitando a obtenção de imagens (KO *et al.*, 2019). Os espectros de absorção em diferentes valores de pH não indicaram mudanças apreciáveis (Figura A18).

A hipótese de equilíbrio entre os complexos descrita na figura 19 pode ser validada pelo espectro de emissão no estado sólido (figura 21), onde observa-se somente emissão em 800 nm com tempo de vida de 78,53 ns. Podemos considerar que no estado sólido não há mobilidade para o ligante 4PMAA descoordenar do rutênio no complexo, observando-se apenas o $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$.

Outra possibilidade de aparecimento de uma segunda espécie seria a formação de um agregado no estado excitado entre duas ou mais moléculas do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$, gerando uma nova espécie chamada excímero que emitiria em comprimento de onda diferente do complexo livre. Entretanto, além da formação desses sistemas em complexos de rutênio não serem comuns, experimentos variando a concentração mostraram que a razão entre as bandas de emissão não variou com a concentração (Figura 22).

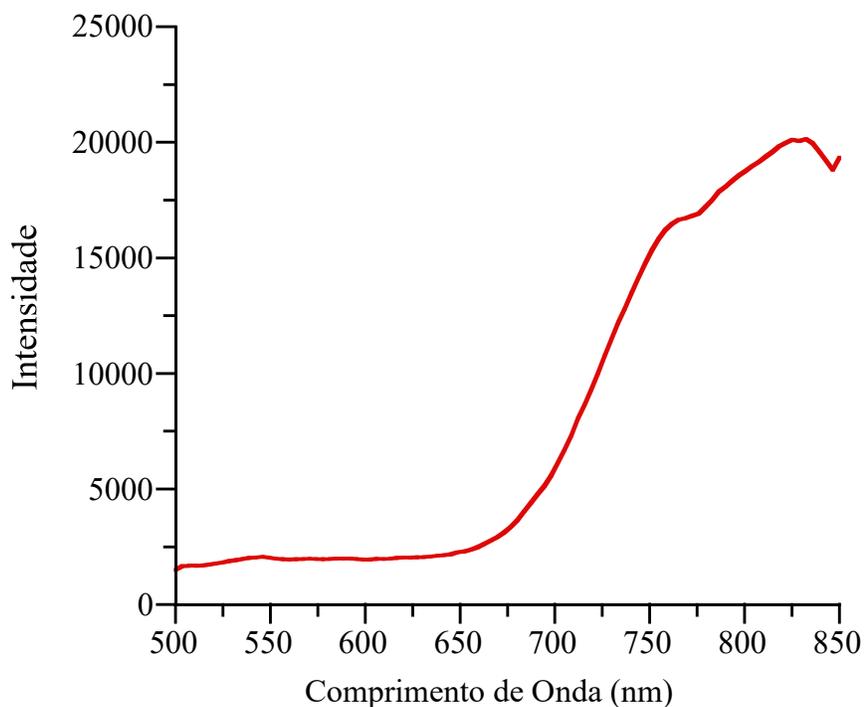


Figura 21. Espectro de emissão em estado sólido de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$.

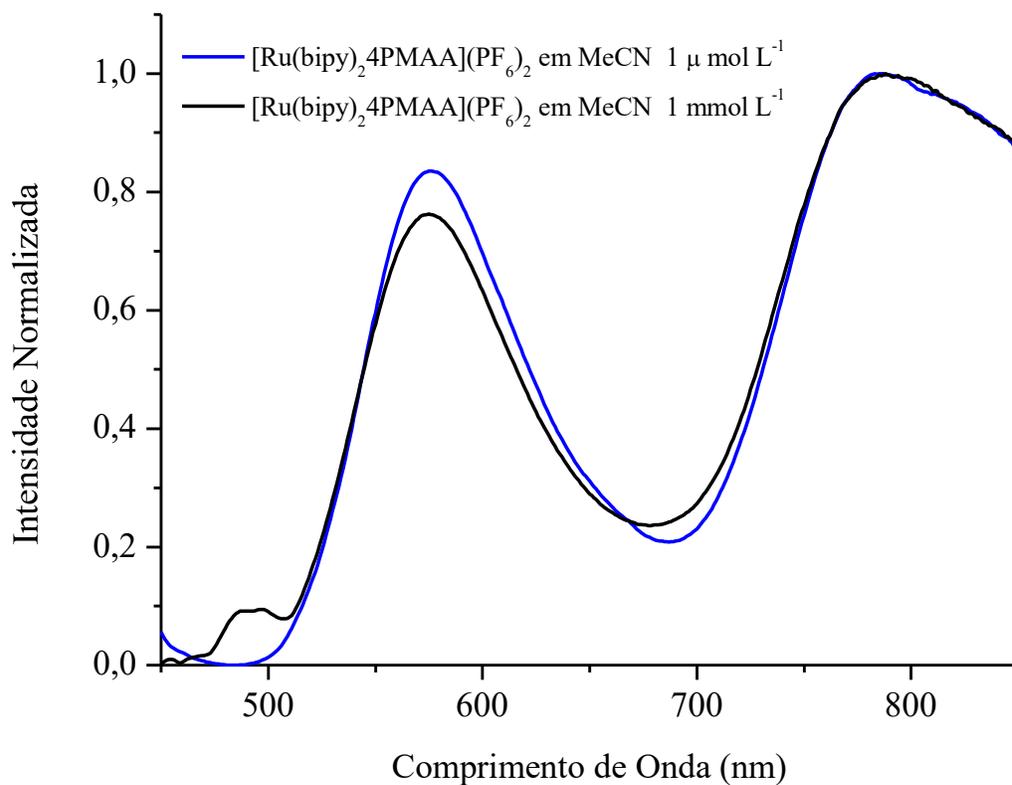


Figura 22. Espectro de emissão normalizado de uma solução em MeCN $\sim 1 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ (preto) e $\sim 1 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ (azul) do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 4\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$.

Para tentar elucidar o equilíbrio observado, e determinar qual dos nitrogênios é o sítio lábil do 4PMAA, espectros de ^1H RNM foram registrados em DMSO- d_6 e Acetona- d_6 (Figura A8 e A10 em anexo). Esses solventes foram escolhidos pois em DMSO mostrou somente emissão em 770 nm, enquanto em acetona mostrou a presença das duas bandas de emissão (Figura 17 e Figura A14 em anexo). A figura 23 mostram as regiões dos espectros referentes aos sinais atribuídos ao ligante 4PMAA no complexo, na região de 6-7 ppm e 9-10 ppm nestes solventes. Em DMSO- d_6 o espectro mostra a presença de somente uma espécie, o que pode ser verificado pelo sinal do hidrogênio da imina em 9,08 ppm, já em acetona- d_6 é possível observar um desdobramento do sinal em dois, na mesma região em 9,24 ppm, e outro em 9,41 ppm. Além disso, também é possível observar o desdobramento de outros sinais, como sinais dos hidrogênios f e g (Tabela 2) do 4PMAA ligado ao rutênio com deslocamento considerável, apresentando dois dubletos, em 6,32 e 6,60 ppm, referentes ao $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ e outros dois dubletos em 6,38 e 6,75 ppm, atribuídos ao complexo formado. O deslocamento do sinal em 9,24 ppm indica que o nitrogênio lábil é o da imina. Um espectro de RMN do 4PMAA em acetona- d_6 apresenta sinal da imina em 8,65 ppm, descartando a possibilidade descoordenação total do ligante. Um dos motivos de em DMSO só ser observado a espécie bidentada, pode ser o fato do rutênio possuir uma baixa afinidade por pares eletrônicos do DMSO- d_6 . Mesmo que o complexo seja formado pela troca da água de cristalização presente no complexo, em solução de DMSO a suposta água de cristalização estaria solvatada pelo DMSO e não disponível para complexação, o que corrobora com o fato de que os espectros de emissão em solventes mais polares mostram predominância da espécie que emite no infravermelho, ou seja, $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{4PMAA}](\text{PF}_6)_2$ (Figura 17).

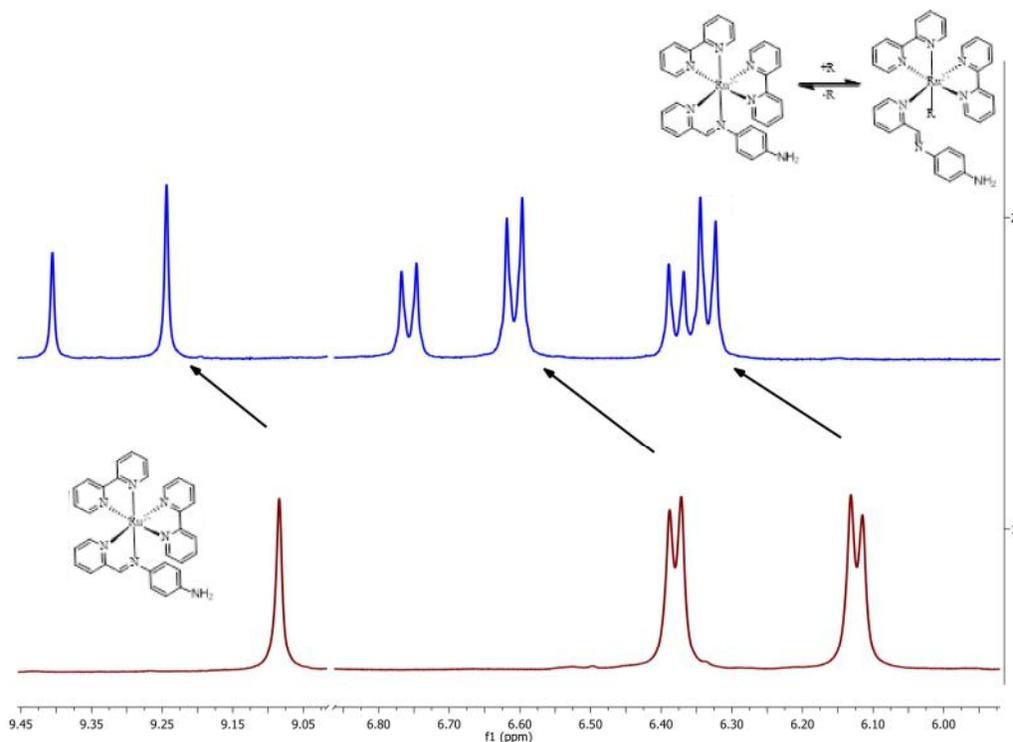


Figura 23. Ampliação da região dos sinais de ¹H RMN do 4PMAA no complexo [Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ em DMSO-d₆ (vermelho) e acetona-d₆ (azul).

Ao ser funcionalizado na nanopartícula magnética, foi possível observar que o Fe₃O₄@SiO₂-[Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ absorve na região de 400-500 nm, compatível com a absorção do complexo livre (Figura 24). Em contrapartida, a única emissão apreciável presente na nanopartículas Fe₃O₄@SiO₂-[Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ ocorre com máximo em 580 nm (8,32 ns) (figura 24), além de picos finos provenientes de espalhamento de luz característico para materiais sólidos. Uma vez que na superfície da nanopartícula o [Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ está em contato com diversos grupos que apresentam pares de elétrons disponíveis, como grupos das carbonilas das amidas formadas, carboxilas que não reagiram com o complexo, aminas que não reagiram com anidrido succínico, moléculas de água adsorvidas na superfície e acetona de lavagem, é de se imaginar que o complexo predominante na superfície da nanopartículas seja o que emite na região verde do espectro visível, uma vez que a parte lábil do 4PMAA é facilmente retirada.

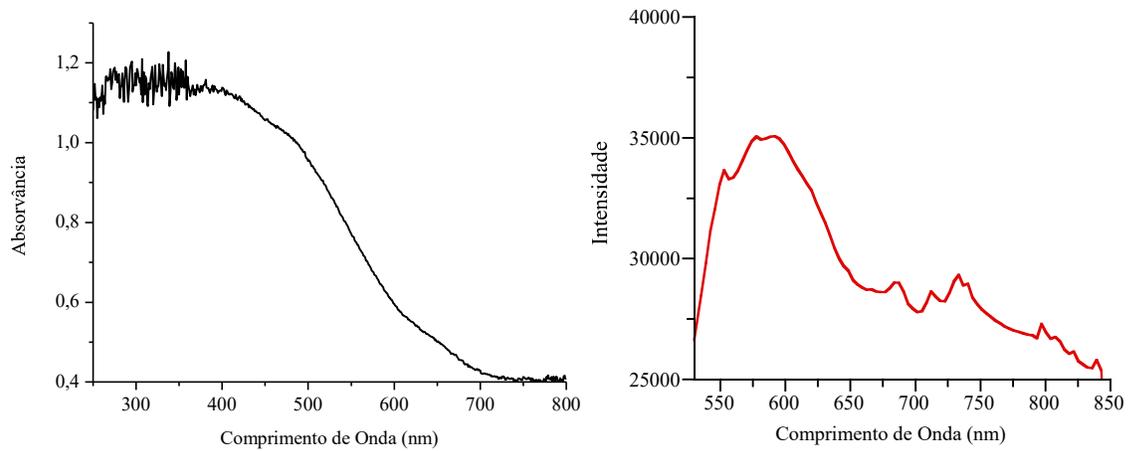


Figura 24. Espectro de absorção (esquerda) e de emissão (direita) em estado sólido de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-[Ru(bipy)}_2\text{4PMAA)](PF}_6\text{)}_2$.

5. CONCLUSÕES

[Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ foi sintetizado e caracterizado por RMN, COSY e HRMS.

Os espectros de emissão para o complexo [Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ apresentaram duas emissões ³MLCT, uma em torno de 574 nm, com tempo de vida de 8,37 ns em acetonitrila e 2,80 ns em água, e outra em torno de 770 nm, com tempo de vida de 46,03 ns e 15,07 ns em água, provenientes de espécies distintas.

Em estado sólido foi observado somente a emissão na região de 800 nm.

A razão entre as intensidades das emissões se mostrou sensível a alterações no pH do meio, apresentando maior intensidade de emissão no verde para valores de pH mais ácidos e da emissão no infravermelho para valores de pH próximos ao pH intracelular de células saudáveis fora do regime de proliferação. A emissão no infravermelho pode ser útil para a utilização de complexos deste tipo como sonda de imageamento celular.

Experimentos de RMN em DMSO e acetona indicam que as duas emissões observadas podem estar associadas a duas espécies, uma delas obtidas a partir da descoordenação do nitrogênio da imina do rutênio, formando um complexo monodentado.

A nanopartícula Fe₃O₄@SiO₂-[Ru(bipy)₂4PMAA](PF₆)₂ foi sintetizada e caracterizada por DRX e FTIR, entretanto o material carece de uma melhor caracterização por microscopia e XPS. As propriedades fotofísicas do material funcionalizado foram estudadas apresentando emissão em 580 nm, com tempo de vida de 8,32 ns. Essa região de emissão é similar a região de emissão do complexo com o ligante 4PMAA agindo como espécie monodentada proposta anteriormente. Logo, a forma monodentada, proveniente da quebra de uma ligação Ru-4PMAA, deve ser a predominante na superfície da nanopartículas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAZADEH, M.; GANJALI, M. R. Samarium-doped Fe₃O₄ nanoparticles with improved magnetic and supercapacitive performance: a novel preparation strategy and characterization. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 1, p. 295–308, 2018.

ALCALÁ, M. D.; REAL, C. Synthesis based on the wet impregnation method and characterization of iron and iron oxide-silica nanocomposites. **Solid State Ionics**, v. 177, n. 9–10, p. 955–960, 2006.

BACAC, M. *et al.* The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: An NMR evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 402–412, 2004.

BALZANI, V.; CAMPAGNA, S. (EDS.). **Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. v. 280

BYTZEK, A. K. *et al.* Biodistribution of the novel anticancer drug sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] KP-1339/IT139 in nude BALB/c mice and implications on its mode of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, n. Iii, p. 250–255, 2016.

CHOUDHURY, S.; DEB, A. K.; GOSWAMI, S. New ruthenium(II) complexes of α,α' -diimines: Synthesis, electrochemical and optical spectral properties of mononuclear complexes containing aryl(2-pyridylmethylene)amine and 2,2'-bipyridine ligands. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 8, p. 1305–1310, 1994.

DU, Y. *et al.* Development of multifunctional nanoparticles towards applications in non-invasive magnetic resonance imaging and axonal tracing. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1305–1316, 2017.

EBRAHIMINEZHAD, A. *et al.* Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 534–539, 2013.

ELIZABETH BAGGALEY, JULIA A. WEINSTEIN, AND J. A. G. W. Mass-Spectral Study of 9-[A(B, Γ)-Picolylidene]-1(4)-Azafluorenes. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 0, n. 11, p. 1511–1517, 2013.

FOSTER, S. J. *et al.* A ruthenium(II) polypyridyl complex for direct imaging of DNA structure in living cells. **Nature Chemistry**, v. 1, n. 8, p. 662–667, 2009.

GROESSL, M. *et al.* ChemInform Abstract: KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent - Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. **ChemInform**, v. 40, n. 3, p. 2140–2155, 2008.

HE, Y. P. *et al.* Synthesis and characterization of functionalized silica-coated Fe₃O₄ superparamagnetic nanocrystals for biological applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 38, n. 9, p. 1342–1350, 2005.

HOTZE, A. C. G. *et al.* Far-red luminescent ruthenium pyridylimine complexes ; building blocks for multinuclear arrays **Dalton Transactions**. p. 3025–3034, 2006.

KANDIBANDA, S. R. *et al.* Synthesis, characterisation, cellular uptake and cytotoxicity of functionalised magnetic ruthenium (II) polypyridine complex core-shell nanocomposite. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, n. August 2017, p. 270–276, 2018.

KO, C. N. *et al.* Dual function luminescent transition metal complexes for cancer theranostics: The combination of diagnosis and therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 381, p. 79–103, 2019.

LAURENT, S. *et al.* Physicochemical Characterizations , and Biological Applications Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Synthesis , Stabilization , Vectorization , Physicochemical Characterizations , and Biological Applications. **Chemical Reviews**, p. 2064–2110, 2008.

LECHEVALLIER, S. *et al.* Silica-Based Nanoparticles as Bifunctional and Bimodal Imaging Contrast Agents. **ChemPlusChem**, v. 82, n. 5, p. 770–777, 2017.

LEE, S.W; LEE, S.J. Cd(II), Ni(II), and Co(II) complexes based on a pyridyl–amine Schiff-base ligand: $[M(L)_2(NO_3)] \cdot (NO_3)$ (M = Cd, Ni, Co), *cis*- $[CoL_2Cl_2] \cdot (C_6H_6)$, and $[Co(L)_3] \cdot (ClO_4)_2$, **Polyhedron** v. 159, p. 259–264, 2019.

LI, L. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. **Theranostics**, v. 3, n. 8, p. 595–615, 2013.

LIN, J. *et al.* Gold-coated iron (Fe@Au) nanoparticles: Synthesis, characterization, and magnetic field-induced self-assembly. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 159, n. 1, p. 26–31, 2001.

LURIE, J. **Handbook of Analytical Chemistry**. Moscow: Mir Publishers, 1975.

MARJANI, K. *et al.* Crystal Structure and Spectroscopic Characterization of Zinc (II) and Mercury (II) Complexes of *N*-(Pyridin-2-ylmethylene) benzene-1 , 4-diamine **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie**. v. 4, n. Ii, p. 1633–1637, 2009.

MARJANI, K.; MOUSAVI, M.; NAMAZIAN, F. Crystal structure of *N*-(2-pyridylmethylene)benzene-1,4-diamine. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 41, n. 10, p. 1451–1455, 2011.

NGABONI OKASSA, L. *et al.* Development and characterization of sub-micron poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1–2, p. 187–196, 2005.

SOARES, P. I. P. *et al.* Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 419, p. 46–51, 2014.

SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. Mixed Phosphine 2,2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium. **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 3334–3341, 1978.

TACHIYASHIKI, S.; IKEZAWA, H.; MIZUMACHI, K. Identification of an Intermediate of the Photosubstitution of a Ruthenium(II) Diimine Complex with a Monodentate Chelating Ligand: 1H NMR and HPLC Evidence. **Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 623–625, 1994.

TARTAJ, P. *et al.* The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, p. 182–197, 2003.

TSUI, W. K. *et al.* Luminescent Ruthenium(II) Complex Bearing Bipyridine and *N*-Heterocyclic Carbene-based CANAC Pincer Ligand for Live-Cell Imaging of Endocytosis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 3–7, 2015.

WIERZBINSKI, K. R. *et al.* Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018.

YANG, K. *et al.* Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 10, p. 3093–3097, 2010.

YIMIN, D. *et al.* Preparation of Congo red functionalized Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticle and its application for the removal of methylene blue. **Colloids and Surfaces A**, v. 550, n. April, p. 90–98, 2018.

ZENG, L. *et al.* The development of anticancer ruthenium(II) complexes: From single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 19, p. 5771–5804, 2017.

ZHAO, Z. *et al.* Designing luminescent ruthenium prodrug for precise cancer therapy and rapid clinical diagnosis. **Biomaterials**, v. 192, p. 579–589, 2019.

7. ANEXOS

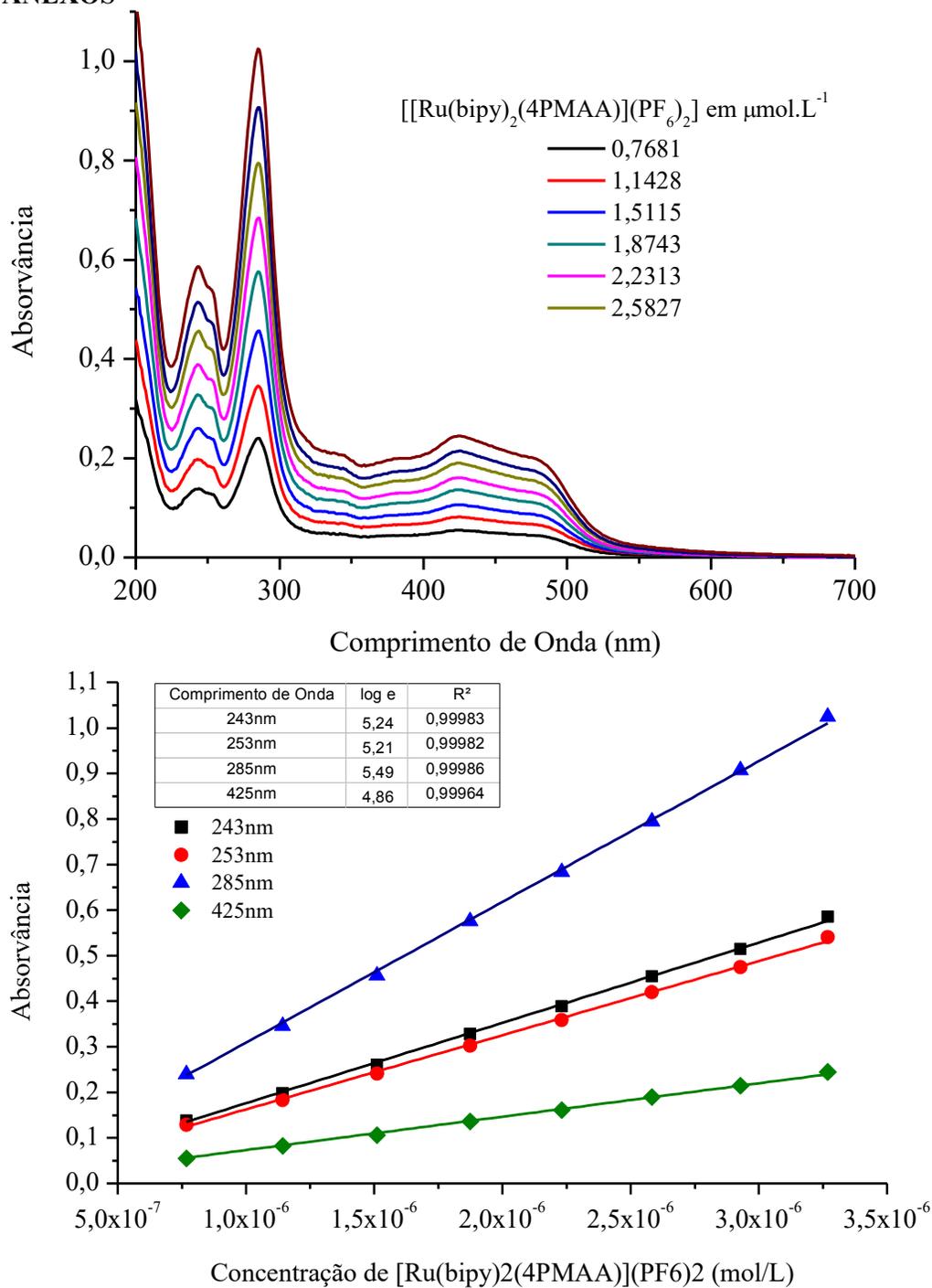


Figura A1. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para [Ru(bipy)₂(4PMAA)](PF₆)₂ em água.

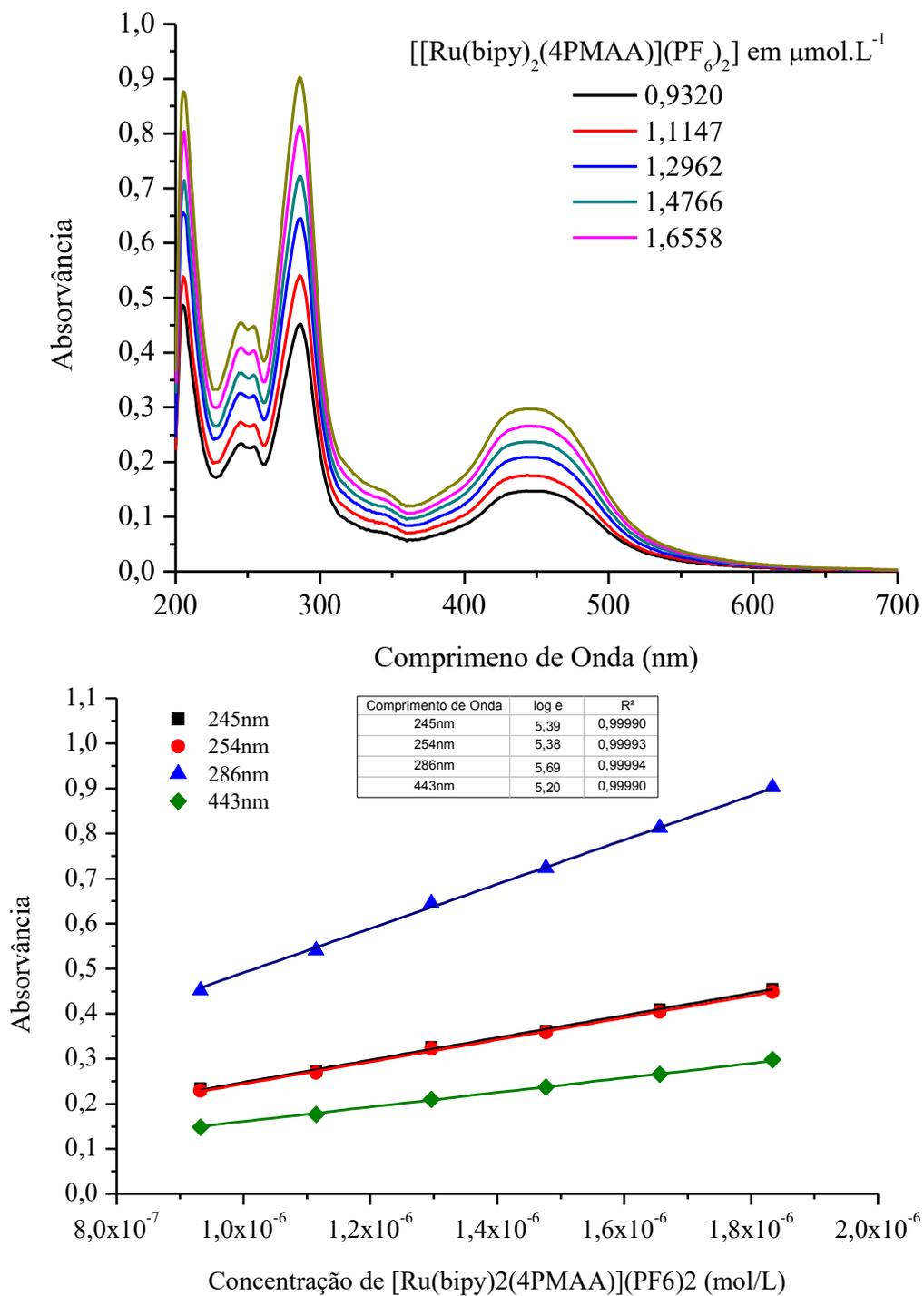


Figura A2. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para [Ru(bipy)₂(4PMAA)](PF₆)₂ em etanol.

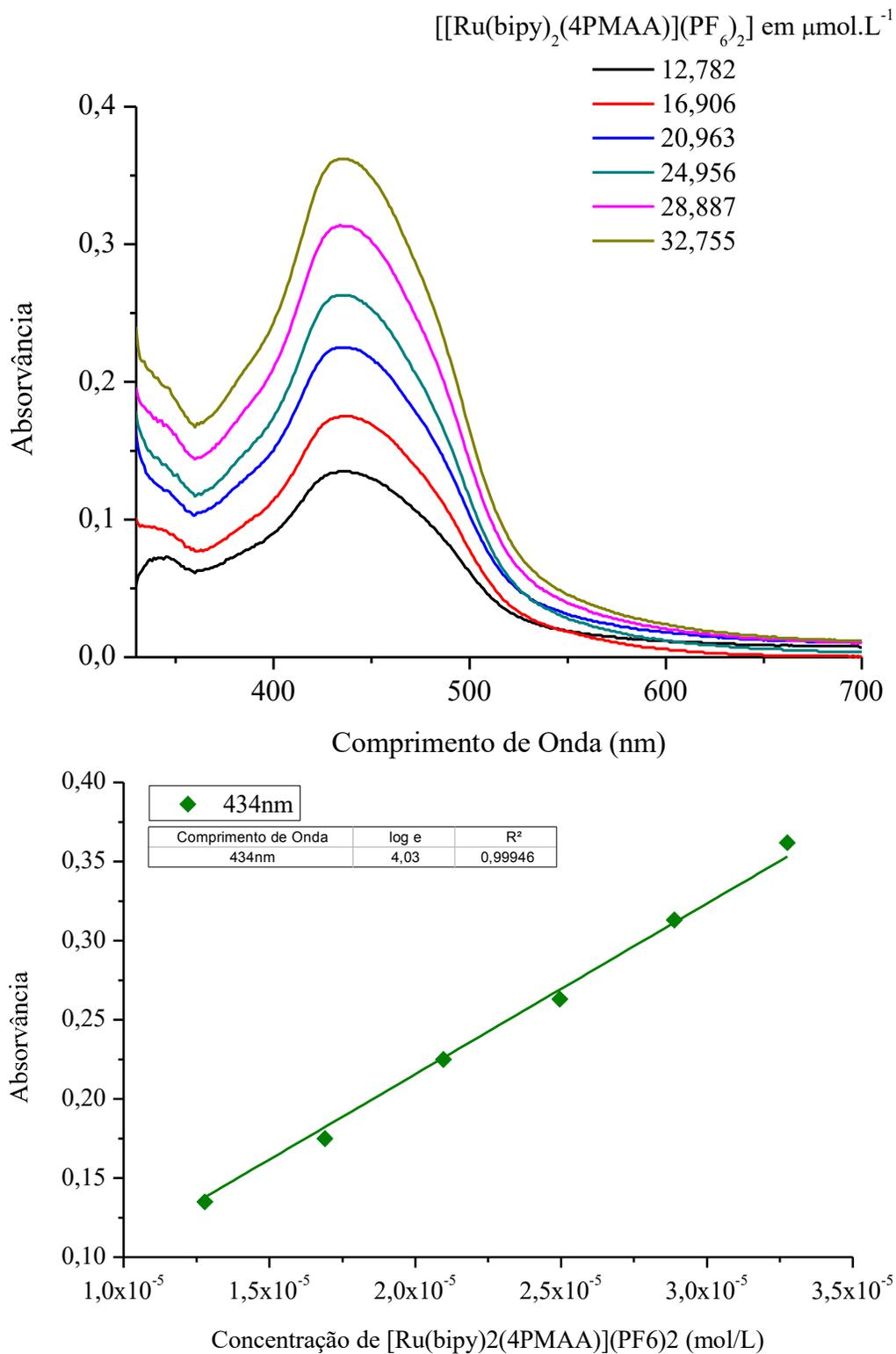


Figura A3. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(4\text{PMAA})](\text{PF}_6)_2$ em acetona.

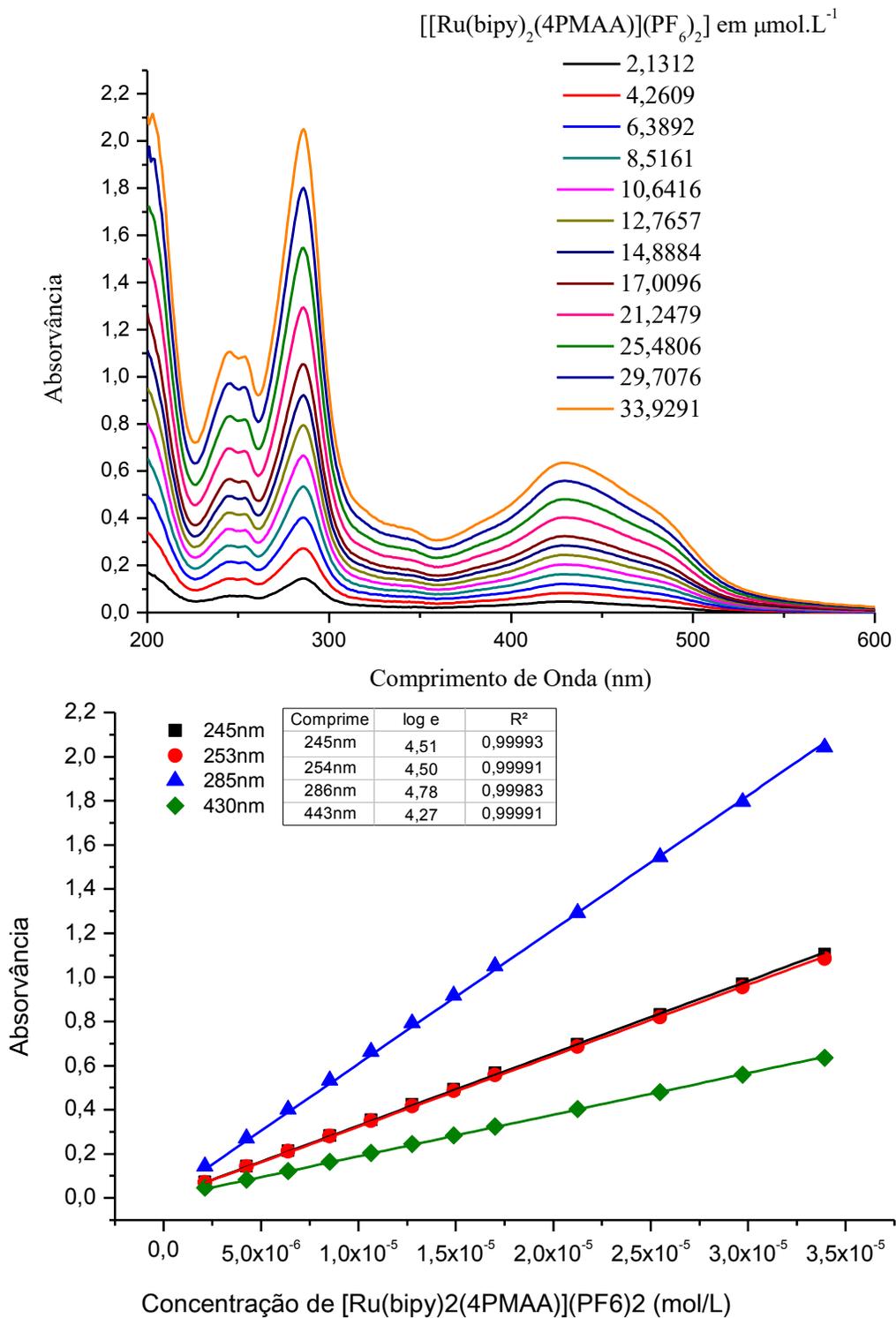


Figura A4. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para [Ru(bipy)₂(4PMAA)](PF₆)₂ em acetonitrila.

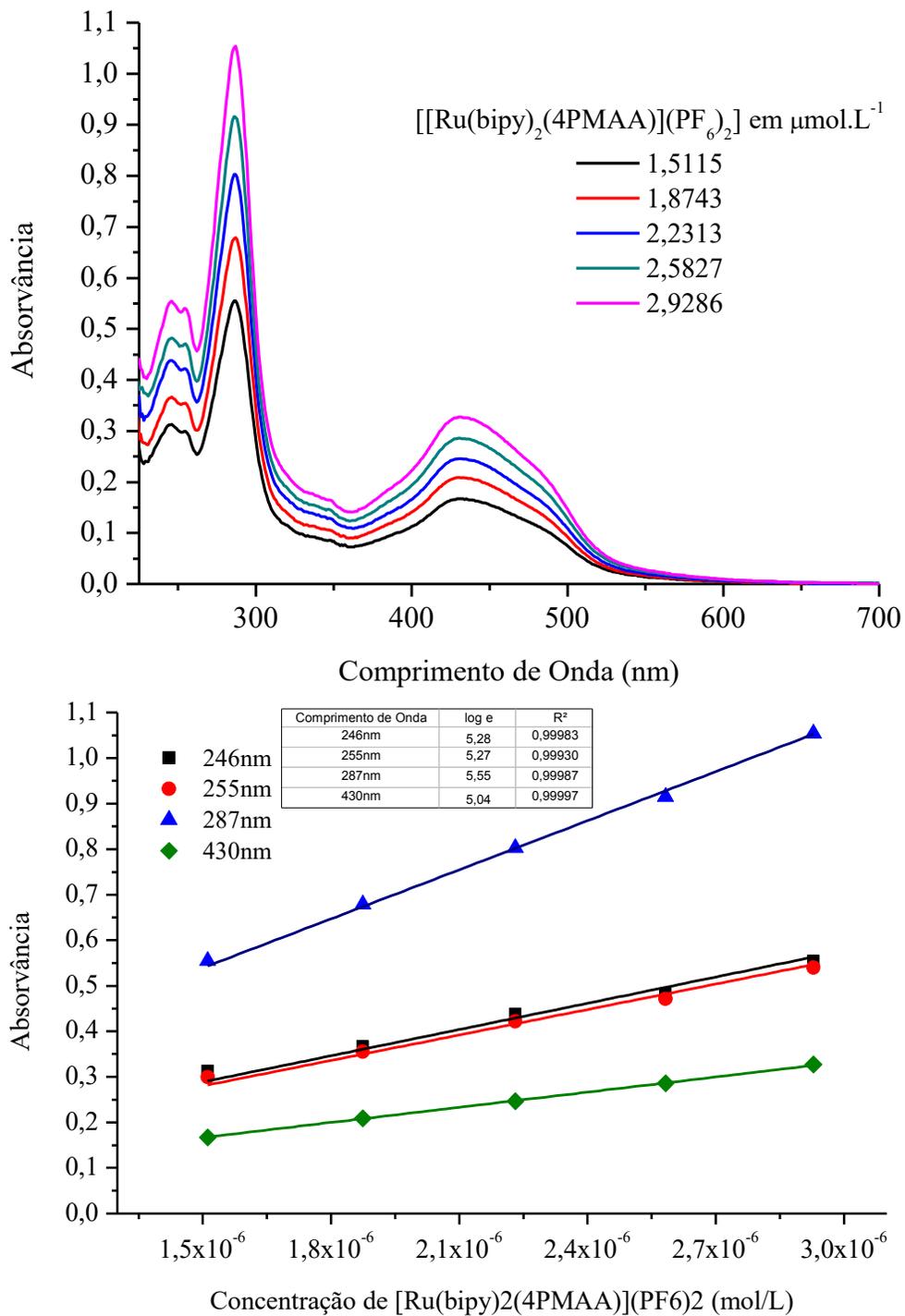


Figura A5. Espectros de absorção em várias concentrações (A) e gráficos de absorvância versus concentração em diferentes comprimento de onda (B) para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(4\text{PMAA})](\text{PF}_6)_2$ em DCM.

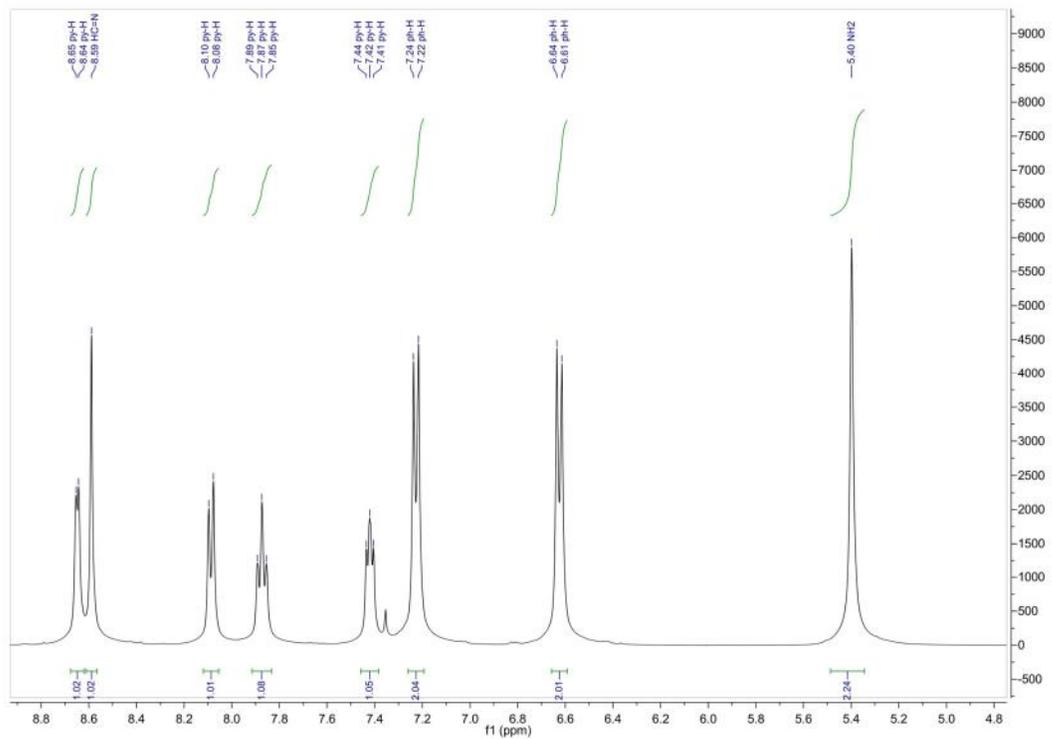


Figura A6. Espectro ^1H RMN de 4PMAA em DMSO-d_6

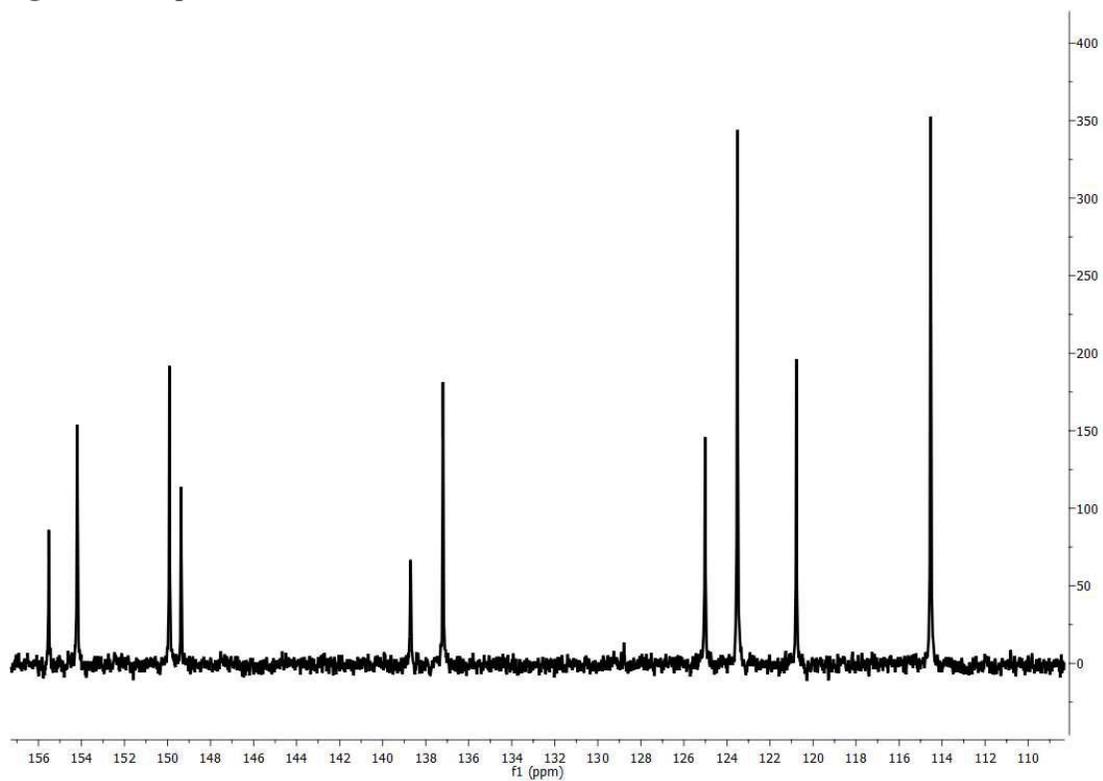


Figura A7. Espectro ^{13}C RMN de 4PMAA em DMSO-d_6

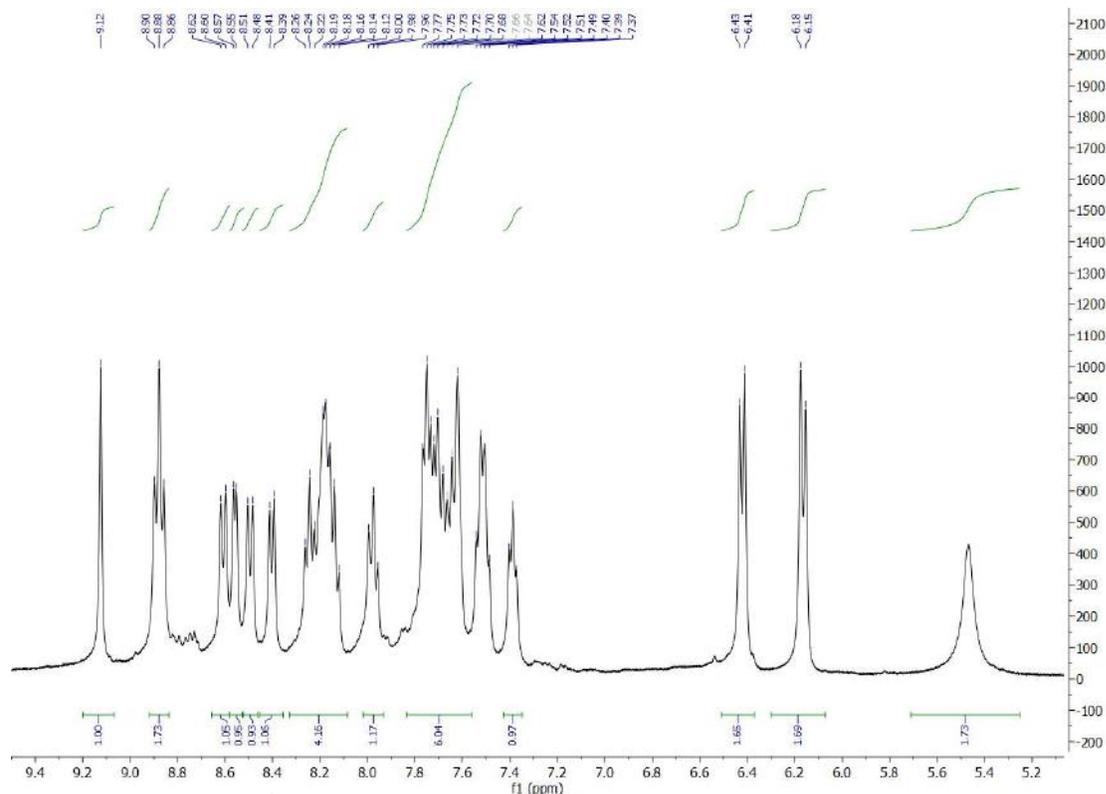


Figura A8. Espectro ^1H RMN de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2]_4\text{PMAA}(\text{PF}_6)_2$ em DMSO-d_6

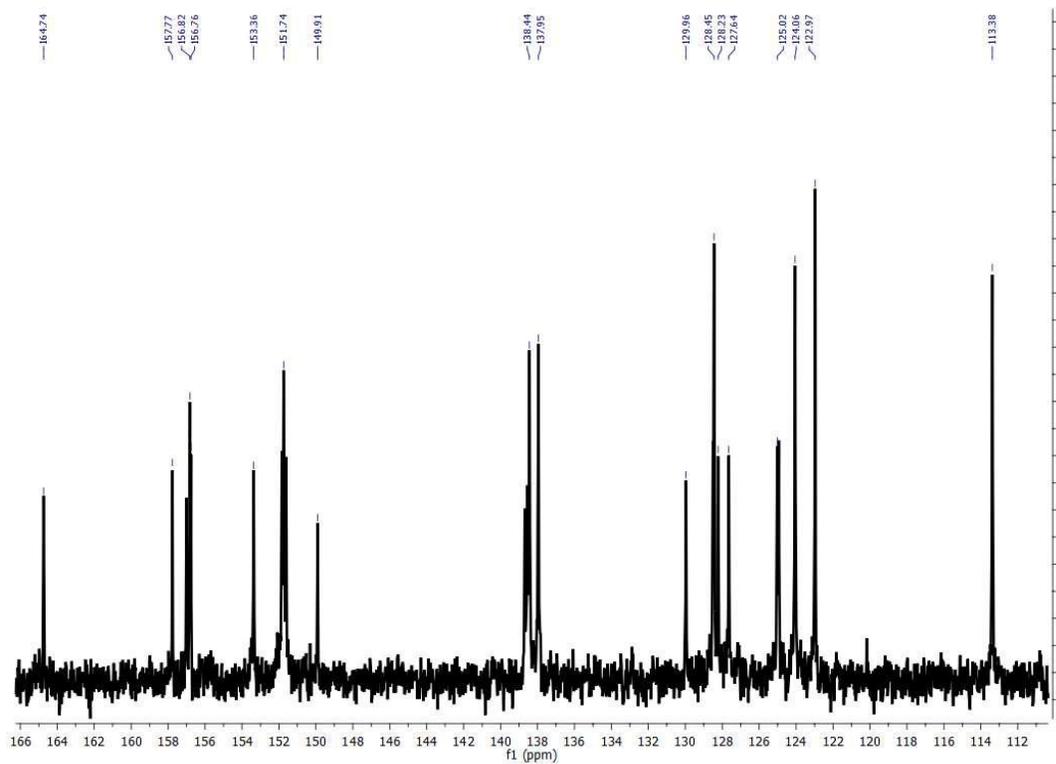


Figura A9. Espectro ^{13}C RMN de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2]_4\text{PMAA}(\text{PF}_6)_2$ em DMSO-d_6

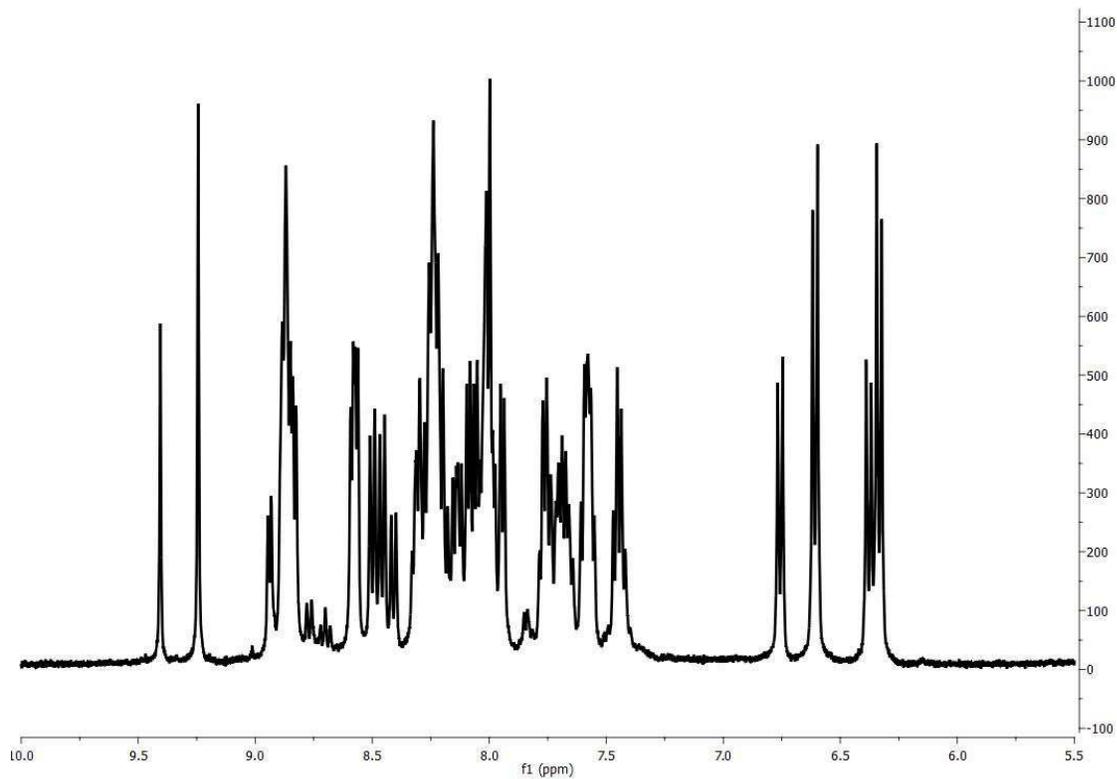


Figura A10. Espectro ^1H RMN de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2]_4\text{PMAA}(\text{PF}_6)_2$ em acetona- d_6

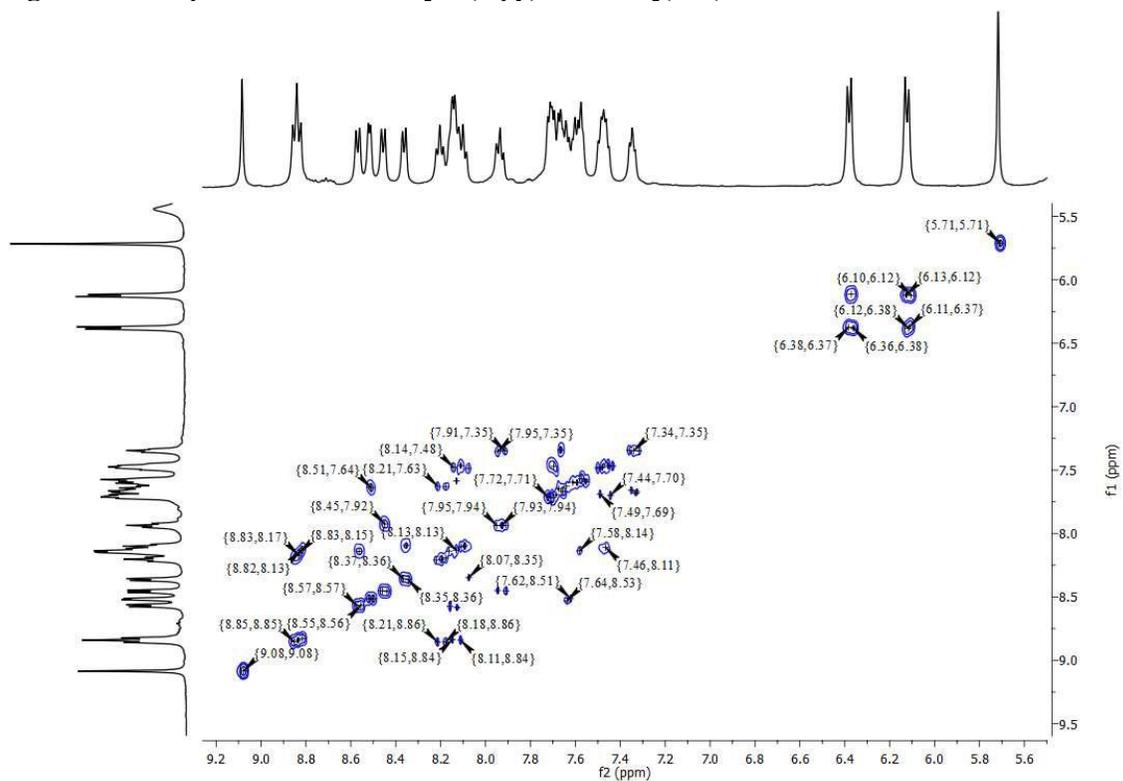


Figura A11. Espectro COSY de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2]_4\text{PMAA}(\text{PF}_6)_2$ em DMSO- d_6

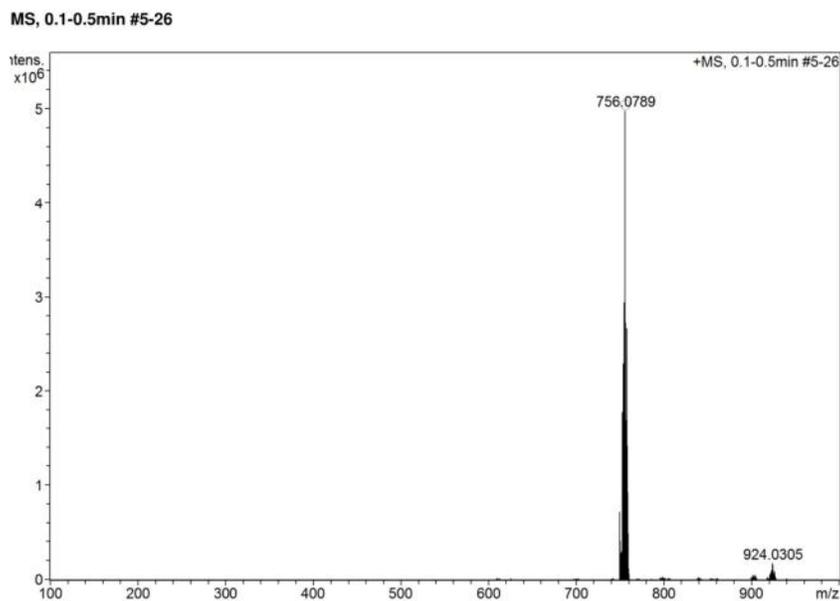


Figura A12. Espectro HRMS de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2]_4\text{PMAA}(\text{PF}_6)_2$.

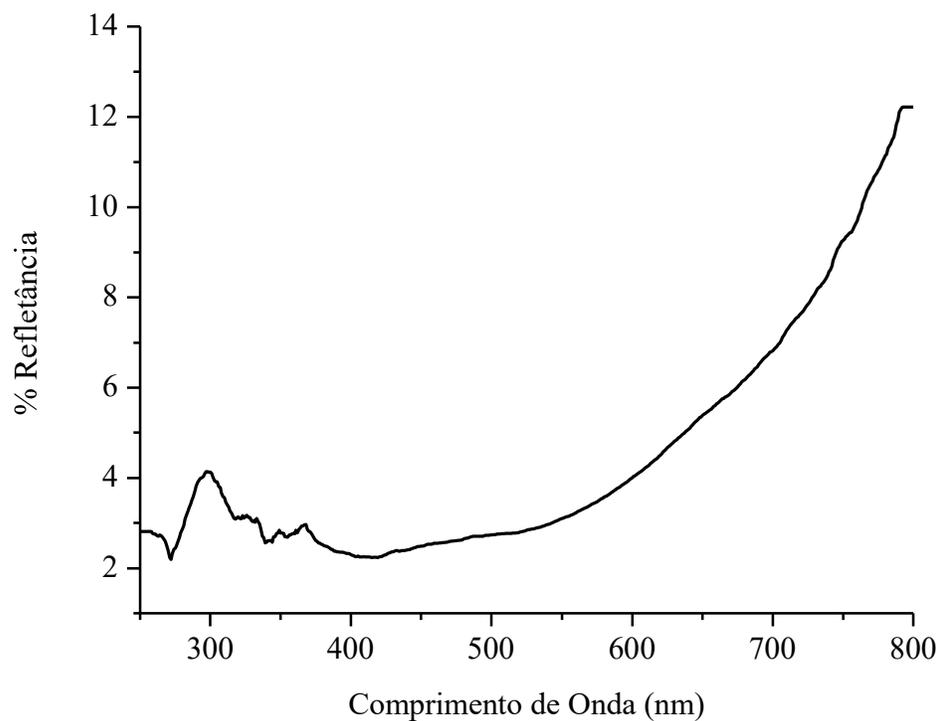


Figura A13. Espectro de refletância $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ - $[\text{Ru}(\text{bipy})_2]_4\text{PMAA}(\text{PF}_6)_2$.

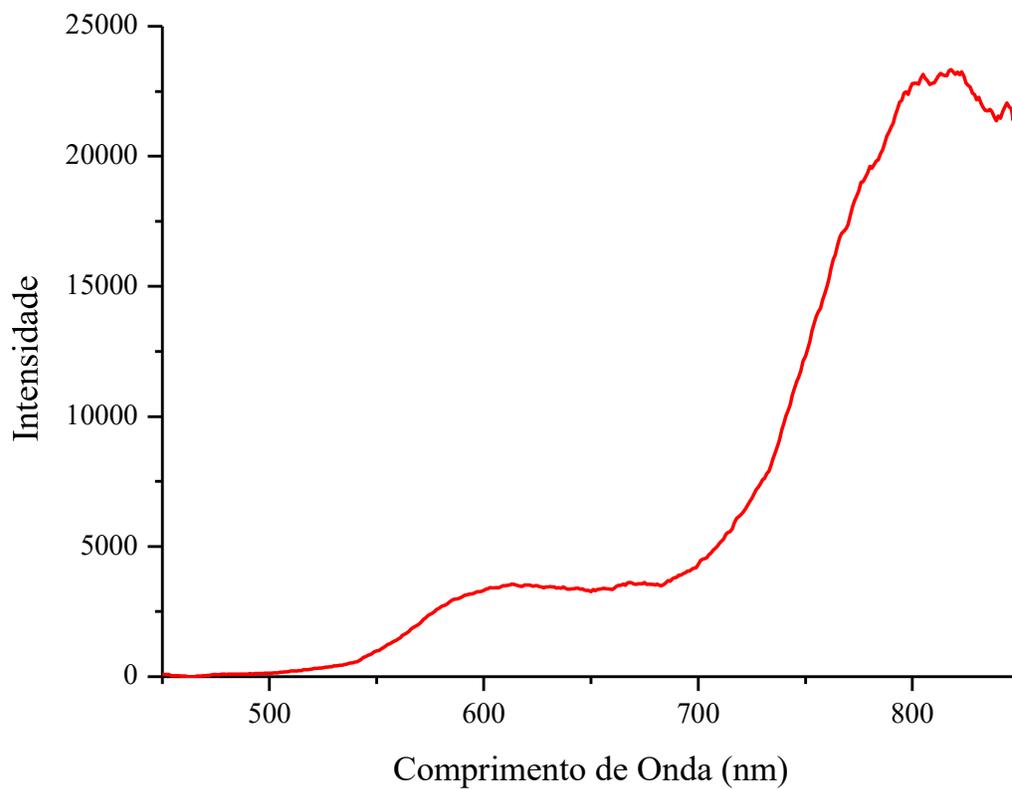


Figura A14. Espectro de emissão do [Ru(bipy)₂PMAA](PF₆)₂ em DMSO

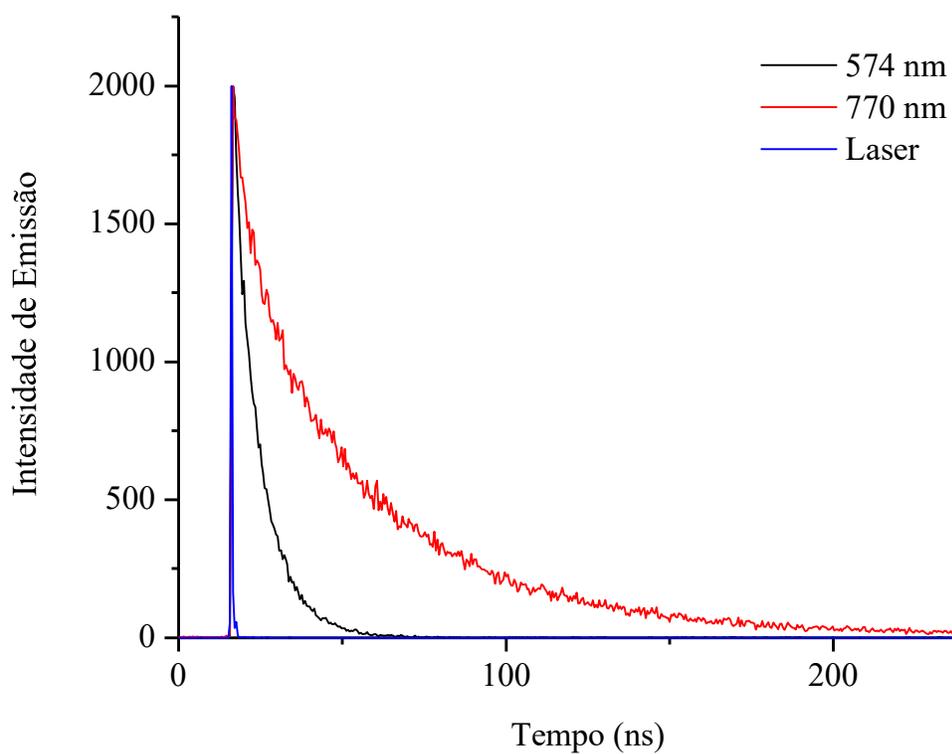


Figura A15. Decaimento do sinal de emissão em relação ao tempo monitorando no comprimento de onda de excitação (azul), em 574 nm (preto) e 770 nm (vermelho) para [Ru(bipy)₂PMAA](PF₆)₂ em MeCN.

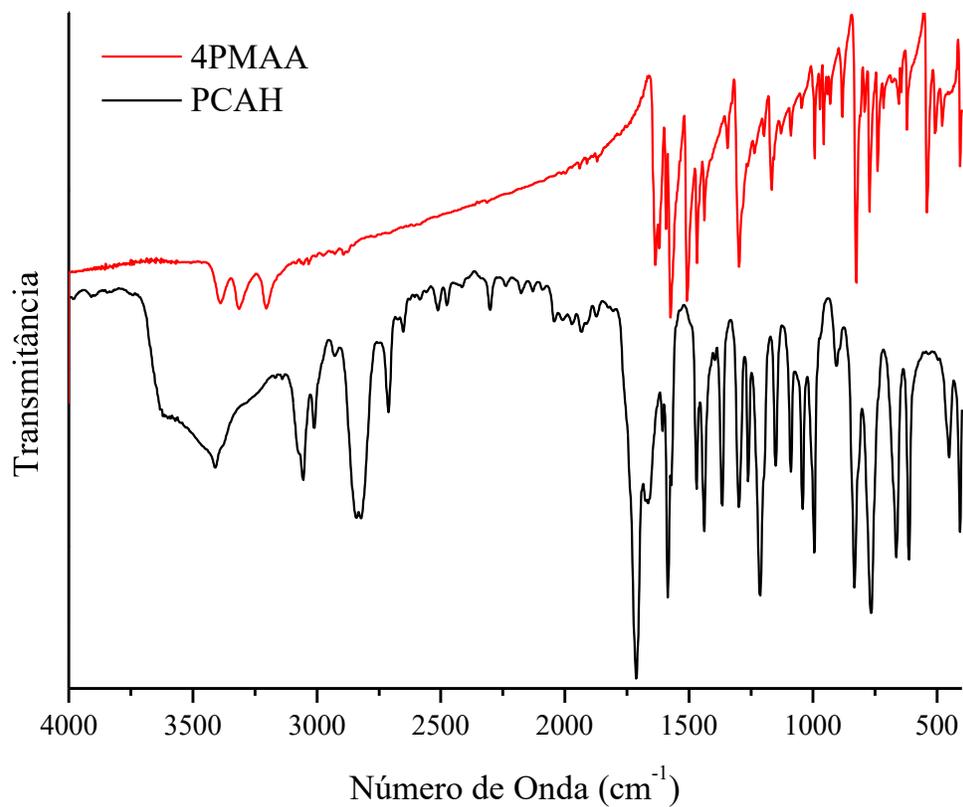


Figura A16. Espectro FTIR de 4PMAA e PCAH.

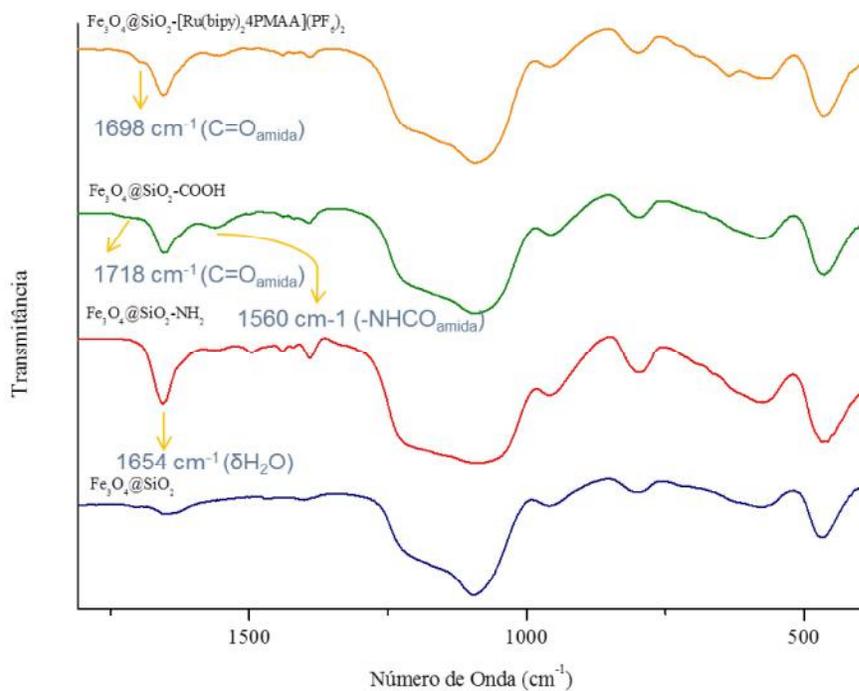


Figura A17. Espectros FTIR ampliado na região de menor número de onda de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (azul), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (vermelho), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ (verde) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-[Ru(bipy)}_2\text{4PMAA)](PF}_6\text{)}_2$ (laranja).

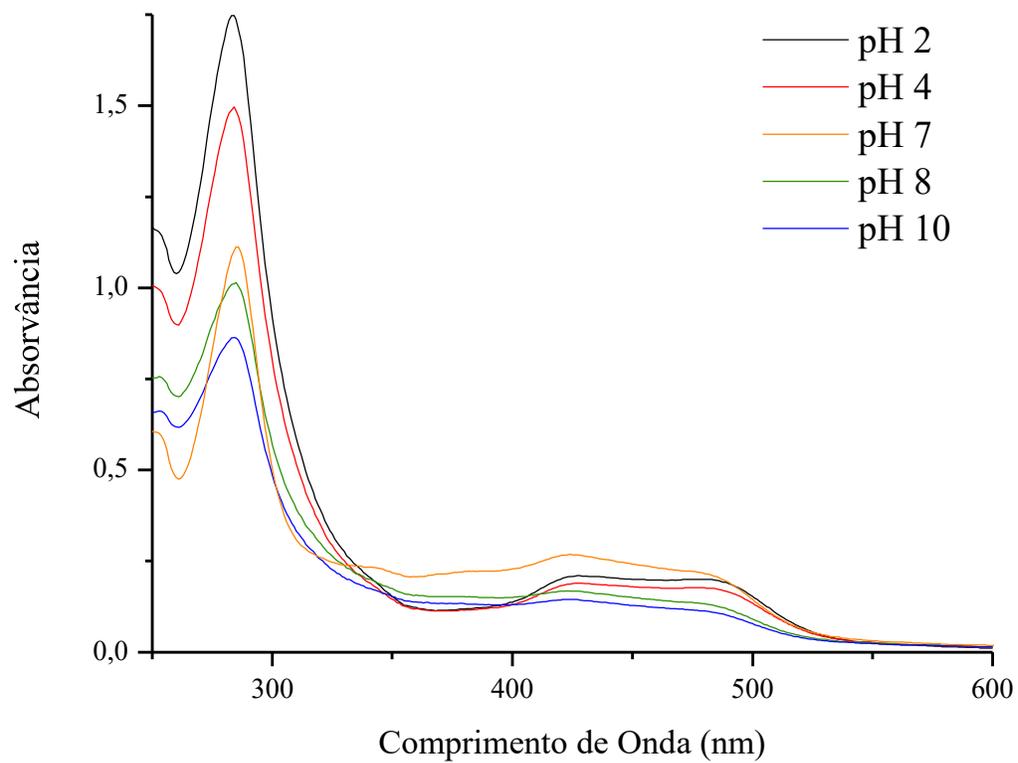


Figura A18. Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{PMAA}](\text{PF}_6)_2$ em diferentes solventes em diferentes valores de pH.