

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais (LAFOT-CM)

MARCOS EDUARDO GOMES DO CARMO

Propriedades fotofísicas de complexos bis-heterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2-piridil)benzimidazol e seus potenciais usos como biomarcadores

Uberlândia – MG

2022

MARCOS EDUARDO GOMES DO CARMO

Propriedades fotofísicas de complexos bis-heterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2-piridil)benzimidazol e seus potenciais usos como biomarcadores

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, na área de concentração Fotoquímica, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Otavio de Toledo Patrocínio

Uberlândia – MG

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C287 2022	<p>Carmo, Marcos Eduardo Gomes do, 1998- Propriedades fotofísicas de complexos bis- heterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2- piridil)benzimidazol e seus potenciais usos como biomarcadores [recurso eletrônico] / Marcos Eduardo Gomes do Carmo. - 2022.</p> <p>Orientador: Antonio Otavio de Toledo Patrocínio. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.383 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Patrocínio, Antonio Otavio de Toledo, 1983-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 54</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 345, PPGUI				
Data:	Quatorze de julho de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	11:50
Matrícula do Discente:	12012QMI008				
Nome do Discente:	Marcos Eduardo Gomes do Carmo				
Título do Trabalho:	Propriedades fotofísicas de complexos bis-heterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2-piridil)benzimidazol e seus potenciais usos como biomarcadores				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Bioinorgânica, Fotoquímica e Fotobiologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Preparação e caracterização de complexos e óxidos metálicos para aplicação em catálise, novos fármacos e conversão de energia				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Teams, link https://teams.microsoft.com/d/launcher/launcher.html?url=%2F_%23%2F%2Fmeetup-join%2F19%3A6V4Vpf-SwYAt9IGBww0XOnvgU9WjijQLiIEEmuBzqrk1%40thread.tacv2%2F1654007713715%3Fcontext%3D%257b%2522Tid%2522%253a%2522cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%2522%252c%2522Oid%2522%253a%252244beae2-a3e1-4a65-8320-88b2e06d3952%2522%257d%26anon%3Dtrue&type=meetup-join&deeplinkId=9566e802-94c7-4022-8905-69af9a6a7bcf&directDI=true&msLaunch=true&enableMobilePage=true&suppressPrompt=true, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores Carolina Gonçalves Oliveira, da Universidade Federal de Uberlândia; Roberto Santana da Silva, da Universidade de São Paulo e Antonio Otavio Toledo Patrocínio, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Antonio Otavio Toledo Patrocínio, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Otavio de Toledo Patrocínio, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Gonçalves Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Santana da Silva, Usuário Externo**, em 15/07/2022, às 09:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3704299** e o código CRC **163CD1A4**.

Aos meus pais, Clever e Fabiana,
por sempre me apoiarem.

“Aprenda como se fosse viver para sempre”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Otavio de Toledo Patrocinio, pela confiança e ótima orientação durante o mestrado.

Aos meus pais, Clever Arantes do Carmo e Fabiana Gomes Ferreira, por apoiarem minhas decisões e trajetória com muita confiança e carinho.

Aos meus irmãos Kamilly Gomes e Thiago Gomes, pelas conversas, risadas, zoeiras e principalmente pelo carinho e respeito que nos une.

Aos meus grandes amigos James Michael e Gustavo Buzi e Thiago Felipe por estarem sempre presentes, mesmo que de longe, em momentos de conquista, alegria e dificuldade.

Ao meu amigo Matheus Barros pela companhia e cumplicidade que nos uniram nestes dois anos.

Aos meus amigos da UFU, Adrielle Santos, Amanda Nascimento, Gabriela Nunes, Higor Alves, Roberta Macêdo e Thamires Turassa por terem acrescentado diversão e leveza durante a realização deste mestrado.

Aos meus companheiros de laboratório do LAFOT – CM, BiomAi e ICBIN, agradeço pelas parcerias, ajudas e dicas durante os dias de trabalho.

Aos Professores Dr. Antônio Eduardo da Hora Machado e Dra. Tayana Mazin Tsubone pelas contribuições dadas ao trabalho.

Ao GMIT, IQ-UFU e ICBIM-UFU pelo apoio estrutural.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. SÍNTESE DOS PRECURSORES	21
3.2. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS COMPLEXOS ESTUDADOS	22
3.3. CULTIVO CELULAR.....	25
3.4. INCORPORAÇÃO DOS COMPLEXOS DE Ir(III) EM CÉLULAS HeLa ..	25
3.5. CITOMETRIA DE FLUXO	26
3.6. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	26
3.7. APARELHAGEM E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	27
3.8. CÁLCULOS TEÓRICOS	30
3.9. TRATAMENTO DE DADOS.....	31
4. RESULTADOS E DISSCUSSÃO	32
4.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	32
4.2. CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA E ELETROQUÍMICA	50
4.3. ENSAIOS DE BIOMARCAÇÃO	72
5. CONCLUSÕES	87
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	88
7. APÊNDICE	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

RESUMO

Neste trabalho os complexos $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{pbi})]$ (Ir1), $[\text{Ir}(\text{pq})_2(\text{pbi})]$ (Ir2) e $[\text{Ir}(\text{ppz})_2(\text{pbi})]$ (Ir3) em que ppy = 2-fenilpiridina, pq = 2-fenilquinolina, ppz = 1-fenilpirazol, e pbi = 2-(2-piridil)benzimidazolo foram sintetizados e caracterizados juntamente com seus respectivos ácidos conjugados $[\text{Ir}(\text{pq})_2(\text{pbiH})]^+$ (Ir1-H), $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{pbiH})]^+$ (Ir2-H), $[\text{Ir}(\text{ppz})_2(\text{pbiH})]^+$ (Ir3-H). A influência da protonação do sítio imidazol do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol nas propriedades fotofísicas e eletroquímicas dos complexos foi investigada em detalhe e indicaram significativa estabilização dos orbitais HOMO diante da protonação do grupo imidazol. Os complexos neutros por sua vez, apresentam rendimentos quânticos de emissão (Φ_{em}) entre 22 e 44% maiores que seus respectivos ácidos conjugados o que foi justificado por meio dos dados de TD-DFT que mostraram maior separação energética entre seus estados excitados tripleto em comparação aos complexos catiônicos. Experimentos de emissão a baixa temperatura (77 K) permitiram classificar os complexos em função da natureza do estado emissor. Os complexos Ir1-H, Ir3-H e Ir3 são agrupados no sistema A que caracteriza-se por possuir estado emissor de caráter $^3\text{MLCT}$ enquanto os complexos Ir1, Ir2 e Ir2-H compõem o sistema B com emissão majoritariamente ^3IL . Os tempos de vida no estado excitado mostraram-se significativamente maiores para emissores ^3IL e ao passo que os dados de emissão estacionária com variação de temperatura (110 a 300 K), mostraram a existência de processos não-radiativos complexos para os sistemas estudados neste trabalho. Ensaio de biomarcação foram realizados para apontar o potencial uso dos complexos como biomarcadores. %uptake (taxa de incorporação) em células HeLa variaram entre 19 (Ir2) e 45% (Ir3). Ensaio de citometria mostraram marcação celular acima de 70% da população de células entre todos os complexos, além de mostrar que não houve mudanças de morfologia nas células incubadas, sugerindo baixa citotoxicidade. Por último, ensaios de microscopia confocal mostraram marcação perinuclear de todos os complexos distribuídos pelo citoplasma celular com potencial especificidade para marcação de lisossomos.

Palavras-chave: complexos de Ir(III), estudo fotofísico, biomarcação de células.

ABSTRACT

In this work the [Ir(ppy)₂(pbi)] (Ir1), [Ir(pq)₂(pbi)] (Ir2) and [Ir(ppz)₂(pbi)] (Ir3) complexes where ppy = 2-phenylpyridine, pq = 2-phenylquinoline, ppz = 1-phenylpyrazole, and pbi = 2-(2-pyridyl)benzimidazole were synthesized and characterized along with their respective conjugated acids [Ir(ppy)₂(pbiH)]⁺ (Ir1-H), [Ir(pq)₂(pbiH)]⁺ (Ir2-H), [Ir(ppz)₂(pbiH)]⁺ (Ir3-H). The influence of the protonation of the imidazole site of the 2-(2-pyridyl)benzimidazole ligand on the photophysical and electrochemistry properties of the complexes was investigated in detail, evidencing a significant stabilization of the HOMO orbitals with the protonation of the imidazole group. The neutral complexes exhibit emission quantum yields (Φ_{em}) between 22 and 44% higher than their respective conjugated acids, which is justified by greater energetic separation between their triplets excited states as shown by TD-DFT calculations. Complementary low temperature emission experiments (77 K) allowed classifying the complexes according to the nature of their emitting state. The Ir1-H, Ir3-H and Ir3 complexes are grouped in the A system, which are characterized by having a ³MLCT state, while the Ir1, Ir2-H and Ir2 complexes are grouped in the B system in which emission is mainly ³IL in character. The excited state lifetimes are significantly higher for ³IL emitters and revealed, together with temperature-dependent steady-state emission measurements (110 to 300 K) the existence of complex non-radiative processes for the systems studied in this work. Biomarking assays were performed to point out the potential use of the complexes as biomarkers. %uptake in HeLa cells ranged between 19 (Ir2) and 45% (Ir3). Flow cytometry assays showed cell staining above 70% of the cell population among all complexes. Additionally, no morphological changes are observed in the incubated cells, suggesting low cytotoxicity. Finally, confocal microscopy assays showed perinuclear labeling of all complexes distributed throughout the cytoplasm with potential specificity for labeling lysosomes.

Keywords: Ir(III) complexes, photophysical study, cell biomarking.

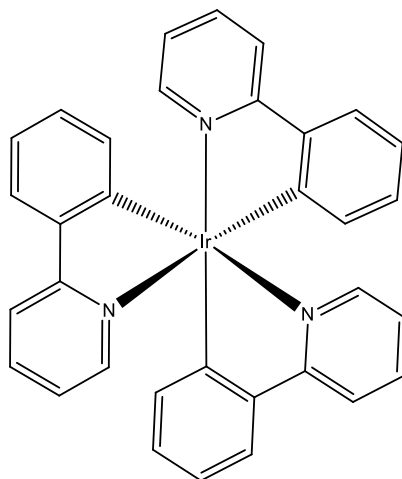
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F12</i> ;
δ	Deslocamento químico (RMN);
$E_{1/2}$	Potencial de pico de meia onda (V);
E_{pa}	Potencial de pico anódico (V);
E_{pc}	Potencial de pico catódico (V);
ϵ	Coeficiente de absorvidade molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$);
Φ_{em}	Rendimento quântico de emissão;
HeLa	Célula de câncer de colo de útero;
IL	Transferência de carga intraligante;
i_{pa}	Corrente de pico anódico (μA);
i_{pc}	Corrente de pico catódico (μA);
J	Constante de acoplamento (Hz);
λ	Comprimento de onda (nm);
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação (nm);
LLCT	Transferência de carga entre os ligantes;
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante;
pbiH	2-(2-piridil)benzimidazol;
ppy	2-fenilpiridina;
ppz	1-fenilpirazol;
pq	2-fenilquinolina;
SFB	Soro Fetal Bovino
TD-DFT	<i>Time-Dependent Density Functional Theory</i>
τ	Tempo de vida do estado excitado (ns);

1. INTRODUÇÃO

Os complexos organometálicos de Ir(III), homolépticos ou bis-heterolépticos, têm atraído grande atenção devido ao vasto campo de aplicações baseadas em suas propriedades fotofísicas (CHI; CHOU, 2010). A classe dos complexos homolépticos de Ir(III) apresenta três ligantes bidentados iguais coordenados ao centro metálico, em que geralmente são utilizados ligantes que se coordenam por átomos de carbono e nitrogênio (C^N) formando anéis de cinco membros com o Ir(III). Um exemplo desta classe de complexos é o *fac*-tris-(2-fenilpiridino)irídio(III) (*fac*-Ir(ppy)₃) (Figura 1), um forte emissor azul bastante estudado na literatura e relatado pela primeira vez por Kuo-Chun e colaboradores em 2004 (TANG; LIU; CHEN, 2004). Nota-se que estes complexos são neutros por possuírem ligantes monoaniônicos em que a carga negativa advém do carbânion desprotonado pelo íon Ir(III). O centro metálico possui interações σ e π com os sítios de coordenação carbono e nitrogênio, respectivamente (ZYSMAN-COLMAN, [s.d.], pp. 2–3).

Figura 1. Representação estrutural do complexo *fac*-tris-(2-fenilpiridinato)irídio(III).

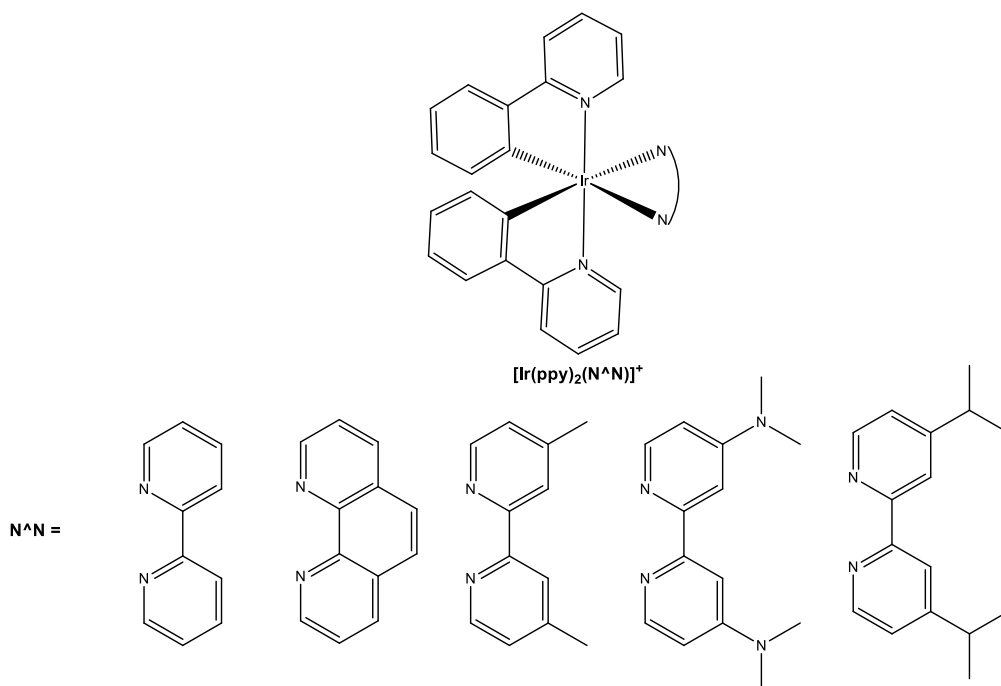


Fonte: O autor.

Além dos complexos homolépticos de Ir(III), também são descritos na literatura complexos bis-heterolépticos que possuem fórmula geral $[\text{Ir}(\text{C}^{\text{N}})_2(\text{N}^{\text{N}})]^+$ ou $[\text{Ir}(\text{C}^{\text{N}})_2(\text{N}^{\text{N}})]$. Nestes casos, N^N são ligantes que se coordenam por dois átomos de nitrogênio dando origem a complexos catiônicos ou neutros, a depender do ligante empregado. Os ligantes N^N são

frequentemente referidos na literatura como ligantes auxiliares. Na Figura 2 são mostrados alguns exemplos de complexos desta classe já relatados na literatura e que tem em comum a 2-fenilpiridina como ligante C[^]N (ZANONI et al., 2015) (TAMAYO et al., 2003) (LO; NG; CHUNG, 2001) (NEVE; CRISPINI, [s.d.]).

Figura 2. Exemplos de complexos bis-heterolépticos de Ir(III) relatados na literatura.



Fonte: O autor.

Apesar de existirem possíveis isômeros para os complexos bis-heterolépticos de Ir(III), em geral, as espécies *trans*-N,N' como representado na Figura 2, são as mais comumente encontradas, uma vez que possuem maior estabilidade devido ao efeito *trans* causado pelo carbânion que é um forte doador σ . Além disso, a rota sintética usada por grande parte dos trabalhos envolve a utilização do dímero ($[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\mu\text{-Cl}_2(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2]$) como precursor (NONOYAMA, 1974) que já possui os ligantes C[^]N dispostos nesta geometria (ZYSMAN-COLMAN, [s.d.], p. 11).

Complexos como estes se destacam por possuírem altos rendimentos quânticos de emissão (Φ_{em}), bandas de emissão facilmente moduláveis de acordo com os ligantes empregados e longos tempos de vida no estado excitado

(ZYSMAN-COLMAN, [s.d.], pp. 3–9). Em decorrência do alto número de oxidação e tamanho do Ir(III), este íon apresenta alto acoplamento spin-órbita, o que confere a estes complexos velocidades de cruzamento intersistema rápidas ($k_{isc} \approx 10^{-15}$ s) gerando emissores puramente fosforescentes. Outro motivo pelo qual os complexos homolépticos e bis-heterolépticos de Ir(III) apresentam destaque em seus Φ_{em} é o grande desdobramento entre os orbitais t_{2g} e e_g do metal em função da formação das ligações C-Ir(III), fazendo com que o estado excitado de campo ligante tenha energia muito superior aos estados de transferência de carga metal para o ligante ($MLCT_{d \rightarrow \pi^*}$) ou intraligante (IL), que por sua vez, tendem a decair radiativamente (CHI; CHOU, 2010; LIU; BIAN; HUANG, 2010; OHSAWA et al., 1987; TSUBOI; HUANG, 2014) (LOWRY; BERNHARD, 2006; NOZAKI, [s.d.]; REDDY; BEJOYMOHANDAS, 2016; ZANONI et al., 2015; ZYSMAN-COLMAN, [s.d.]).

No caso dos complexos homolépticos citados inicialmente, os estudos de modulação de suas propriedades emissivas são limitados a incorporação de grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica nos anéis do ligante C^N com o objetivo de aumentar as energias entre os orbitais de maior energia ocupado (HOMO) e de menor energia desocupado (LUMO), sendo possível construir um gradiente de emissores na região do visível. (TAMAYO et al., 2003). Entretanto os complexos bis-heterolépticos apresentam uma sensibilidade maior para a modulação de suas propriedades fotofísicas de acordo com a modificação dos ligantes. Estudos computacionais empregando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) mostraram que os orbitais HOMO das estruturas estão geralmente distribuídos entre os orbitais do metal e também sobre os ligantes C^N, pelo seu forte caráter doador, enquanto os orbitais LUMO, estão localizados no ligante N^N, típicos aceptores π (LIU; BIAN; HUANG, 2010).

Portanto nos complexos bis-heterolépticos, ajustes finos para modificação das energias dos orbitais LUMO podem ser feitas por meio de modificações nos ligantes auxiliares sem alteração dos ligantes C^N. Analogamente, pode ser realizado a substituição dos ligantes C^N para a modulação da energia dos orbitais HOMO sem que seja alterado a estrutura dos ligantes auxiliares. Sendo assim, alguns estudos têm sido realizados a fim de modular as propriedades espectroscópicas e eletroquímicas destes complexos (DE ANGELIS et al., 2007; FAN; YANG, 2014; LOWRY et al., 2005).

Além dos estudos teóricos por TD-DFT (*Time-Dependent Density-Functional Theory*), a compreensão fotofísica de complexos dessa classe também tem sido realizada por meio de estudos de emissão com variação de temperatura. Estudos como estes são bastante explorados em complexos baseados em outros metais de transição como Ru(II), Os(II), Pd(II), Pt(II) e Rh(III) (BARIGELLETTI et al., 1988; YERSIN; HUMBS; STRASSER, [s.d.]). Para complexos de Ru(II) por exemplo, há estudos detalhados sobre seus processos radiativos e não-radiativos. Complexos de Ru(II) com quelantes diimina (2,2'-bipiridina, por exemplo) apresentam variações em suas constantes de velocidade não-radiativas em temperaturas entre 77 e 300 K que revelam a existência de estados excitados mais altos em energia que podem ser populados termicamente (HAGER; CROSBY, 1975; VAN HOUTEN; WATTS, 1976). Estes estados mais energéticos estão comumente separados por uma energia em torno de 2000 cm^{-1} acima dos estados $^3\text{MLCT}$ de menor energia e contribuem para a diminuição da eficiência de luminescência à temperatura ambiente (MEYER, 1986).

Os complexos de Ir(III) também têm mostrado variações interessantes em função da temperatura, com alguma similaridade ao observado para os complexos polipiridínicos de Ru(II) e Os(II) (HARDING et al., 2008; LO et al., 2006; YANG et al., 2005; YEH et al., 2006). Em particular destacam-se estudos com os complexos homolépticos e bis-heterolépticos de Ir(III) que têm mostrado o efeito da desativação de interconversão entre estados tripleto termicamente equilibrados à medida que a temperatura é diminuída. Como resultado, o perfil de luminescência é drasticamente alterado já que à temperatura ambiente ocorre uma mistura entre os estados $^3\text{MLCT}$ e ^3IL (SAJOTO et al., 2009a)

Em virtude das propriedades fotofísicas fascinantes dos complexos de Ir(III), vários campos de desenvolvimento na área de optoeletrônica têm empregado complexos ciclometalados de irídio (III). Alguns estudos destacam o emprego destes complexos em dispositivos de conversão de energia elétrica em luminosa, como os diodos emissores de luz orgânicos fosforescentes (PhOLED) (FAN; YANG, 2014) e células eletroquímicas emissoras de luz (LECs) (MEIER et al., 2013), (BAI et al., 2020). Adicionalmente, no campo da fotossíntese artificial, complexos desta classe são relatados para utilização na quebra de

água em O₂ e H₂ (KANDOTH et al., 2021; WHANG; SAKAI; PARK, 2013) e na redução do CO₂ (KAMADA et al., 2020; KURAMOCHI; ISHITANI, 2016, 2019).

No campo biológico, várias revisões recentes mostraram que os complexos fosforescentes de Ir(III) surgem como candidatos promissores para amplo uso como quimiossensores, biomarcadores, marcadores tumorais *in vivo* e coloração de compartimentalização de células vivas (CHEN; BIAN; HUANG, 2010; FERNÁNDEZ-MOREIRA; THORP-GREENWOOD; COOGAN, 2010; YANG et al., 2013) (ZHAO; HUANG; LI, 2011). A utilização de alguns compostos luminescentes em estudos biológicos possibilita a compreensão da bioquímica complexa desempenhada nos organismos vivos por meio da utilização destes emissores de luz como rastreadores específicos no meio biológico (YANG et al., 2012b).

Neste sentido vários corantes orgânicos são usados como biomarcadores comerciais, à exemplo da Rodamina 123 (λ_{ex} = 505 nm, λ_{em} = 560 nm, Rh123), MitoTracker® Green FM (λ_{ex} = 490 nm, λ_{em} = 516 nm, MTG) e MitoTracker® Red FM (λ_{ex} = 581 nm, λ_{em} = 644 nm, MTR) que são marcadores seletivos para mitocôndria (CHEN et al., 2014). Embora os coeficientes de extinção molares (ϵ) e rendimentos quânticos de emissão (Φ_{em}) desses corantes sejam elevados, eles são facilmente removidos das células uma vez que as mitocôndrias apresentam uma perda no potencial de membrana com sua incorporação, limitando suas utilizações em células que necessitam ser tratadas com agentes fixadores como aldeídos, por exemplo. Além disso, a utilização de soluções bastante diluídas no imageamento exige uma fotoestabilidade que estes fluoróforos por vezes não apresentam (LEUNG et al., 2013).

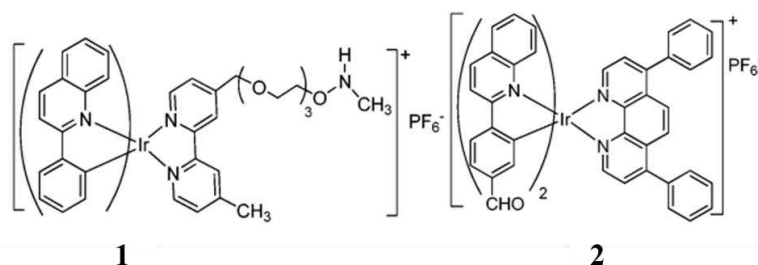
Em contrapartida, a utilização de marcadores biológicos à base de metais pesados são alternativas interessantes por exibirem algumas propriedades mais interessantes para estas aplicações como: grandes deslocamentos de Stokes (centenas de nm), longos tempos de vida no estado excitado (100 ns a ms) e fotoestabilidade (FERNÁNDEZ-MOREIRA; THORP-GREENWOOD; COOGAN, 2010).

As células são a unidade funcional básica da vida e são constituídas por uma membrana que à envolve e separa seu interior do ambiente circundante sendo formada principalmente por uma bicamada fosfolipídica anfifílica. Estas

membranas são responsáveis, entre outras funções, por manterem o potencial elétrico da célula. Logo, para complexos de metais pesados baseados em moléculas pequenas, a absorção celular e compartimentalização geralmente estão relacionados à sua carga, tamanho, grupo substituinte e hidrofobicidade/hidrofilicidade. (ZHAO; HUANG; LI, 2011).

Além da membrana, a célula é dividida em vários compartimentos que possuem funções específicas de forma que a coloração luminescente de diferentes compartimentos da célula viva é muito importante. A partir disto, alguns complexos de metais pesados fosforescentes vêm sendo desenvolvidos para atuarem como marcadores específicos dos diferentes compartimentos celulares (FERNÁNDEZ-MOREIRA; THORP-GREENWOOD; COOGAN, 2010). Complexos de Ir(III) exibem excelentes propriedades fotofísicas. Recentemente, Lo et al. relataram que dois complexos catiônicos fosforescentes de Ir(III) (Figura 3) localizam-se no citoplasma de células HeLa (câncer de colo de útero), conforme evidenciado por microscopia confocal (HUA-WEI LIU et al., 2010).

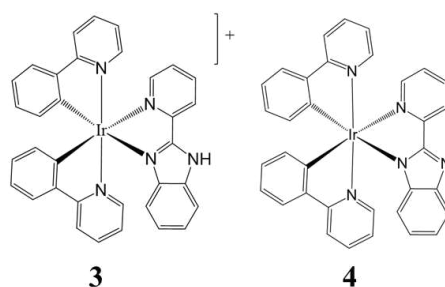
Figura 3. Representação estrutural dos complexos bis-heterolépticos de Ir(III) estudados por Lo e colaboradores seletivos pra imageamento do citoplasma em células HeLa.



Fonte: Adaptado de Lo e colaboradores, 2010.

A coloração de lisossomos também foi relatada com utilização de complexos bis-heterolépticos de Ir(III). No trabalho de Murphy e colaboradores os complexos apresentados na Figura 4 foram avaliados quanto à incorporação e localização em células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e foi notado que seus complexos se distribuem pelo citoplasma e lisossomos (MURPHY et al., 2010).

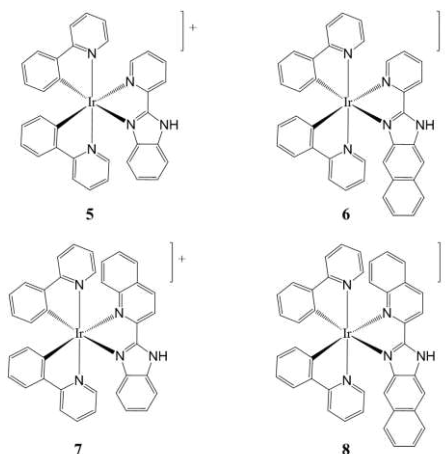
Figura 4. Representação estrutural dos complexos avaliados no trabalho de Murphy e colaboradores como potenciais marcadores de lisossomos.



Fonte: Adaptado de Murphy e colaboradores, 2010.

Além do trabalho de Murphy e colaboradores sobre a luminescência destes complexos, Yu e colaboradores também estudaram alguns complexos bis-heterolépticos de Ir(III) semelhantes (Figura 5) no qual um de seus complexos (estrutura 5) se trata da mesma estrutura 3 relatada por Murphy e colaboradores. Neste trabalho eles também evidenciam a localização desta estrutura nos lisossomos (WANG et al., 2017).

Figura 5. Representação estrutural dos complexos avaliados no trabalho de YU e colaboradores.



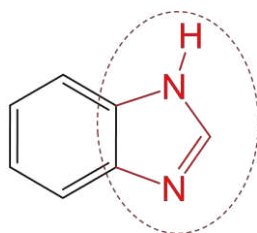
Fonte: Adaptado de Yu e colaboradores, 2010.

A marcação específica destes compartimentos celulares pode ser de suma importância uma vez que o citoplasma é responsável pela sustentação da célula garantindo a movimentação das proteínas e aminoácidos que o constitui.

Por sua vez, o lisossomo é responsável pela digestão de substâncias produzidas erroneamente pela célula (ZHAO; HUANG; LI, 2011).

A fração benzimidazol encontrada no ligante auxiliar destes complexos possui grande relevância no campo da farmacologia. O benzimidazol (Figura 6) é um importante heterociclo de nitrogênio estudado no design de fármacos, o qual foi sintetizado pela primeira vez por Hoebreckner em 1872 (HOBRECKER, 1872). A fração heterocíclica do anel benzimidazol é geralmente referida como imidazol, se tratando do anel heterocíclico de cinco membros contendo um grupo amina e um nitrogênio terciário. Este anel imidazol é encontrado em vários meios biológicos que incluem o α -aminoácido histidina, histamina, purina e biotina.

Figura 6: Representação estrutural do benzimidazol. O destaque em vermelho é referente a sua fração imidazol.

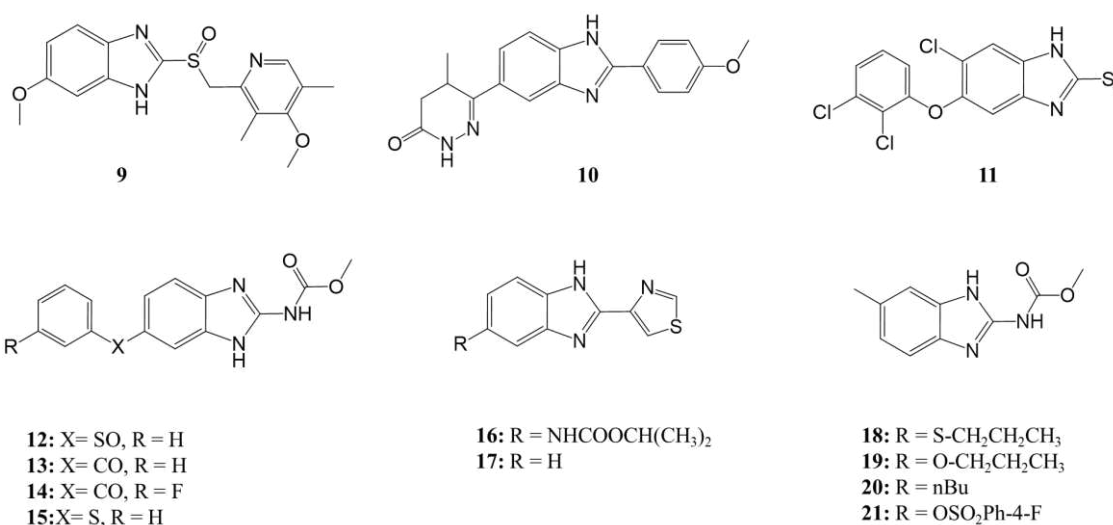


Fonte: O autor.

O benzimidazol e seus derivados formam um grupo importante de moléculas bioativas no campo farmacêutico (VALDEZ et al., [s.d.]). Estes apresentam atividade antiviral, antimicrobiana (FONSECA; GIGANTE; GILCHRIST, 2001), antiinflamatório (PABBA et al., 2005), potencial antitumoral (DENNY; REWCASTLE; BAGULEY, 1990), antiparasitária (PABBA et al., 2005), antiprotozoária (TORRES-GÓMEZ et al., 2008), HIV (PORCARI et al., 1998), anti-herpes (HSV-1)(MIGAWA et al., 1998), RNA (TAMM; SEHGAL, 1978), e anti-citomegalovírus humano (HCMV) (ROTH et al., 1997). Além disso, alguns derivados de benzimidazol demonstraram ser potentes inibidores da topoisomerase I (KIM et al., 1996), neuropeptídeos seletivos para antagonistas do receptor Y1 (ZARRINMAYEH et al., 1998), inibidores da angiotensina II (All) (KOHARA et al., 1996), inibidores do HCMV replicação (ROTH et al., 1997), e inibidores da RNA polimerase do vírus da hepatite C (LAPLANTE et al., 2004), dipeptidil inibidores da peptidase IV (WALLACE et al., 2008).

Na figura 7 são apresentadas algumas estruturas de derivados de benzimidazol com propriedades bioativas. Omeprazol (1), Pimobendan (2), Triclabendazol (3), Oxfendazol (4), Mebendazol (5), Flubendazol (6), Fenbendazol (7), Cambendazol (8), Tiabendazol (9), Albendazol (10), Oxibendazol (11), Parbendazol (12), Luxabendazol (13) (KERI et al., 2015).

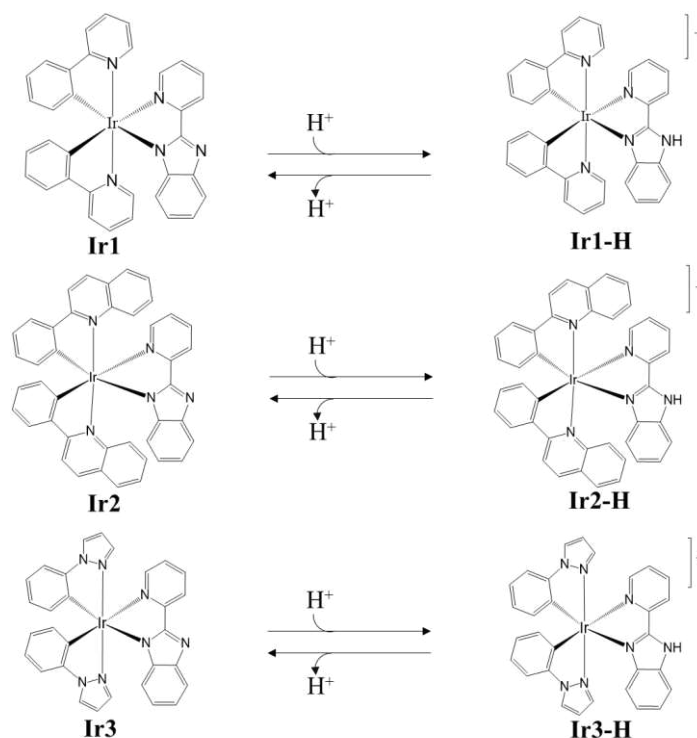
Figura 7: Representação estrutural de derivados do benzimidazol com propriedades bioativas relacionadas.



Fonte: Adaptado de Mallanna e colaboradores, 2015.

Tendo em vista as propriedades fotofísicas abrangentes dos complexos bis-heteroléticos de Ir(III) bem como seu potencial uso como biomarcadores, este trabalho buscou sintetizar e caracterizar uma série de seis complexos bis-heteroléticos de Ir(III) contendo um derivado do benzimidazol (2-(2-piridi)benzimidazol) como ligante auxiliar. Os complexos foram sintetizados com o anel imidazol protonado ou desprotonado (Figura 8), no qual os complexos Ir₂, Ir₃ e Ir₃-H são relatados pela primeira vez nesta comunicação.

Figura 8. Complexos de Ir(III) investigados dispostos em pares ácido/base conjugados.



Fonte: O autor.

Este trabalho procurou explorar o caráter ácido-base do anel imidazol presente no ligante auxiliar estudando cada par conjugado separadamente quanto a suas propriedades fotofísicas e eletroquímicas, buscando assim racionalizar a influência do próton no grupo imidazol sobre tais propriedades. Também foi avaliado o caráter de seus estados excitados de menor energia bem como a dinâmica entre estados termicamente equilibrados por meio de experimentos de emissão estacionária em temperatura ambiente (300 K) e a baixas temperaturas. Os dados experimentais foram racionalizados com o auxílio de cálculos teóricos (TD-DFT).

O potencial destes complexos como biomarcadores em células HeLa também foi avaliado utilizando técnicas como citometria de fluxo e microscopia confocal para avaliar quantitativamente o papel das espécies como marcadores celulares, bem como a possibilidade de marcação compartimentalizada. Os ligantes C^N foram escolhidos de forma a construir um gradiente de conjugação eletrônica e lipofilicidade. Os estudos de caráter fundamental visam contribuir para a compreensão das propriedades desses complexos bis-heteroléticos de

Ir(III), bem como no desenvolvimento de novos biomarcadores baseados em complexos de Ir(III).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho envolveu a realização de estudos fotofísicos fundamentais para investigar o comportamento de complexos bis-heterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2-piridil)benzimidazol como ligante auxiliar. Tal ligante contém um sítio de protonação que é influenciado pelo o ambiente de coordenação do centro metálico e, portanto, leva a mudanças no comportamento fotofísico dos complexos em si, tendo em vista seus potenciais biológicos estas estruturas foram também estudadas como biomarcadores celulares.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de seis complexos bis-heterolépticos de Ir(III) dispostos na forma de três pares ácido/base utilizando os ligantes 2-fenilpiridina, 2-fenilquinolina e 1-fenilpirazol como ligantes C^N para a confecção dos pares Ir1/Ir1-H, Ir2/Ir2-H e Ir3/Ir3-H, respectivamente, onde o ligante 2-(2-piridil)benzimidazol é sempre o ligante auxiliar;
- Caracterização dos seis complexos quanto à pureza, propriedades espectroscópicas e eletroquímicas em solução;
- Avaliação das propriedades emissivas destes complexos em solução e em meio rígido com realização de medidas de emissão estacionária em diferentes temperaturas (77 K – 300 K);
- Elucidação fotofísica de cada complexo e racionalização da influência da protonação do ligante auxiliar em tais propriedades;
- Avaliação do potencial destes complexos atuarem como biomarcadores em células HeLa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE DOS PRECURSORES

3.1.1. μ -diclorobis(2-fenilpiridino)irídio(III) $[\{(\text{Ir}(\text{ppy})_2)_2(\mu\text{-Cl})_2\}]$

O precursor $[\{(\text{Ir}(\text{ppy})_2)_2(\mu\text{-Cl})_2\}]$ foi sintetizado conforme descrito por Nonoyama, 1974 com algumas adaptações (NONOYAMA, 1974). Nesta síntese 0,1200 g de $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,4 mmol) e 143,9 μL de 2-fenilpiridina (ppyH) (1,000 mmol) foram refluxados a 120 °C em 12,00 mL de uma mistura 3:1 de 2-Etoxietanol e H_2O em atmosfera de Argônio por 24 h acompanhada por TLC. O precipitado amarelo formado foi filtrado sob pressão reduzida em filtro de placa porosa e lavado com água e éter de etila. Foi obtido 0,1553 g de produto $[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{Cl}]_2$, correspondente a um rendimento de 70% no qual foi usado em procedimentos posteriores sem purificação adicional.

3.1.2. μ -diclorobis(2-fenilquinoloino)irídio(III) $[\{(\text{Ir}(\text{pq})_2)_2(\mu\text{-Cl})_2\}]$

O dímero $[\{(\text{Ir}(\text{pq})_2)_2(\mu\text{-Cl})_2\}]$ foi sintetizado conforme descrito por Nonoyama, 1974 com algumas adaptações (NONOYAMA, 1974). Nesta síntese 0,2700 g de $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,9043 mmol) com 0,3740 g de 2-fenilquinolina (pqH) (1,822 mmol) foram refluxados a 120°C em 25,00 mL de uma mistura 3:1 de 2-Etoxietanol e H_2O sob atmosfera de argônio por 26 h acompanhada por TLC. A solução final, de coloração vermelho forte, foi arrefecida a temperatura ambiente, posteriormente filtrada sob pressão reduzida em filtro de placa porosa e lavado com água e éter de etila. Foi obtido 0,3905 g de um pó alaranjado correspondente a 68 % de rendimento no qual foi usado em procedimentos posteriores sem purificação adicional.

3.1.3. μ -diclorobis(1-fenilpirazolo)irídio(III) $[\{(\text{Ir}(\text{ppz})_2)_2(\mu\text{-Cl})_2\}]$

O dímero $[\{(\text{Ir}(\text{ppz})_2)_2(\mu\text{-Cl})_2\}]$ foi sintetizado conforme descrito por Nonoyama, 1974 com algumas adaptações (NONOYAMA, 1974). Nesta síntese 0,1162 g de $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,3892 mmol) com 0,1096 g de 1-fenilpirazol (ppzH) (0,7602 mmol) foram refluxados a 120°C em 12,00 mL de uma mistura 3:1 de 2-Etoxietanol e H_2O sob atmosfera de argônio por 20 h acompanhada por TLC. A

solução final, de coloração branca, foi arrefecida a temperatura ambiente, posteriormente filtrada sob pressão reduzida em filtro de placa porosa e lavado com água e éter de etila. Foi obtido 0,1280 g de um pó amarelo claro correspondente a 64 % de rendimento no qual foi usado em procedimentos posteriores sem purificação adicional.

3.2. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS COMPLEXOS ESTUDADOS

3.2.1. Hexafluorofosfato de bis(2-fenilpiridino)-2-(2-piridil)benzimidazolirídio(III) $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{pbiH})]\text{PF}_6$ – (Ir1-H)

Para a síntese do complexo Ir1-H foram adicionados 0,1000 g (0,0900 mmol) do dímero $[\{\text{Ir}(\text{ppy})_2\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$ junto a 0,0410 g (0,1900 mmol) do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol dos quais foram refluxados em 15,00 mL de diclorometano/metanol (5:4) sob atmosfera inerte de argônio por 5 h acompanhada por TLC. Em seguida a mistura foi arrefecida até a temperatura ambiente e adicionou-se excesso de NH_4PF_6 até notar a precipitação de um sólido amarelo. O produto foi primeiramente filtrado sob pressão reduzida em filtro de placa porosa e lavado com éter de etila. Posteriormente, o precipitado foi suspenso em diclorometano e filtrado novamente para remoção de insolúveis.

A recristalização com éter de etila rendeu 0,0748 g de um produto amarelo, correspondente a um rendimento de 47 %.

Análises de ^1H -RMN e CHN foram realizadas. ^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ/ppm) 14,8 (s, 1H); 8,61 (d, 1H); 8,34 (t, 1H); 8,25 (d, 1H); 8,19 (d, 1H); 7,97 – 7,83 (m, 5H); 7,76 (d, 1H); 7,73 – 7,64 (m, 3H); 7,37 (t, 1H); 7,17 – 6,98 (m, 5H); 6,92 (dd, 2H); 6,31 (d, 1H); 6,25 (d, 1H); 6,16 (d, 1H). Os resultados da análise elementar para $\text{C}_{34}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{IrPF}_6$ foram: Calculado C: 48,57%; H: 3,00%; N: 8,33%. Obtido: C: 49,12%; H: 3,08%; N: 8,24%.

3.2.2. Bis(2-fenilpiridino)-2-(2-piridil)benzimidazolirídio(III) $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{pbi})]$ – (Ir1).

Para a síntese do complexo Ir1, 0,0930 g (0,0874 mmols) do dímero $[\{\text{Ir}(\text{ppy})_2\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$ e 0,0364 g (0,1864 mmols) do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol foram refluxados em 13,00 mL de diclorometano/metanol (5:4) na presença de e

0,0120 g de Na_2CO_3 sob atmosfera de argônio por 5 h acompanhada por TLC. Após este tempo, a mistura foi arrefecida a temperatura ambiente e adicionou-se excesso de água na mistura reacional afim de precipitar o complexo formado. Este foi filtrado sob pressão reduzida em filtro de placa porosa e lavado com éter de etila, rendendo 0,0587 g de um pó amarelo, correspondente a 40% de rendimento.

Análises de ^1H -RMN e CHN foram realizadas. ^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ /ppm) 8,37 (d, 1H); 8,18 (d, 1H); 8,13 (d, 1H); 8,02 (t, 1H); 7,90 – 7,74 (m, 4H); 7,67 (dd, 2H); 7,49 (t, 2H); 7,36 (t, 1H); 7,08 (dt, 2H); 6,99 (dt, 2H); 6,90 – 6,82 (m, 3H); 6,56 (t, 1H); 6,33 (dd, 2H); 5,99 (d, 1H). Os resultados da análise elementar para $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{Ir} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram: Calculado: C: 55,88%; H: 3,86%; N: 9,58%. Obtido: C: 55,94%; H: 3,76%; N: 9,25%.

3.2.3. Hexafluorofosfato de bis(2-fenilquinolino)-2-(2-piridil)benzimidazolirídio(III) $[\text{Ir}(\text{pq})_2(\text{pbiH})]\text{PF}_6 - (\text{Ir}2\text{-H})$.

Para a síntese do complexo Ir2-H, foram misturados 0,0740 g do dímero $[\{\text{Ir}(\text{pq})_2\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$ (0,0582 mmol) com 0,0227 g do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol (0,1163 mmol) em 10,00 mL de diclorometano/metanol (5:4) sob atmosfera de argônio por 5 h acompanhada por TLC. Em seguida a mistura foi rotoevaporada completamente e redissolvida em acetonitrila/ H_2O (1:1). Uma solução límpida foi formada e adicionou-se excesso de NH_4PF_6 até notar a precipitação completa de um pó vermelho. Foi realizado uma filtração sob pressão reduzida na qual rendeu 0,0494 g de um pó vermelho, correspondente a 45 % de rendimento.

Análises de ^1H -RMN foram realizadas. ^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ /ppm) 14,3 (s, 1H); 8,53 (dd, 2H); 8,37 (s, 2H); 8,29 (d, 1H); 8,25 – 8,15 (m, 3H); 8,10 (d, 1H); 7,88 (dd, 2H); 7,75 – 7,66 (m, 2H); 7,59 (d, 1H); 7,43 – 7,30 (m, 3H); 7,25 – 7,10 (m, 4H); 7,02 (t, 2H); 6,86 (dt, 2H); 6,68 (t, 1H); 6,42 (d, 1H). Os resultados da análise elementar para $\text{C}_{42}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{IrP F}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foram: Calculado: C: 52,61; H: 3,26; N: 7,30%. Obtido: C: 52,27%; H: 3,22%; N: 6,99%.

3.2.4. Bis(2-fenilquinolino)-2-(2-piridil)benzimidazoloirídio(III) [Ir(pq)₂(pbi)] – (Ir2).

Para a síntese do complexo Ir2, 0,1550 g do dímero $[(Ir(pq)_2)_2(\mu-Cl)_2]$ e 0,0475 g do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol foram refluxados em 20,00 mL de diclorometano/metanol (5:4) sob atmosfera de argônio por 2 h acompanhada por TLC. Em seguida a solução reacional foi arrefecida e para posterior filtragem do precipitado obtido, no qual foi lavado com água e éter de etila. Foi obtido 0,0775 g de um pó vermelho, correspondente a 40 % de rendimento.

Análises de ¹H-RMN foram realizadas. ¹H-RMN ($(CD_3)_2SO$) δ/ppm) 8,77 (d, 1H); 8,74 (d, 1H); 8,35 (d, 1H); 8,04 (t, 1H); 7,88 (d, 1H); 7,88 (d, 1H); 7,63 (t, 2H); 7,51 (d, 1H); 7,36 (t, 1H); 7,00 – 6,76 (m, 6H); 6,64 - 6,54 (m, 4H); 6,37 (d, 1H); 6,30 (d, 1H); 6,14 (d, 1H). Os resultados da análise elementar para C₄₂H₂₈N₅Ir.H₂O foram: Calculado: C: 62,05; H: 3,72; N: 8,61%. Obtido: C: 62,23%; H: 3,63%; N: 8,37%.

3.2.5. Hexafluorofosfato de bis(2-fenilpirazolo)-2-(2-piridil)benzimidazolirídio(III) [Ir(ppz)₂(pbiH)]PF₆ – (Ir3-H).

Para a síntese do complexo Ir3-H, 0,0530 g do dímero $[(Ir(pq)_2)_2(\mu-Cl)_2]$ (0,0515 mmol) e 0,0220 g do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol (0,1127 mmol) foram refluxados em 7,000 mL de diclorometano/metanol (5:4) sob atmosfera de argônio por 4 h acompanhada por TLC. Em seguida a mistura foi arrefecida a temperatura ambiente e adicionado excesso NH₄PF₆. A solução reacional foi deixada a 10°C por 12 h rendendo monocristais que foram filtrados sob pressão reduzida e lavados com água e éter de etila. Foram obtidos 0,0495 g de cristais amarelos, correspondente a um rendimento de 58,7%.

Análises de ¹H-RMN foram realizadas. ¹H-RMN ($(CD_3)_2SO$) δ/ppm) 14,7(1, 1H); 8,85 (d, 1H), 8,80 (d, 1H); 8,58 (d, 1H), 8,33 (t, 1H), 8,01 (d, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,71 – 7,64 (m, 3H), 7,37 (t, 1H), 7.21-6,99 (m, 5H); 6,86 (dt, 2H), 6,64 (dd, 2H), 6,32 – 6.25 (m, 3H). Os resultados da análise elementar para C₃₀H₂₃N₇IrPF₆ foram: Calculado: C: 44,01%; H: 2,83%; N: 11,98%. Encontrado: C: 43,82%; H: 2,74%; N: 11,88%.

3.2.6. Bis(2-fenilpirazolo)-2-(2-piridil)benzimidazoloirídio(III) [Ir(ppz)₂(pbi)] – (Ir3).

Para a síntese do complexo Ir3, 0,0500 g do dímero $[(Ir(pq)_2)_2(\mu-Cl)_2]$ (0,0487 mmol) e 0,0210 g do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol (0,1077 mmol) foram refluxados em 10,00 mL de diclorometano/metanol (5:4) na presença de 0,0680 g de Na₂CO₃ sob atmosfera de argônio por 4 h acompanhada por TLC. A solução reacional foi deixada a 10°C por 12 h rendendo um pó amarelo que foram filtrados sob pressão reduzida e lavados com água e éter de etila. Foram obtidos 0,0210 g de um pó amarelo, correspondente a um rendimento de 40 %.

Análises de ¹H-RMN foram realizadas. ¹H-RMN ($(CD_3)_2SO$) δ/ppm) 8.75 (dd, 2H), 8.35 (dt, 1H), 8.04 (td, 1H), 7.88 (dt, 1H), 7.63 (ddd, 2H), 7.51 (dd, 1H), 7.36 (ddd 1H), 7.00 (ddd, 3H), 6.89 (ddd, 1H), 6.86 – 6.77 (m, 2H), 6.65 – 6.54 (m, 4H), 6.37 (dd, 1H), 6.30 (dd, 1H), 6.14 (dt, 1H). Os resultados da análise elementar para C₃₀H₂₂N₇Ir.2H₂O foram: Calculado: C: 50,84%; H: 3,70%; N: 13,83%. Obtido: C: 50,95%; H: 3,29%; N: 13,64%.

3.3. CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas células de linhagem HeLa em todos os experimentos de biomarcação. Estas células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibióticos (penicilina e estreptomicina). A cultura celular foi realizada em garrafas de 75 cm² com tampa ventilada. As garrafas foram mantidas dentro de incubadoras umidificadas contendo 5% CO₂ e temperatura de 36 °C disponibilizado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da UFU.

3.4. INCORPORAÇÃO DOS COMPLEXOS DE Ir(III) EM CÉLULAS HeLa.

O tempo e concentração de incubação dos complexos de Ir(III) se deu de acordo com o reportado no trabalho de Murphy e colaboradores, 2010 com algumas adaptações (MURPHY et al., 2010). As células HeLa foram incubadas em placas de 12 poços (8000 células/poço) por 18 h em estufa de CO₂ (5%) a 36 °C. Após isso, os poços foram lavados com PBS 1x estéril e foi acrescentado 1 μ M de cada complexo diluído em DMEM com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino)

e 1% de antibióticos. Como estes complexos não são solúveis em meio aquoso, foi acrescentado 0,1 % de DMSO em cada solução.

A incubação se deu por 4 h em estufa de CO₂ (5%) a 36°C. Após este tempo, foi retirado 500 µL de sobrenadante de cada poço. As células foram lavadas com PBS 1x para posterior adição de 500 µL de DMSO por poço, a fim de extrair a quantidade de complexo incorporado na célula.

As soluções do sobrenadante e de complexo extraído foram completadas para 3 mL com DMEM e purgadas com argônio por 5 min para posterior leitura de suas emissões. A determinação do %uptake (taxa de incorporação) foi realizada por meio de leituras de emissão estacionária do sobrenadante e solução de complexo extraído usando a equação 1.

$$\% \text{ Uptake} = \frac{S_{cell}}{S_{cell} + S_{supernatant}} \times 100 \quad (1)$$

Em que,

S_{cel} = área da banda de emissão da solução de complexo extraído da célula.

$S_{supernatant}$ = área da banda de emissão do sobrenadante.

3.5. CITOMETRIA DE FLUXO.

Para os ensaios de citometria as células foram incubadas sob mesmas condições que as otimizadas para determinação do %uptake. Ao final da incubação as mesmas foram lavadas com PBS 1x, suspensas com adição de tripsina em cada poço e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm. Cada tapete celular foi lavado duas vezes com PBS 1x e ressuspenso em 500 µL de PBS 1x para leitura no citômetro.

3.6. MICROSCOPIA CONFOCAL.

Para os ensaios de microscopia confocal as células foram incubadas nas mesmas condições estabelecidas para determinação do %uptake porém com o dobro de células por poço (16000), em placas de 6 poços. Após a incubação as lamínulas foram lavadas com PBS 1x e fixadas com formaldeído 4%. Foi realizada marcação com um padrão de núcleo (To-Pro-3) e um padrão de lisossomos (Lysotracker Yellow - LTY). O To-Pro-3 foi excitado em 642 nm com intervalo de emissão definido entre 600 e 700 nm, enquanto o LTY e os

complexos foram excitados em 488 nm com intervalos de emissão entre 600 e 700 nm e 500 e 600 nm, respectivamente.

3.7. APARELHAGEM E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

3.7.1. Cromatografia de camada delgada – TLC

O monitoramento das sínteses foi realizado por TLC (*Thin-Layer Chromatography*). As amostras foram aplicadas sobre as placas cromatográficas da marca Aldrich contendo um indicador luminescente quando irradiado a 254 nm. A fase móvel utilizada, comum para todas as sínteses, foi diclorometano/metanol (20:1). A revelação das manchas foi realizada em uma câmara escura Spectroline modelo CM-10A com iluminação UV em 254 e 365 nm.

3.7.2. Espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram obtidos nos espectrofotômetros Shimadzu modelo UV-2501 BC e Thermo Scientific modelo Evolution 201. Na leitura dos ensaios foram utilizadas cubetas de quartzo no formato retangular com caminho óptico de 1,000 cm.

3.7.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho – FTIR

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FTIR Frontier Single Range – MIR, na região de 4000 a 220 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As medidas foram realizadas com o auxílio do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante.

3.7.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H – RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker modelo Ascend 400 (400 MHz) do

Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU).

3.7.5. Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN).

A análise elementar foi realizada em um analisador Perkin Elmer 2400 CHNS do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU).

3.7.1. Voltametria cíclica.

Os voltamogramas cíclicos foram realizados utilizando um potenciostato modelo PGSTAT204 (Metrohm Autolab). Nos experimentos, foi utilizado uma cela eletroquímica contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho (carbono vítreo), contra eletrodo (fio de platina) e eletrodo de referência (Ag/AgCl (3 mol.L⁻¹ KCl)). O solvente utilizado foi acetonitrila anidra (CH₃CN) (Sigma-Aldrich) contendo hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆) (Sigma-Aldrich) 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito suporte. O sistema foi mantido em atmosfera de argônio durante toda a análise.

3.7.2. Difração de monocristal por raios X.

Os monocristais foram obtidos por meio de evaporação lenta em CH₃OH/CH₂Cl₂. As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro instalado no Instituto de Química e Bioquímica da Freie Universität em Berlin em parceria com o professor Dr. Pedro Ivo da Silva Maia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Foi utilizada radiação Mo-K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) com monocromador de grafite.

A estrutura foi resolvida por métodos diretos com o programa SHELXS-97 no qual os modelos foram refinados pelo método dos mínimos quadrados, usando uma matriz completa, através do programa SHELXL-2013.

Os programas ORTEP- 3 e POV-Ray foram utilizados para a análise e elaboração das representações gráficas das estruturas.

3.7.3. Espectroscopia de emissão estacionária em solução a temperatura ambiente (300 K) e baixa temperatura (77 K).

As medidas foram realizadas com o espectrofluorímetro Horiba modelo Fluoromax-4, empregando o a abertura de fenda apropriada para cada sinal no monocromador de excitação e/ou emissão em função da intensidade do sinal. Além disso, foi empregado um filtro de corte GG400, a fim de remover os sinais advindos de efeitos de 2ª ordem e/ou espalhamento do feixe de excitação.

As medidas de emissão estacionária a 300 K foram realizadas em solução de CH₃CN grau HPLC para as caracterizações fotofísicas e em DMEM/DMSO para as determinações de %uptake. Todas as soluções foram desaeradas sob purga de Argônio. Os espectros a 77 K foram adquiridos em mistura vítrea de propilnitrila/butilnitrila (5:4) em um frasco de Dewar com N₂ líquido.

3.7.4. Espectroscopia de emissão estacionária em meio fluido (propilnitrila/butilnitril (5:4)) com gradiente de temperatura (110 K – 300 K).

As medidas de emissão com variação de temperatura foram realizadas acoplado um Janis Criostato de nitrogênio líquido VNF-100 (Los Angeles, EUA) em um espectrofluorímetro Horiba modelo Fluoromax-4. As amostras foram mantidas em uma cubeta de quartzo de 0,1000 cm colocada a aproximadamente 45° em relação ao feixe de excitação. Para atingir as baixas temperaturas a câmara de amostra foi isolada do meio externo por meio de evacuação a 10⁻⁴ torr para reduzir/eliminar a condensação da umidade. O controle de temperatura foi realizado com um controlador Cryo-com 22C conectado a um termômetro de diodo de Si embutido. As amostras foram mantidas pelo menos 30 min em cada temperatura para assegurar o equilíbrio térmico.

3.7.5. Emissão resolvida no tempo

As medidas de emissão resolvida no tempo foram realizadas em parceria com o Laboratório de Sistemas Moleculares Complexos da UFPA pelo aluno Jefferson Marcio Sanches Lopes. Os experimentos foram realizados com um sistema de contagem de fótons único correlacionado com o tempo (TCSPC) da

Horiba (Delta-Flex) equipado com um laser pulsado ($\lambda_{exc} = 352 \text{ nm}$) com 8 MHz de taxa de repetição e 27 ps por canal como fonte de excitação. As amostras foram mensuradas em CH_3CN na presença de O_2 e desaeradas com fluxo de N_2 .

3.7.6. Citometria de fluxo

As citometrias de fluxo foram realizadas em um citoflex da Beckman Coulter disponibilizado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da UFU. As leituras foram realizadas utilizando o filtro KO525 ($\lambda_{exc}=405 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$) monitorando no mínimo 10000 eventos.

3.7.7. Microscopia confocal

As microscopias confocal foram realizadas em um Microscópio Confocal – LSM 510 Meta- Zeiss, localizado no RELAM (Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia). As medidas foram realizadas utilizando objetivas de 40x e lasers de excitação de 488 e 633 nm, escolhidos de acordo com a amostra.

3.8. CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos teóricos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Eduardo da Hora Machado com emprego da teoria do funcional de densidade (DFT). Na otimização do estado fundamental foi utilizado para otimização de todas estruturas o metafuncional híbrido GH-mGGA Minnesota 2006 (M06) geral para metais de transição com energia de correlação de médio alcance (ZHAO, 2008) juntamente com o conjunto de bases atômicas Def2-TZVPP (WEIGEND, 2005) e incremento de funções pseudo-exponenciais para o átomo de irídio. As otimizações dependentes do tempo (TD-DFT) foram realizadas com emprego do funcional híbrido B3LYP e mesmo conjunto de bases usado na otimização do estado fundamental. A TD- DFT foi usada para obtenção de transições singletos e tripletos. Os cálculos consideraram um contínuo dielétrico gerado pelo modelo IEFPCM, com características inerentes ao solvente CH_3CN (MENNUCC, 1998).

3.9. TRATAMENTO DE DADOS

3.9.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ)

A absorvidade molar dos complexos em CH₃CN foi determinadas a partir da lei de Lambert-Beer como descrito na Equação 2

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

Em que,

A = absorvância,

ϵ = absorvidade molar (L mol⁻¹ cm⁻¹),

c = concentração da solução (mol L⁻¹),

b = caminho óptico (cm).

3.9.2. Determinação do rendimento quântico de emissão (Φ_{em})

Os rendimentos quânticos de emissão dos complexos em acetonitrila à temperatura ambiente foram determinados segundo a Equação 3.

$$\phi_{em} = \frac{S_{em}}{S_{em}^p} \frac{\epsilon^p C^p}{\epsilon C} \phi_{em}^p \quad (3)$$

Em que,

ϕ_{em} = rendimento quântico do composto de interesse;

ϕ_{em}^p = rendimento quântico de emissão do composto padrão;

$\phi_{em}^p = 0,09$ (referência);

C^p = concentração molar do composto padrão;

ϵ^p = absorvidade molar do composto padrão no comprimento de onda de excitação;

C = concentração molar da amostra;

ϵ = absorvidade molar da amostra no comprimento de onda de excitação;

S_{em} = área da banda de emissão da amostra;

S_{em}^p = área da banda de emissão do composto padrão.

Como padrão de emissão, foi utilizado o complexo Re(CO)₃MePhen(bpa)PF₆ ($\phi = 0,09$) (PATROCINIO, 2010).

Para a determinação dos Φ_{em} dos complexos Ir1-H, Ir2-H e Ir3-H foi adicionado um equivalente molar de solução de HClO₄ (volume < 0,5%) afim de garantir a protonação destes complexos em meio de CH₃CN.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Os complexos propostos foram sintetizados com sucesso. As rotas sintéticas empregadas mostraram rendimentos finais próximos de 40%, o que está de acordo com a literatura para complexos bis-heterolépticos de Ir(III) (LIU; BIAN; HUANG, 2010). Outro fato é que nenhum dos complexos necessitou de métodos adicionais de purificação como cromatografia líquida, por exemplo. Apenas por filtração lenta seguida de boa lavagem com água e éter de etila, foi possível obter todas as estruturas com adequada pureza, como será mostrado por meio dos dados de ¹H-RMN e CHN.

A composição elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) para cada complexo está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Percentuais e fórmula molecular proposta de acordo com a determinação dos percentuais de C, H e N.

Complexo	Percentuais Esperados (C, H, N)	Percentuais Encontrados (C, H, N)	Fórmula Molecular
Ir1-H	C: 48,57%; H: 3,00%; N: 8,33%	C: 49,12%; H: 3,08%; N: 8,24%	C ₃₄ H ₂₂ N ₅ IrPF ₆
Ir1	C: 55,88%; H: 3,86%; N: 9,58%	C: 55,94%; H: 3,76%; N: 9,25%	C ₃₄ H ₂₄ N ₅ Ir.2H ₂ O
Ir2-H	C: 52,61; H: 3,26; N: 7,30%	C: 52,27%; H: 3,22%; N: 6,99%	C ₄₂ H ₂₉ N ₅ IrPF ₆ .H ₂ O
Ir2	C: 62,05; H: 3,72; N: 8,61%	C: 62,23%; H: 3,63%; N: 8,37%	C ₄₂ H ₂₈ N ₅ Ir.H ₂ O
Ir3-H	C: 50,84%; H: 3,70%; N: 13,83%	C: 50,95%; H: 3,29%; N: 13,64%	C ₃₀ H ₂₂ N ₇ Ir.2H ₂ O

Ir3	C: 44,01%; H: 2,83%; N: 11,98%	C: 43,82%; H: 2,74%; N: 11,88%	$C_{30}H_{23}N_7IrPF_6$
------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-------------------------

Nota-se boa concordância entre os percentuais teóricos e os encontrados para cada estrutura com variações dentro do erro de $\pm 0,5\%$ esperado para esta técnica. Para os complexos Ir1-H e Ir3, os percentuais de CHN não sugeriram a presença de moléculas de água de hidratação. Para os compostos restantes, 1 ou 2 águas de hidratação foram sugeridas de acordo com os percentuais encontrados, o que é justificado uma vez que todos os complexos são lavados com água ao final da síntese para se retirar o excesso de NH_4PF_6 ou de Na_2CO_3 , utilizados na preparação dos complexos catiônicos e neutros, respectivamente. Os dados de CHN também evidenciam que não há presença de impurezas orgânicas, como resíduos de ligantes livres.

Todos os complexos bis-heteroléticos preparados foram também caracterizados por 1H -RMN. Nas Figura 9, 10 e 11 são mostrados os espectros de 1H -RMN obtidos para os diferentes pares Ir1/1-H, Ir2/2-H e Ir3-3-H, respectivamente.

Figura 9. Espectros de ^1H -RMN em $\text{DMSO } d_6$ dos complexos Ir1-H (vermelho) e Ir1 (laranja), 400 MHz.

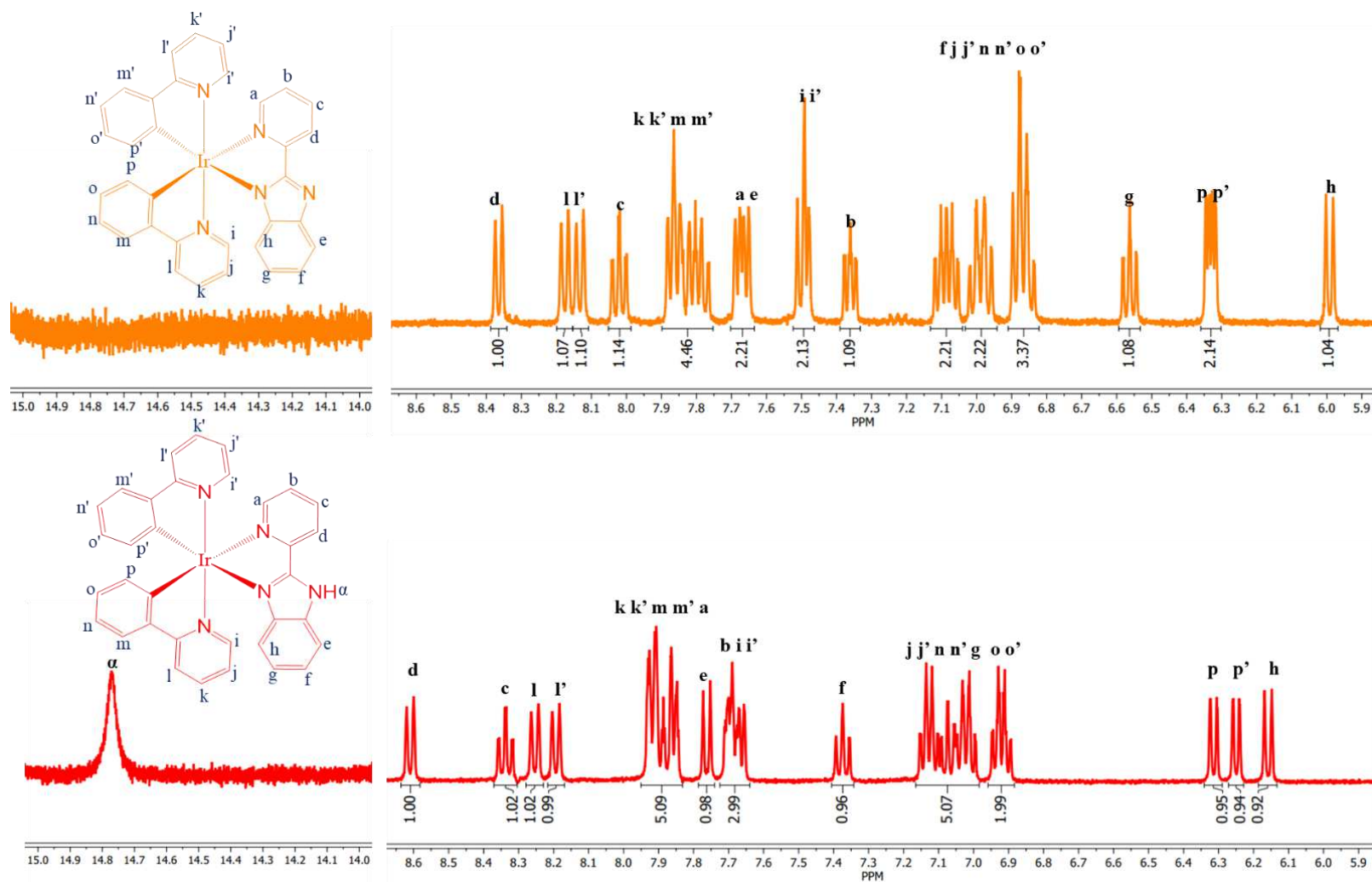


Figura 10. Espectros de ^1H -RMN em $\text{DMSO } d_6$ dos complexos Ir2-H (amarelo) e Ir2 (preto), 400 MHz.

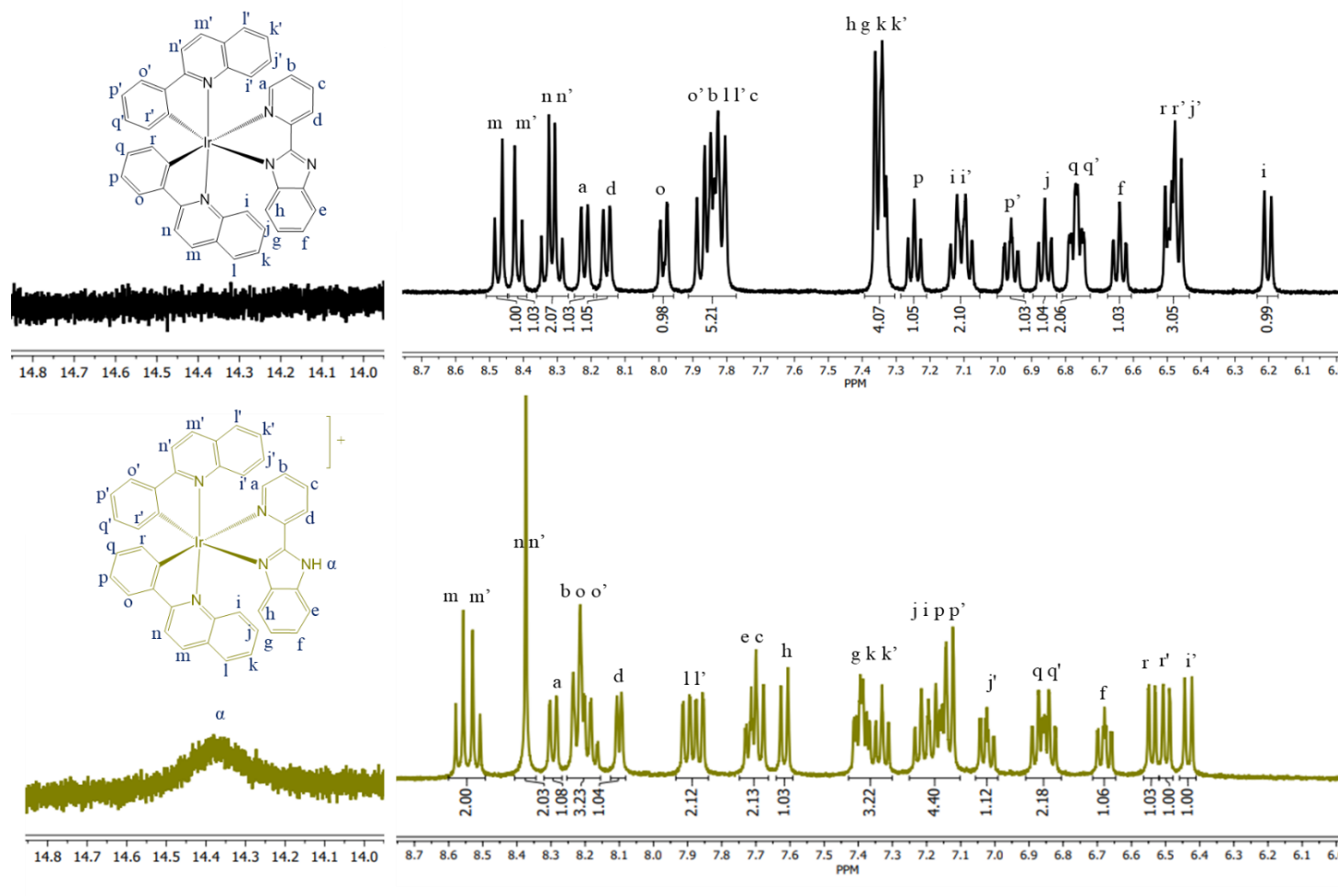
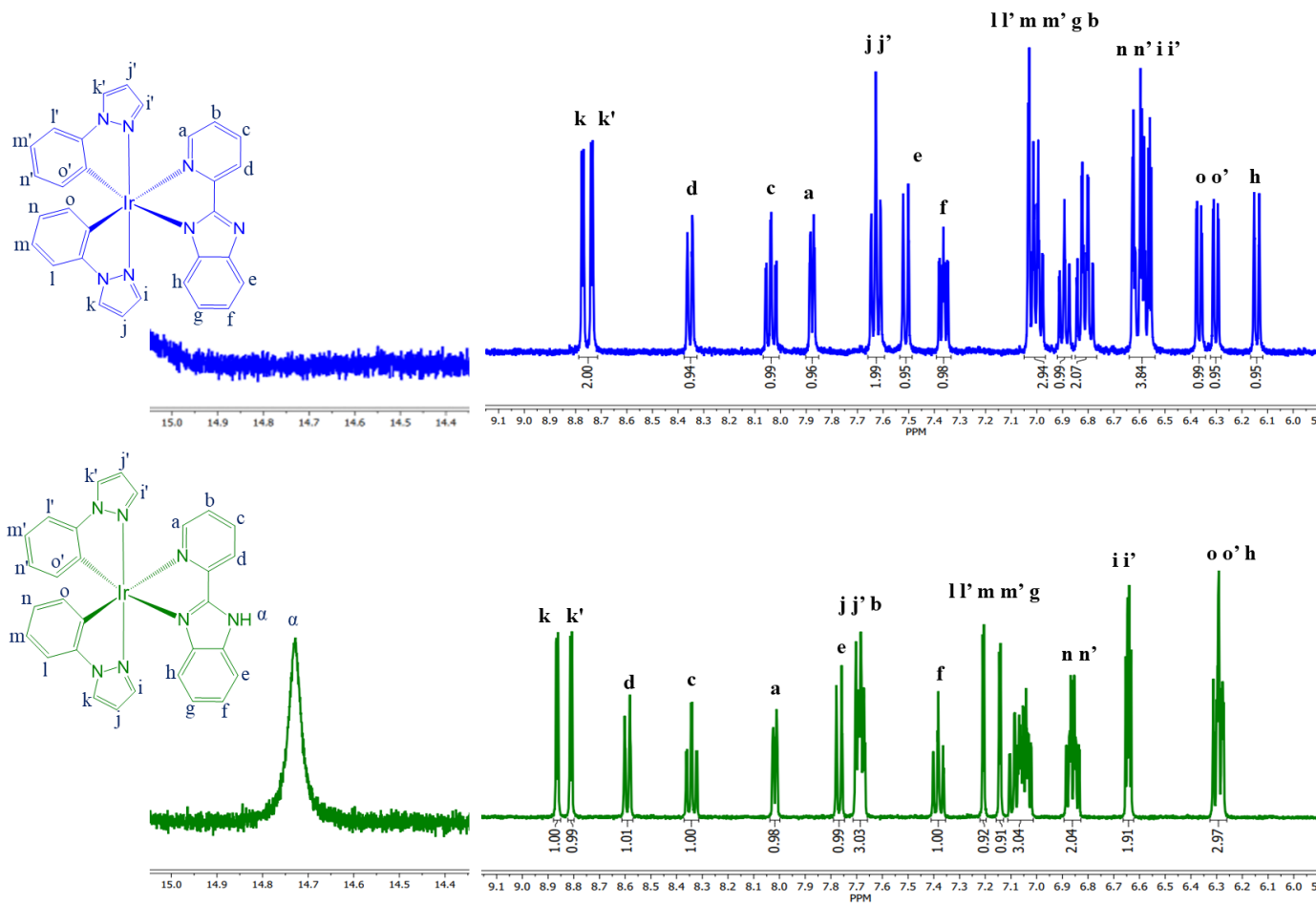


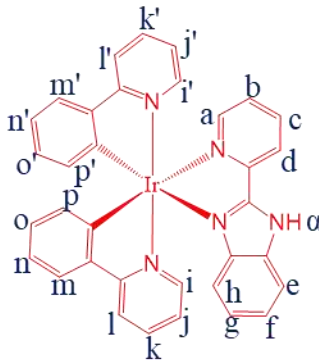
Figura 11. Espectros de ^1H -RMN em DMSO d_6 dos complexos Ir3-H (verde) e Ir3 (azul), 400 MHz.



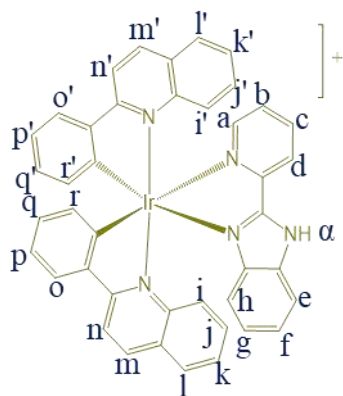
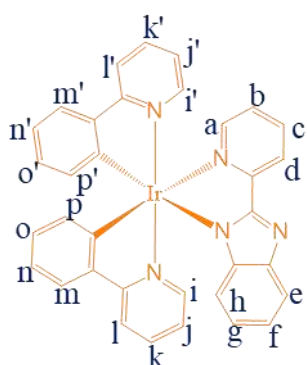
Como esperado, são observados sinais na região entre 6 e 9 ppm advindos de hidrogênios ligados aos diferentes anéis aromáticos dos ligantes. A integração dos picos em cada um dos espectros leva a um número de hidrogênios condizente com as respectivas estruturas propostas para cada espécie. Não são observados sinais coincidentes com o espectro dos ligantes livres, o que é mais um indicativo da pureza de cada espécie. Além disso, os espectros para os complexos Ir1-H e Ir2-H são similares àqueles reportados previamente em outras comunicações (MURPHY et al., 2010; SUN et al., 2014; WANG et al., 2017).

Com base nas constantes de acoplamento, ambiente químico dos prótons e integrais observadas, foi realizado uma proposta de atribuição aos prótons dos complexos avaliados. As propostas para as estruturas Ir1, Ir1-H, Ir2 e Ir2-H são corroboradas por espectros de correlação ^1H - ^1H (COSY) (Apêndice A). A tabela 2 apresenta os deslocamentos e constantes de acoplamento para cada próton com suas respectivas propostas de elucidação.

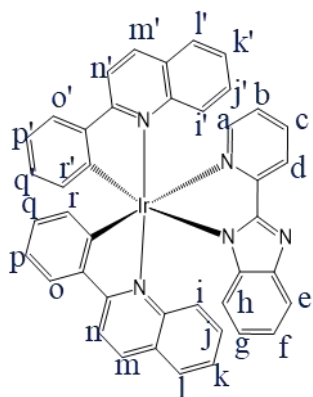
Tabela 2. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos complexos apresentados.

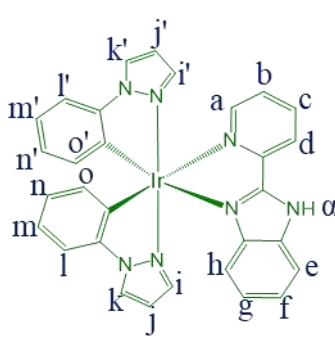
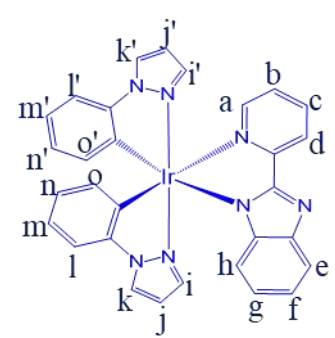
Complexo	Próton	δ (ppm)	J (Hz)
	H α	14,8 (s, 1H)	-
	H d	8,61 (d, 1H)	8,0
	H c	8,34 (t, 1H)	8,0
	H l	8,25 (d, 1H)	8,3
	H l'	8,19 (d, 1H)	8,2
	H k ; H k' ; H m ; H m' ; H a	7,97 - 7,83 (m, 5H)	-
	H e	7,76 (d, 1H)	8,2
	H b ; H i ; H i'	7,73 – 7,64 (m, 3H)	-
	H f	7,37 (t, 1H)	8,2; 7,2
	H j ; H j' ; H n ; H n' ; H g	7,17 – 6,98 (m, 5H)	-

	H _o ; H _{o'}	6,92 (dd, 2H)	7,3; 5,7
	H _p	6,31 (d, 1H)	7,7
	H _{p'}	6,25 (d, 1H)	7,7
	H _h	6,16 (d, 1H)	8,3
	H _d	8,37 (d, 1H)	8,0
	H _i	8,18 (d, 1H)	8,2
	H _{i'}	8,13 (d, 1H)	8,2
	H _c	8,02 (t, 1H)	8,0; 1,6
	H _k ; H _{k'} ; H _m ; H _{m'}	7,90 - 7,74 (m, 4H)	-
	H _a ; H _e	7,67 (dd, 4H)	-
	H _i ; H _{i'}	7,49 (m, 2H)	-
	H _b	7,36 (t, 1H)	8,0; 5,4
	H _j ; H _{j'}	7,12-7,04 (m, 2H)	-
	H _n ; H _{n'}	7,03 – 6,94 (m, 2H)	-
	H _g ; H _o ; H _{o'}	6,90 – 6,82 (m, 3H)	-
	H _f	6,56 (t, 1H)	8,1; 6,9
	H _p	6,33 (dd, 2H)	-
	H _h	5,99 (d, 1H)	8,2
	H _α	14,3 (s, 1H)	
	H _m ; H _{m'}	8,53 (dd, 2H)	12,0; 8,0
	H _n ; H _{n'}	8,37 (s, 2H)	-
	H _a	8,29 (d, 1H)	8,1
	H _b ; H _o ; H _{o'}	8,25 – 8,15 (m, 3H)	-
	H _d	8,10 (d, 1H)	8,0
	H _i ; H _{i'}	7,88 (dd, 2H)	8,0
	H _e , H _c	7,75 – 7,66 (m, 2H)	-
	H _h	7,59 (d, 1H)	8,2



	H _g ; H _k ; H _{k'}	7,43 – 7,30 (m, 3H)	-
	H _j ; H _{i'} ; H _p ; H _{p'}	7,25 – 7,10 (m, 4H)	-
	H _{j'}	7,02 (t, 1H)	8,8; 6,9
	H _q ; H _{q'}	6,86 (m, 2H)	-
	H _f	6,68 (t, 1H)	8,0
	H _r	6,54 (d, 1H)	7,7
	H _{r'}	6,50 (d, 1H)	7,7
	H _i	6,43 (d, 1H)	8,3
	H _m ; H _{m'}	8,45 (dd, 2H)	16,0; 8,0
	H _n ; H _{n'}	8,31 (dd, 2H)	8,0
	H _a	8,22 (d, 1H)	7,9
	H _d	8,15 (d, 1H)	7,9
	H _o	7,99 (d, 1H)	8,4
	H _{o'} ; H _b ; H _i ; H _{i'} ; H _c	7,91 – 7,77 (m, 5H)	-
	H _h ; H _g ; H _k ; H _{k'}	7,39 – 7,30 (m, 4H)	-
	H _p	7,25 (t, 1H)	7,9; 6,9
	H _i ; H _{i'}	7,17 – 7,05 (m, 2H)	-
	H _{p'}	6,96 (t, 1H)	-
	H _j	6,86 (t, 1H)	7,6
	H _q ; H _{q'}	6,77 (t, 2H)	7,4; 2,7
	H _f	6,64 (t, 1H)	7,6
	H _r ; H _{r'} ; H _{j'}	6,53 – 6,43 (m, 3H)	-
	H _i	6,20 (d, 1H)	8,2
	H _α	14,7 (s, 1H)	-
	H _k	8,85 (d, 1H)	2,9
	H _{k'}	8,80 (d, 1H)	2,9
	H _d	8,58 (d, 1H)	8,0



	H _c	8,33 (t, 1H)	7,8; 1,5
	H _a	8,01 (d, 1H)	5,3; 1,5
	H _e	7,76 (d, 1H)	8,3
	H _j ; H _{j'} ; H _b	7,71 – 7,64 (m, 3H)	-
	H _f	7,37 (t, 1H)	-
	H _i ; H _{i'} ; H _m ; H _{m'} ; H _g	7,21 – 6,99 (m, 5H)	-
	H _n ; H _{n'}	6,86 (dt, 2H)	7,4; 4,5
	H _i ; H _{i'}	6,64 (m, 2H)	-
	H _o ; H _{o'} ; H _h	6,32 – 6,26 (m, 3H)	-
		H _k	8,77 (d, 1H)
H _{k'}		8,74 (d, 1H)	2,9
H _d		8,35 (d, 1H)	8,0
H _c		8,04 (t, 1H)	7,8; 1,6
H _a		7,88 (d, 1H)	5,5; 1,3
H _j ; H _{j'}		7,63 (t, 2H)	8,0; 6,7
H _e		7,51 (d, 1H)	8,1; 1,1
H _f		7,36 (t, 1H)	7,3; 5,5
H _i ; H _{i'} ; H _m ; H _{m'} ; H _g ;		7,00 – 6,96 (m, 3H)	-
H _b		6,89 (t, 1H)	8,2; 7,0
H _n ; H _{n'} ; H _i ; H _{i'}		6,64 – 6,54 (m, 4H)	-
H _o		6,37 (d, 1H)	7,4
H _{o'}		6,30 (d, 1H)	7,5
H _h		6,14 (d, 1H)	8,2

Entre os complexos catiônicos e neutros de cada par conjugado observa-se diferenças, sobretudo pela presença de sinais mais desblindados para os complexos catiônicos do que para os complexos neutros. Para os complexos catiônicos, os deslocamentos são maiores em virtude da presença do contra-íon

PF_6^- que promove interações do tipo ligações de hidrogênio como mostrado para outros complexos bis-heterolépticos de Ir(III) com este ânion (SUN et al., 2014; VALORE et al., 2010). Para os complexos catiônicos é possível notar também a presença de um sinal referente ao próton imidazol, entre 14 e 15 ppm, evidenciando que apenas estes possuem o nitrogênio não coordenado do ligante auxiliar protonado. O pico referente a esta fração aparece com a base alargada, como tipicamente observado para hidrogênios com caráter ácido (LORENTE et al., 2001).

Algumas diferenças nas atribuições dos prótons chamam atenção, como é o caso dos dubletos mais desblindados que são descritos como sendo referentes a prótons diferentes em cada par conjugado. Nos complexos Ir1 e Ir1-H o primeiro dubleto é atribuído ao H_d assim como proposto anteriormente para o complexo Ir1-H (MURPHY et al., 2010). Esta atribuição condiz com a forte desblindagem que este hidrogênio sofre pela fração benzimidazol ligada ao anel piridina. Além disso, outros complexos bis-heterolépticos relatados na literatura chamam atenção para o sinal mais desblindado de prótons ligados ao carbono *orto* de anéis aromáticos substituídos (VALORE et al., 2010; ZANONI et al., 2014).

Nos complexos Ir2 e Ir2-H os dubletos mais desblindados são atribuídos aos hidrogênios H_m e $\text{H}_{m'}$. Estes por sua vez, sofrem maior efeito retirador de densidade eletrônica promovida pelos dois anéis ligados aos carbonos desidrogenados vizinhos. Como os ligantes $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ não são equivalentes, os sinais referentes a cada próton tendem a possuir deslocamentos distintos, apesar de serem bem próximos, como é notado no duplo-dupleto mais desblindado para o Ir2 e Ir2-H.

Outro sinal que chama muita atenção é o aparente singleto identificado no espectro do complexo Ir2-H com $\delta = 8,37$ ppm equivalente a dois prótons e que foi atribuído aos hidrogênios n e n' . O espectro de RMN ^1H - ^1H (COSY) mostra que estes dois prótons possuem forte acoplamento com o duplo dubleto atribuído a m e m' em $\delta = 8,55$ ppm, de forma similar ao observado para o complexo Ir2. No caso do Ir2-H a não observação de um duplo dubleto para os prótons n e n' como esperado sugere a existência de um sistema fortemente acoplado que acaba por apresentar efeitos de segunda ordem no espectro do complexo Ir2-H. Um sistema fortemente acoplado é caracterizado por $\Delta\nu/J < 6$, onde $\Delta\nu$ é a

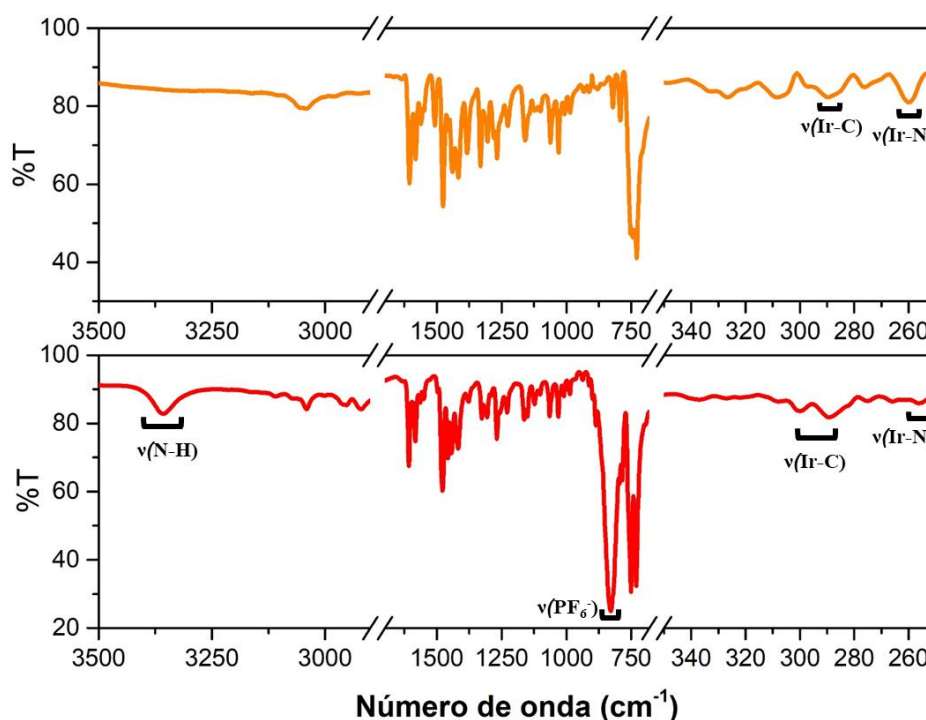
diferença entre os deslocamentos químicos (em Hertz) de prótons que se acoplam e J é a constante de acoplamento entre seus multipletos. Sistemas com este forte acoplamento apresentam espectros de segunda ordem em que a regra $n+1$ deixa de valer. Este efeito é sempre minimizado com aumento do campo aplicado pelo equipamento, uma vez que o valor de $\Delta\nu$ aumenta de acordo com o aumento do campo (PAVIA et al., [s.d.]).

Estimou-se o valor de $\Delta\nu/J$ com base no espectro de ^1H RMN do complexo Ir2, onde $\Delta\nu$ foi dado pela distância entre os dois dubletos (16 Hz) e J foi a constante de acoplamento dos mesmos (8,0 Hz). Observa-se uma razão significativamente menor que 6, corroborando com a discussão sobre um sistema fortemente acoplado. Portanto a ocorrência deste singlete se deve à semelhança entre os prótons H_n e $H_{n'}$ que possuem ambientes químicos quase equivalentes gerando um sistema fortemente acoplado.

Os complexos Ir3 e Ir3-H tiveram suas atribuições realizadas com base no espectro bidimensional e atribuições dos sistemas anteriores. Destaca-se neste sistema que a presença do anel pirazol coordenado ao Ir(III) promove maior desblindagem nos prótons H_k e $H_{k'}$, o que chama atenção para a capacidade retiradora de densidade eletrônica que o nitrogênio ligado diretamente ao anel fenil detém sobre o carbono ligado a ele no anel pirazol.

A fim de corroborar com a caracterização estrutural, a espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) foi utilizada para investigar a presença de estiramentos de ligação característicos para esta classe de complexos estudada. Na Figura 12 são apresentados os espectros de FTIR referente aos complexos Ir1 e Ir1-H.

Figura 12. Espectros de FTIR (ATR) dos complexos Ir1 (laranja) e Ir1-H (vermelho).

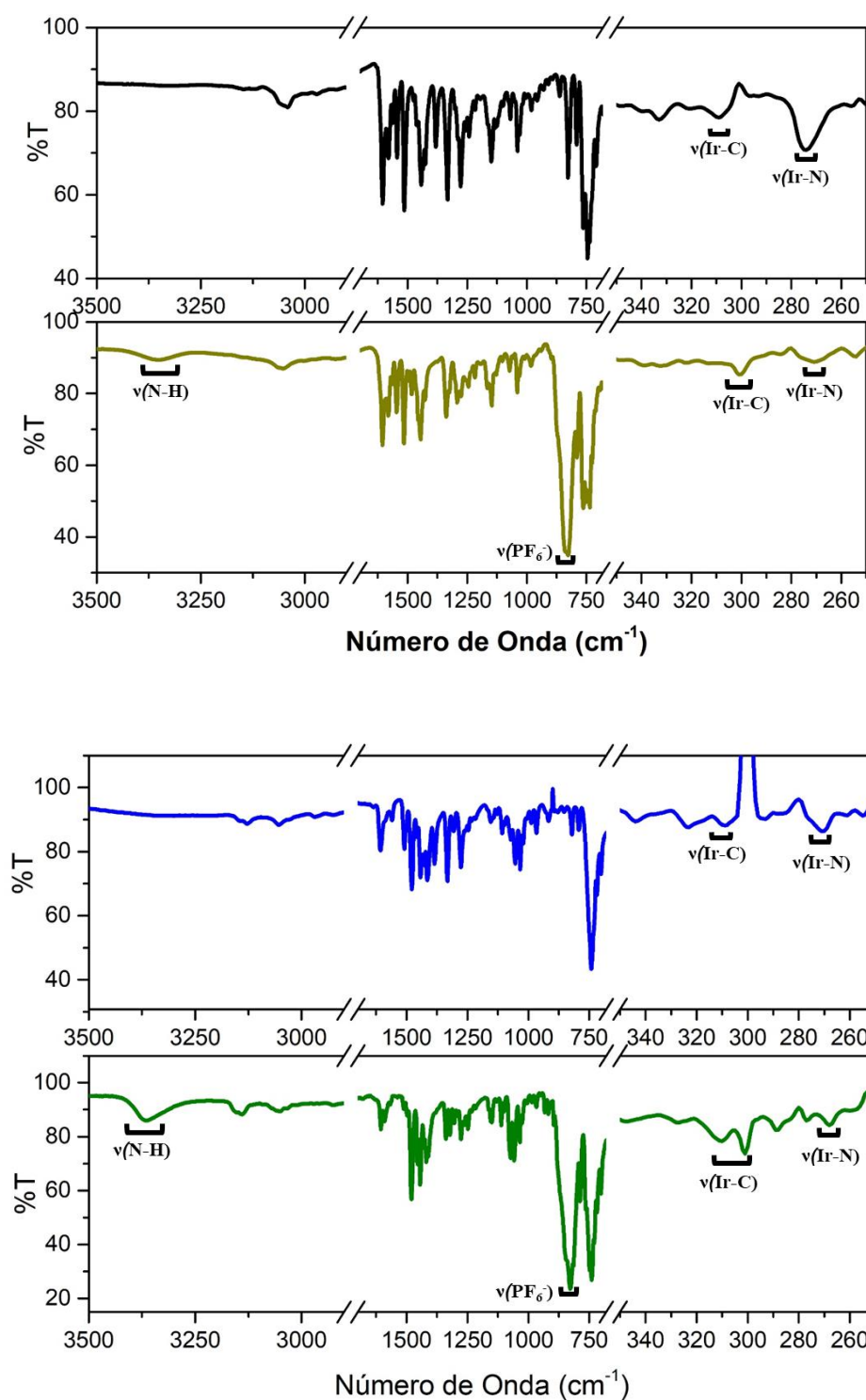


Observa-se no espectro do complexo Ir1-H, a presença de uma banda larga em 3356 cm^{-1} referente ao alongamento da ligação N-H de aminas secundárias (PAVIA et al., [s.d.]), que não está presente no complexo Ir1, corroborando com os dados de RMN e análise elemental. O complexo catiônico também apresenta uma banda intensa em 828 cm^{-1} referente ao alongamento assimétrico do ânion PF_6^- utilizado como contra-íon (BUFFETEAU et al., [s.d.]; SUN et al., 2014).

Para ambos os complexos são observadas bandas referentes ao estiramento da ligação entre o Ir-N entre 250 e 280 cm^{-1} , ao passo que entre 320 e 340 cm^{-1} são notados estiramentos característicos da ligação Ir-C (TSAI et al., 2011). Neste caso a banda em maior número de onda é dada como sendo referente ao sítio Ir-C em decorrência da menor massa dessa fração, quando comparada com o sítio Ir-N (BUFFETEAU et al., [s.d.]; SUN et al., 2014). Entre 750 e 2000 cm^{-1} estão presentes bandas referentes a estiramentos de ligações entre C-N, C-H e C-C (PAVIA et al., [s.d.]), características de anéis aromáticos e anéis imidazólicos, no qual não são notadas significativas entre os estiramentos presente em cada espécie.

Na Figura 13 são apresentados os demais espectros de FTIR referentes aos complexos Ir2, Ir2-H, Ir3 e Ir3-H.

Figura 13. Espectros de FTIR (ATR) dos complexos Ir2 (preto), Ir2-H (amarelo), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde).

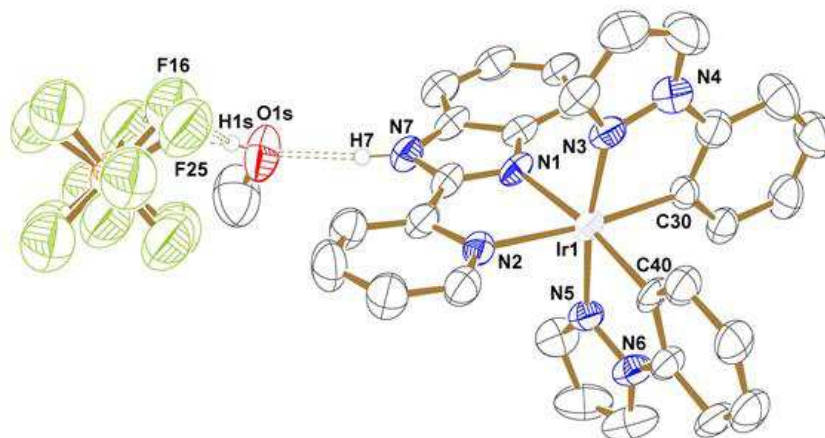


Nota-se que os espectros referentes aos complexos catiônicos sempre apresentam a banda referente ao alongamento N-H, enquanto as respectivas bases conjugadas não apresentam esta banda. A banda correspondente ao alongamento N-H é localizada em 3358, 3352 e 3365 cm^{-1} para os complexos Ir1-H, Ir2-H e Ir3-H, respectivamente. Nota-se que, enquanto a energia da banda não é muito afetada quando o ligante fenilpiridina (Ir1-H) é substituído pela feniquinolina (Ir2-H), um maior deslocamento é observado pela introdução do fenilpirazol (Ir3-H). Logo, espera-se que o comportamento ácido/base do sítio N-H seja alterado pelas mudanças na esfera de coordenação.

Entre 3040 e 3150 cm^{-1} são encontrados estiramentos C-H sp^2 característicos de anéis aromáticos (PAVIA et al., [s.d.]). Entretanto observa-se que nos espectros referentes aos complexos Ir1, Ir1-H, Ir2 e Ir2-H surge um só estiramento referente a esta ligação, ao passo que nos complexos Ir3 e Ir3-H são notados dois estiramentos referentes a esta ligação. Isso pode ser justificado com base na presença do anel pirazol que em virtude dos dois átomos de nitrogênio no anel, possui grande deslocalização eletrônica e estabiliza os hidrogênios aromáticos do pirazol por ressonância, logo o estiramento desta ligação surge em maior energia ($\sim 3145 \text{ cm}^{-1}$) do que os estiramentos referentes aos demais anéis aromáticos ($\sim 3045 \text{ cm}^{-1}$). Assim como para Ir1 e Ir1-H, são observadas para os demais complexos a presença das bandas referente a estiramentos das ligações Ir-N e Ir-C de baixa intensidade relativa. Além disso, observa-se a presença do estiramento referente ao contra-íon PF_6^- nos complexos catiônicos Ir2-H e Ir3-H.

A fim de se obter a confirmação estrutural definitiva dos complexos sintetizados, buscou-se obter monocristais de cada uma das estruturas para serem submetidas à difração de raios X. Esta ferramenta permite não só a determinação da estrutura molecular estudada como também a posição relativa entre os átomos que a constitui bem como ângulos e distâncias entre os átomos, geometria espacial etc. Até o momento, apenas os dados do complexo Ir3-H foram coletados. Na figura 14, é apresentada a representação ORTEP referente ao monocristal obtido. Os dados cristalográficos completos estão apresentados no apêndice A, tabelas A1 – A5.

Figura 14. ORTEP referente ao complexo Ir3-H.



Nota-se que o complexo se cristalizou em um sistema monoclinico, grupo espacial $P2(1)/n$, no qual os ligantes se apresentam coordenados em geometria octaédrica distorcida ao centro Ir(III), apresentando geometria *cis*-C,C e *trans*-N,N entre as duas unidades de ligante 1-fenilpirazol, como já observado para outros complexos similares (NEVE et al., 2004; ORSELLI et al., 2008; YANG et al., 2012a). Esse isômero é, a princípio, termodinamicamente mais estável devido ao efeito *trans* causado pelo forte caráter doador sigma dos átomos de C carregados negativamente do ligante 1-fenilpirazol (ZYSMAN-COLMAN, [s.d.], p. 13). As distâncias de ligações mais relevantes estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Principais distâncias e ângulos de ligação obtidos por cristalografia de raios X para o complexo Ir3-H.

Átomos	Distâncias (Å)
Ir(1)-N(5)	2.010(5)
Ir(1)-N(3)	2.016(6)
Ir(1)-C(40)	2.032(5)
Ir(1)-C(30)	2.036(6)
Ir(1)-N(1)	2.127(5)
Ir(1)-N(2)	2.167(5)
Átomos	Ângulos (graus)
N(5)- Ir(1)-N(3)	171.3(2)
N(5)- Ir(1)-C(40)	80.2(3)
N(3)- Ir(1)-C(40)	94.0(3)
N(5)- Ir(1)-C(30)	92.6(3)
N(3)- Ir(1)-C(30)	80.5(3)
C(40)- Ir(1)-C(30)	85.9(2)
N(5)- Ir(1)-N(1)	93.9(2)
N(3)- Ir(1)-N(1)	92.4(2)
C(40)- Ir(1)-N(1)	172.2(3)
C(30)- Ir(1)-N(1)	99.5(2)
N(5)- Ir(1)-N(2)	92.4(2)
N(3)- Ir(1)-N(2)	94.8(2)
C(40)- Ir(1)-N(2)	98.8(2)
C(30)- Ir(1)-N(2)	173.6(2)
N(1)- Ir(1)-N(2)	76.3(2)

Nota-se que o comprimento de ligação Ir-N para o ligante auxiliar é maior que o comprimento de ligação observado para a ligação Ir-C do 1-fenilpirazol. Este efeito se deve à forte interação entre o centro metálico e o carbânion e é comumente observado para complexos semelhantes de Ir(III) (LADOUCEUR; FORTIN; ZYSMAN-COLMAN, 2010; NEVE et al., 2004; ORSELLI et al., 2008).

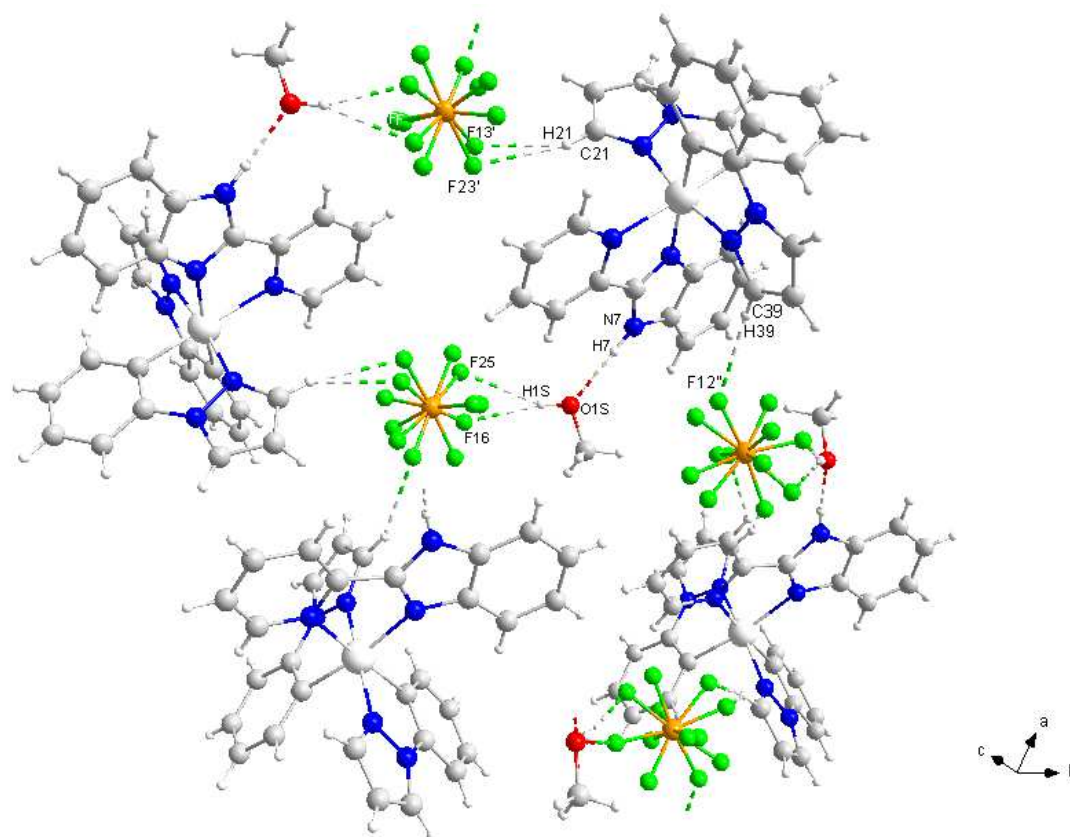
No complexo Ir3-H, as ligações Ir-C possuem distâncias muito parecidas com aquelas determinadas para as ligações Ir-N do grupo pirazol. A princípio,

espera-se uma distância de ligação menor para a ligação carbânion-Ir(III) como são notados para outros complexos com ligantes fenilpiridínicos (ORSELLI et al., 2007; YANG et al., 2012a), entretanto o anel pirazol por sua vez possui grande deslocalização eletrônica, o que aumenta sua basicidade em relação aos ligantes piridínicos diminuindo assim a distância para o centro metálico. Em relação aos ângulos de ligação, destaca-se o menor ângulo para a ligação do Ir(III) com os dois átomos de nitrogênio do ligante auxiliar. Diferentemente das coordenações com os ligantes C^N, a coordenação do 2-(2-piridi)benzimidazol ocorre no mesmo plano (equatorial), tendo ângulo menor que nos demais sítios de coordenação.

Além disso, com base nos dados cristalográficos apresentados para o complexo Ir1-H descrito anteriormente (SUN et al., 2014), nota-se algumas similaridades entre os dois monocristais. As distâncias de ligação entre o metal e o ligante auxiliar estão entre 2,1 e 2,18 Å nos dois complexos, sendo que a ligação com maior comprimento em ambas as espécies é a ligação com o anel piridínico, evidenciando a maior interação do centro metálico com o benzimidazol. Por outro lado, os sítios de coordenação com os ligantes C^N apresentaram distâncias de ligação bem próximas entre 2,02 e 2,03 Å, tanto para coordenação com o carbânion, quanto para coordenação com o nitrogênio em ambos os monocristais.

Para o complexo Ir3-H, foram avaliadas também as interações intermoleculares como apresentado na Figura 15, com base nos dados obtidos por DRX de monocristal.

Figura 15. Representação ORTEP das interações intermoleculares observadas na estrutura cristalina do complexo Ir3.



Observa-se que o complexo apresenta muitas interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio para diferentes regiões da estrutura. O contraíon PF_6^- realiza ligações de hidrogênio não só com o metanol e o próton imidazólico, mas também com hidrogênios pertencentes aos ligantes $\text{C}^{\wedge}\text{N}$, como pode ser visto na interação entre o F13' e F23' com o H21. Estas interações do PF_6^- em diferentes regiões da estrutura corrobora com o que foi observado nos dados de ^1H RMN, em que os hidrogênios dos complexos catiônicos são mais desblindados que o observado para os complexos neutros.

Por fim, os dados cristalográficos comprovam a protonação do anel imidazol pertencente ao ligante auxiliar 2-(2-piridil)benzimidazol, como foi inicialmente proposto para o complexo Ir3-H. O mesmo possui caráter ácido e, nas condições de cristalização interagem com o grupo -OH do solvente (metanol) por meio de ligações de hidrogênio. Conclui-se assim que a metodologia de síntese utilizada permitiu a obtenção dos três diferentes pares conjugados. A seguir, as propriedades fotofísicas de cada um deles será discutida em detalhe juntamente com o potencial uso como biomarcadores.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA E ELETROQUÍMICA

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-VIS) foram mensurados em CH_3CN e estão apresentados nas Figuras 16. A Tabela 4 apresenta os valores os máximos de absorção de cada banda com seus respectivos coeficientes de absortividade molar (ϵ).

Figura 16. Espectros de absorção na região UV-VIS dos complexos Ir1 (laranja), Ir1-H (vermelho), Ir2 (amarelo), Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde) em CH_3CN . Inset: Espectros de absorção acima de 400 nm.

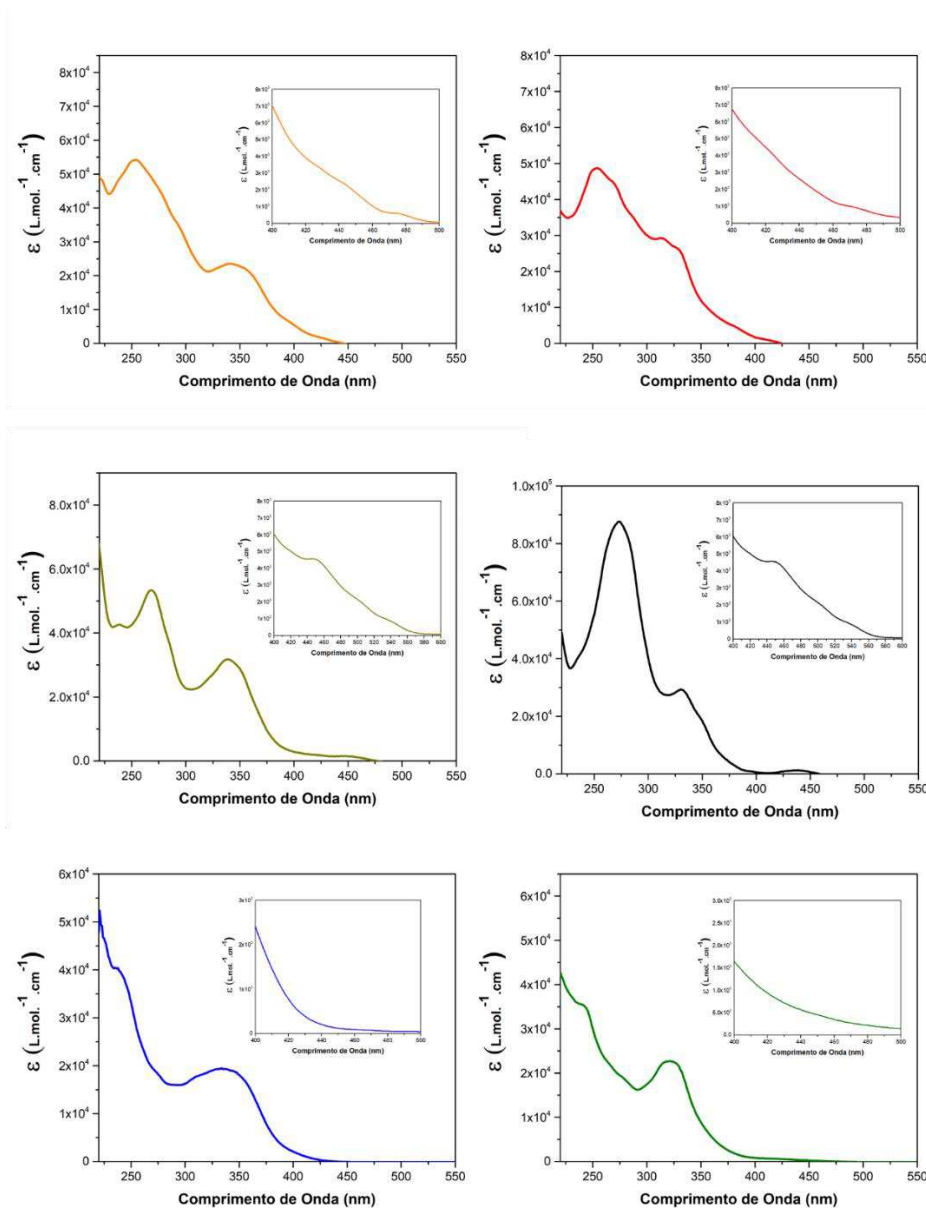


Tabela 4. Absorções máximas em função de seus respectivos coeficientes de absortividade molar (ϵ) em CH₃CN.

Complexo	λ_{\max} (nm) ($\epsilon / 10^4$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹))
Ir1-H	250 (4,81); 315 (2,92); 327 (2,67)
Ir1	250 (5,39); 340 (2,34)
Ir2-H	273 (8,76); 330 (2,93); 436 (0,11)
Ir2	273 (5,04); 336 (3,14); 452 (0,14)
Ir3-H	240 (3,54); 321 (2,27)
Ir3	240 (3,91); 337 (1,93)

Em geral, nota-se para todos os complexos a presença de duas bandas de absorção, advindas de múltiplas transições eletrônicas. A banda de maior energia coincide com a região de absorção dos ligantes livres e, portanto, são atribuídas a transições IL, isto é, advindas de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e caracterizadas por altos valores de ϵ ($>10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) já que são permitidas pelas regras de seleção de Spin e de Laporte.

Já as bandas de menor energia não estão presentes nos ligantes livres e têm valores menores de absortividade molar. Tais características indicam que as bandas de menor energia devem ser constituídas pela sobreposição de transições eletrônicas advindas da formação do composto de coordenação. Na literatura para esta classe de complexos bis-heteroléticos de Ir(III), tais bandas são atribuídas a transições MLCT ou LLCT (TSUBOI; HUANG, 2014).

O par conjugado Ir1/Ir1-H apresenta seu espectro de absorção relatado na literatura em meio de CH₂Cl₂ (MURPHY et al., 2010) o que serve como comparativo para o perfil obtido. Assim como mostrado na comunicação de Murphy e colaboradores, 2010, neste trabalho também foi notado que a remoção do próton não altera a energia da banda IL e apenas aumenta ligeiramente o ϵ desta banda. Entre as estruturas avaliadas, o par Ir2/Ir2-H possui a maior deslocalização eletrônica advinda da utilização do ligante 2-fenilquinolina, o que por sua vez proporciona maiores valores de ϵ na banda IL aliado a deslocamentos batocrômicos em relação aos demais complexos.

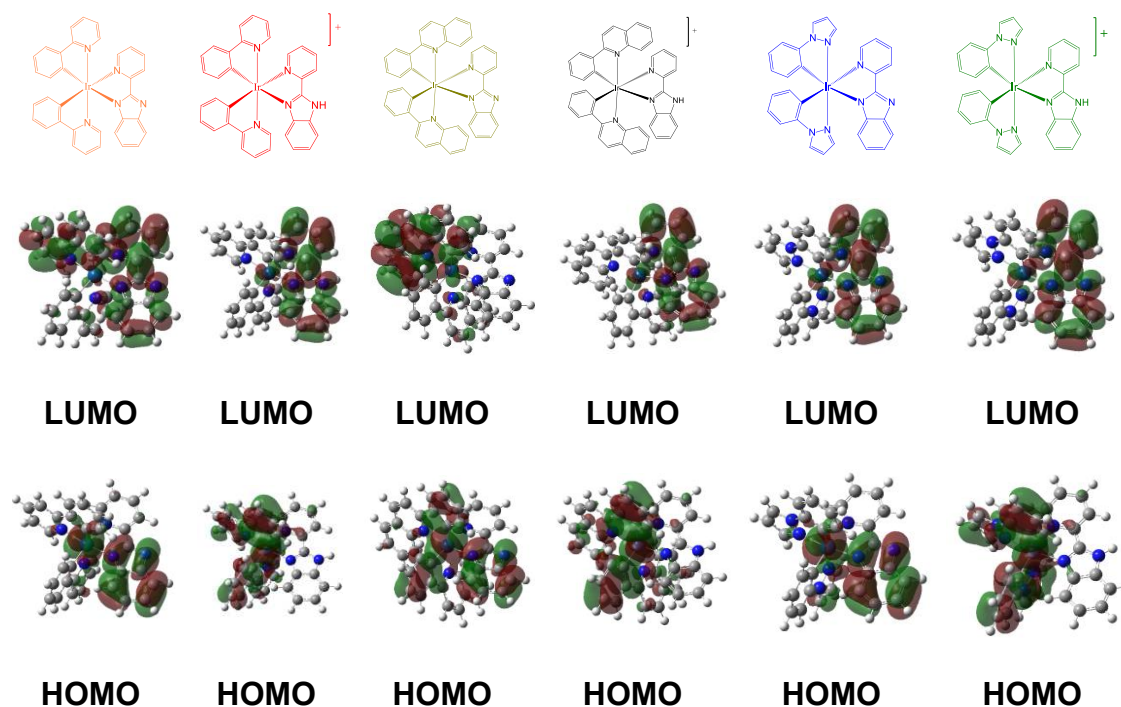
Em contrapartida, as estruturas referentes ao par conjugado Ir3/Ir3-H possuem menor deslocalização eletrônica em virtude da utilização de um ligante

C^N menor (1-fenilpirazol). Neste sistema, nota-se que as bandas referentes às transições IL possuem os menores valores de ϵ aliados à deslocamentos hipsocrômicos nesta banda de absorção em relação ao par conjugado Ir1/Ir1-H.

Em todos os três sistemas foi notado o mesmo efeito da protonação em relação à banda IL, isto é, um aumento do ϵ , sem deslocamentos significativos da energia das bandas. Para as bandas MLCT/LLCT, nota-se que em cada par conjugado ocorre um deslocamento para maior energia nos espectros referente aos ácidos conjugados, assim como foi visto no trabalho de Murphy e colaboradores para Ir1/Ir1-H (MURPHY et al., 2010). Observa-se também que os coeficientes de absorvidade molar não sofrem alterações significativas com a mudança dos ligantes de coordenação C^N, o que, sugere uma maior participação dos orbitais do ligante auxiliar nas transferências de carga MLCT/LLCT.

Foram realizados cálculos de TD-DFT em meio de acetonitrila para todos os complexos estudados. As primeiras 30 transições calculadas na região UV-Vis estão apresentadas junto aos espectros de absorção experimentais no Apêndice B. Em geral, nota-se que a metodologia empregada foi capaz de reproduzir os dados experimentais, em particular as transições de menor energia que são aquelas de maior importância para o estudo em questão. A figura 17 mostra as superfícies de contorno referente aos orbitais HOMO e LUMO obtidos pela otimização dos complexos em CH₃CN.

Figura 17. Superfícies de contorno dos orbitais HOMO e LUMO para cada um dos complexos.

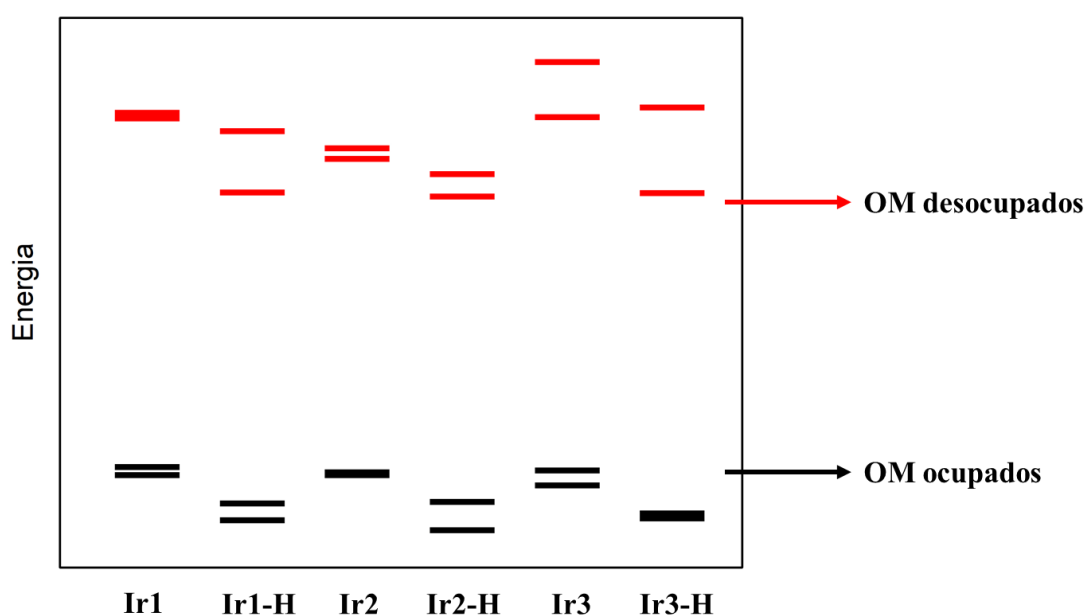


Para os complexos catiônicos, nota-se que os orbitais HOMO estão localizados sobre os orbitais do Ir(III) e orbitais π dos ligantes $C^{\wedge}N$ como já discutido na literatura para complexos similares (REDDY; BEJOYMOHANDAS, 2016). Entretanto, no caso dos complexos neutros os orbitais HOMO são distribuídos sobre os orbitais do metal e também sobre a fração benzimidazol do ligante auxiliar. Isso ocorre em virtude da remoção do próton imidazol do ligante auxiliar que por sua vez promove a deslocalização de um par de elétrons adicional sobre os anéis aromáticos do ligante. Diferentemente dos complexos catiônicos onde o orbital HOMO advém da interação com os orbitais dos ligantes $C^{\wedge}N$, nos complexos neutros estão presentes elétrons não ligantes deslocalizados sobre a fração benzimidazol, que por sua vez passam a contribuir para os orbitais HOMO destes complexos.

Em decorrência do caráter π acceptor do sítio de coordenação $N^{\wedge}N$, os orbitais LUMO dos complexos apresentados estão em geral concentrados sobre este ligante, com exceção do complexo Ir2 que possui seus orbitais LUMO distribuídos sob um dos ligantes $C^{\wedge}N$ por possuir maior deslocalização eletrônica promovida pelos anéis da quinolina.

Além da análise da natureza dos orbitais HOMO e LUMO, é possível construir a partir dos dados de TD-DFT, um diagrama de energia de seus orbitais moleculares (OM) (Figura 18) para uma avaliação do efeito da protonação do grupo imidazol e substituição dos ligantes C^N nas energias destes orbitais.

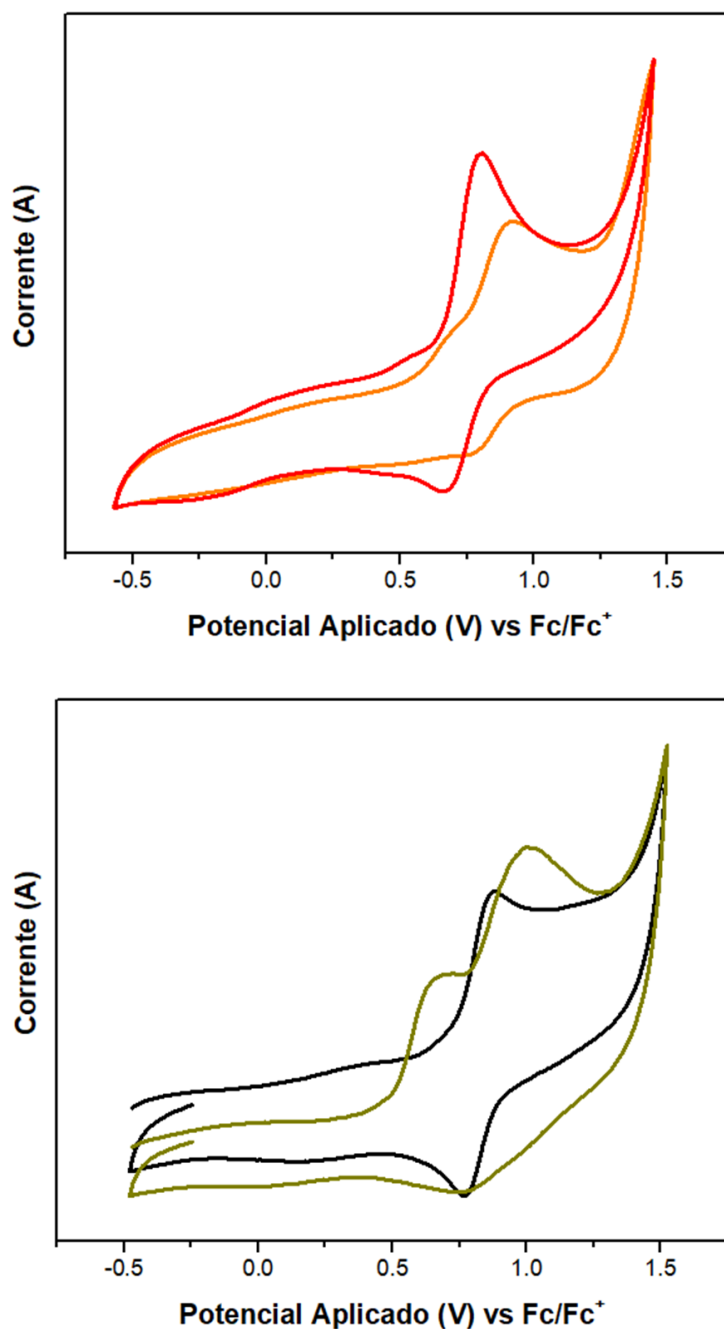
Figura 18. Diagrama de energia para os orbitais singletos ocupados e desocupados simulados por DFT para os complexos estudados.

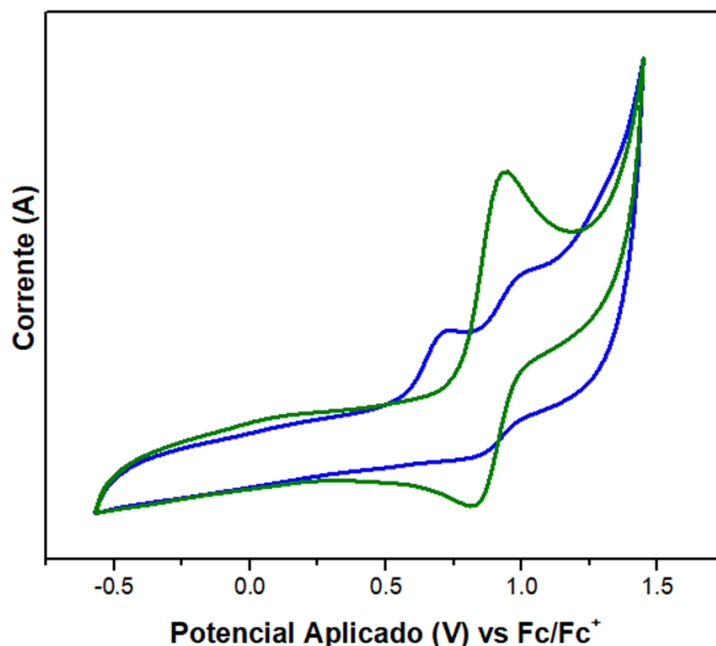


Nota-se que a presença do próton no grupo imidazol do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol tende a estabilizar a energia dos orbitais HOMO em cada ácido conjugado. Estes dados corroboram com a discussão sobre a localização dos orbitais HOMO nos complexos cujo o grupo imidazol está desprotonado, em que se propõem a contribuição de orbitais não ligantes da fração benzimidazol que por sua vez são mais energéticos que os orbitais ligantes dos complexos C^N. Nos orbitais LUMO também é visualizado uma estabilização energética com a inserção do próton no grupo imidazol, o que corrobora com a melhora do caráter acceptor do ligante auxiliar fazendo com que os orbitais LUMO de todos os complexos catiônicos estejam distribuídos sobre este ligante e promovendo maior estabilização que os demais casos. A inserção de diferentes ligantes C^N por sua vez promove poucas mudanças nas energias destes orbitais entre os diferentes complexos, entretanto destaca-se que o aumento de deslocalização eletrônica no ligante C^N, aproxima os orbitais LUMO e LUMO +1.

Os dados de TD-DFT podem ser ainda comparados com parâmetros eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica. Na figura 19 são mostrados os voltamogramas obtidos para cada complexo em meio de CH_3CN anidro, com TBAPF_6 como eletrólito suporte.

Figura 19. Voltamogramas dos complexos Ir 1-H (vermelho) e Ir1 (laranja), Ir2 (amarelo), Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde) em CH_3CN anidra.





Os dados voltamétricos confirmam a influência da protonação/desprotonação nos orbitais HOMO destas estruturas, já que são observados voltamogramas anódicos com perfis distintos em função do grau de protonação dos complexos. As espécies catiônicas possuem um pico de oxidação semi-reversível característico do par $\text{Ir}^{\text{III/IV}}$ entre 0,81 e 0,95 V vs Fc/Fc^+ (MARTÍNEZ-ALONSO et al., 2017; SUN et al., 2014), ao passo que os complexos neutros apresentam dois picos de oxidação, sendo um semi-reversível referente ao mesmo processo de oxidação do centro metálico visto nos complexos catiônicos, e outro irreversível em menor potencial (0,67 a 0,71 V vs Fc/Fc^+) que sugere ser referente a oxidação do ligante auxiliar. A tabela 5 lista os potenciais de oxidação encontrados para cada par conjugado. Os estudos de reversibilidade do pico redox referente ao centro metálico Ir(III) estão apresentados no Apêndice C.

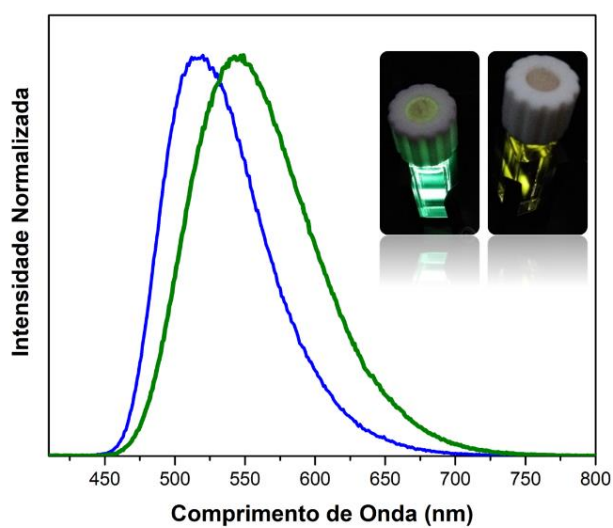
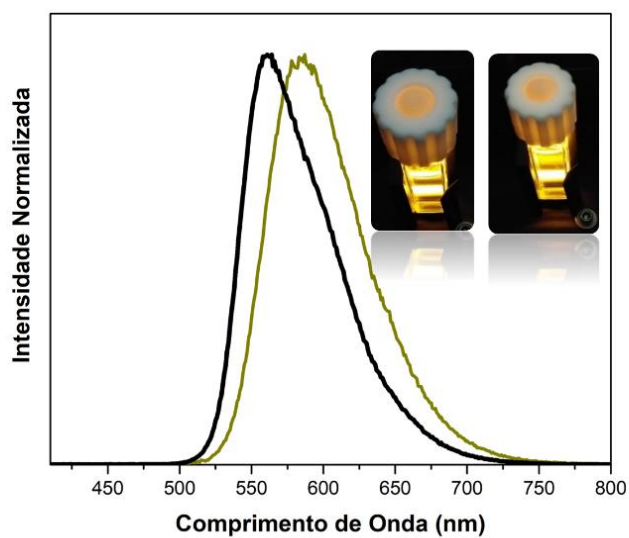
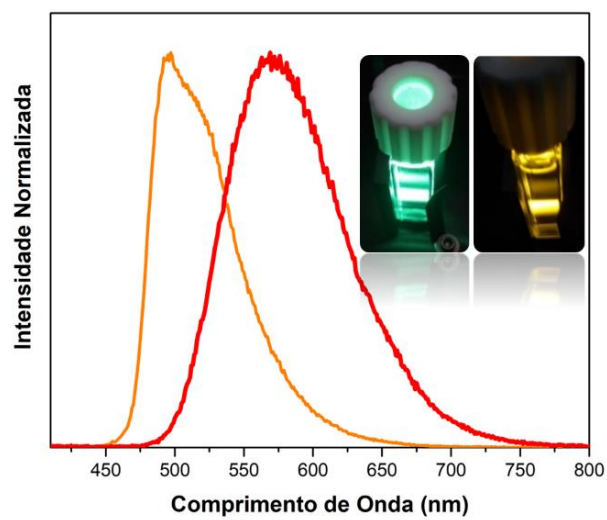
Tabela 5. Parâmetros eletroquímicos dos complexos avaliados em CH₃CN anidra. Os potenciais apresentados são vs Fc/Fc⁺.

Complexes	E _{PA} ¹	E _{PA} ²	E _{PC} ²
Ir1-H	-	0.95	0.81
Ir2-H	-	0.85	0.71
Ir3-H	-	0.81	0.67
Ir1	0.67	0.93	0.73
Ir2	0,68	1.0	0.75
Ir3	0.71	0.97	0.85

Estes dados se aliam com os resultados obtidos por TD-DFT e corroboram com a conclusão de que a presença do próton imidazólico no ligante auxiliar estabiliza o orbital HOMO de cada ácido conjugado, que passam a ser dominados pelos orbitais d do centro Ir³⁺. Observa-se ainda que a mudança do ligante auxiliar tem pouco influência sobre os potenciais anódicos. O complexo Ir3 tem o primeiro potencial de oxidação ligeiramente maior que os complexos Ir1 e Ir2 em função da maior eletronegatividade do anel de 5 membros do 1-fenilpirazol. Para os complexos Ir2 e Ir3, o par Ir^{III/IV} tem potencial maior que nos respectivos ácidos conjugados, o que coincide com o aumento do caráter doador de elétrons do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol após a desprotonação.

A fim de se investigar as propriedades de estado excitado dos sistemas investigados, espectros de emissão de todos os complexos foram obtidos em CH₃CN à temperatura ambiente, Figura 20.

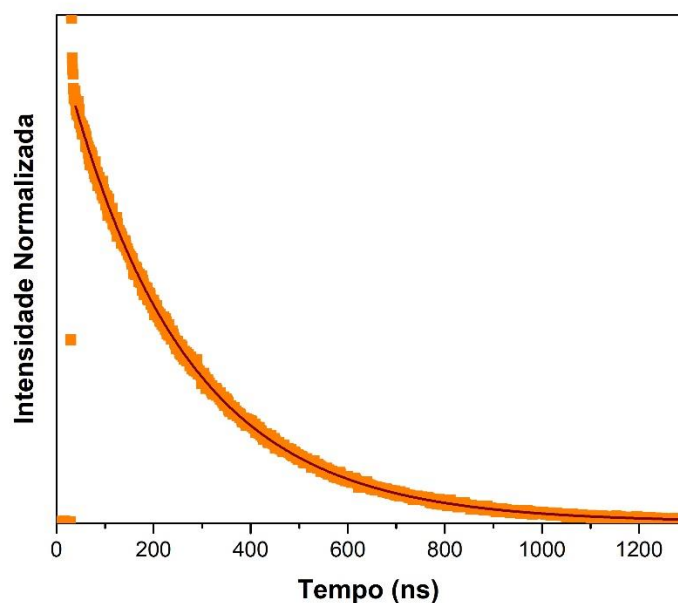
Figura 20. Espectros de emissão estacionária em CH_3CN dos complexos Ir 1-H (vermelho) e Ir1 (laranja), Ir2 (amarelo), Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde).

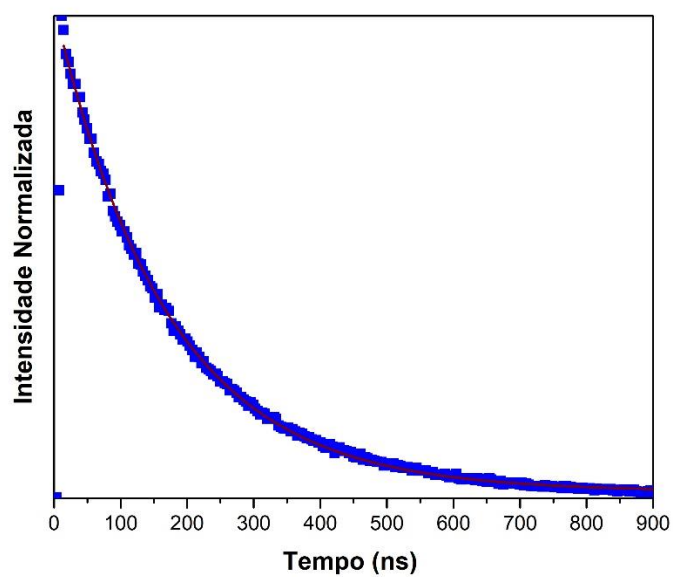
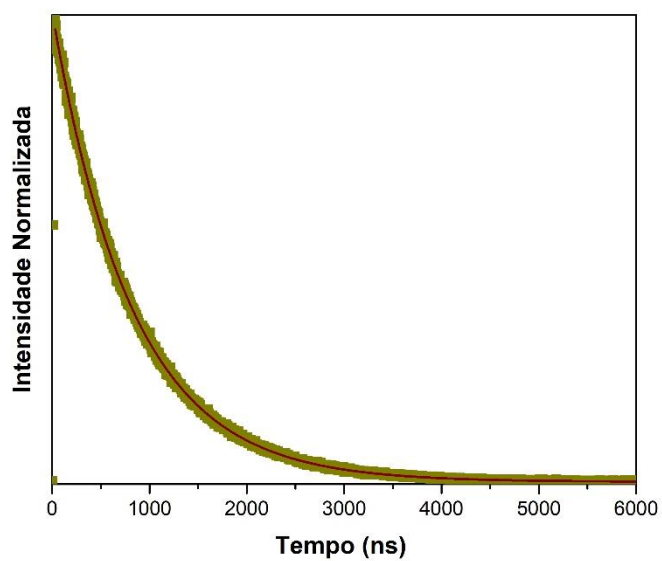


Nota-se que seus máximos de emissão variam desde 500 nm para o Ir1 até 585 nm para o Ir2, o que mostra a modularidade da luminescência de complexos bis-heteroléticos de Ir(III) seja pela utilização de diferentes ligantes C^N seja pela protonação/desprotonação do ligante auxiliar. Todas as bandas observadas são largas e com pronunciado deslocamento de Stokes (acima de 160 nm) característico de decaimentos radiativos provenientes de estados de transferência de carga tripleto (POLO, 2007).

Na Figura 21 são mostrados os decaimentos de emissão dos complexos Ir1, Ir2 e Ir3 em CH₃CN.

Figura 21. Curvas de decaimento da emissão dos complexos Ir1(laranja), Ir2(amarelo) e Ir3(azul).





As curvas de decaimento obtidas para todos os complexos mostram um perfil de mono-exponencial. Na tabela 6 são apresentados os Φ_{em} juntamente com os tempos de vida de estado excitado e constantes de decaimento para cada complexo avaliado em meio de CH_3CN .

Tabela 6. Rendimentos quânticos de emissão (Φ_{em}) à temperatura ambiente em CH_3CN .

Complexos	Φ_{em}	τ (ns)	k_r ($10^5 s^{-1}$)
Ir1-H	$0,020 \pm 0,001$	-	-
Ir1	$0,067 \pm 0,007$	247	37,8
Ir2-H	$0,013 \pm 0,002$	-	-
Ir2	$0,058 \pm 0,003$	822	11,5
Ir3-H	$0,036 \pm 0,001$	-	-
Ir3	$0,081 \pm 0,001$	170	54,1

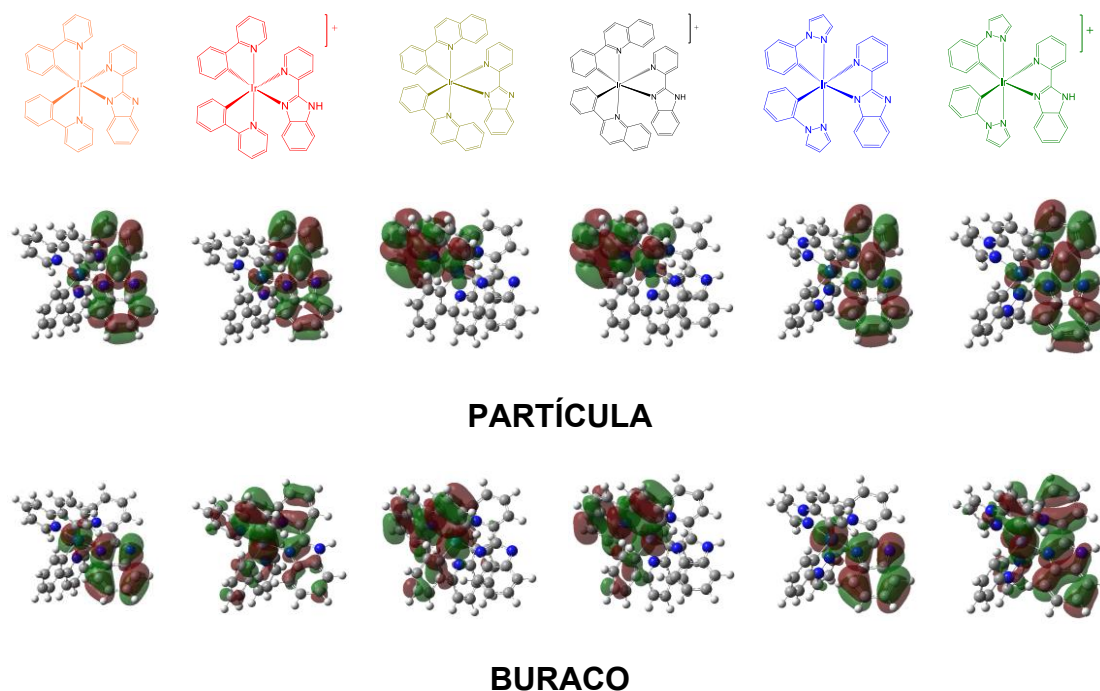
Observa-se que os complexos neutros apresentam maiores Φ_{em} que seus respectivos ácidos conjugados, onde para os pares conjugados Ir1/Ir1-H, Ir2/Ir2-H e Ir3/Ir3-H, os Φ_{em} são respectivamente 29,9%, 22,4% e 44,4 % maiores para as espécies desprotonadas. Nota-se que enquanto os tempos de vida são maiores para os complexos Ir2 e Ir1, seus Φ_{em} seguem uma tendência contrária, com o Ir2 possuindo a menor constante radiativa entre eles. Tal comportamento sugere a existência de estados excitados diferentes entre estes complexos, dos quais serão investigados a diante.

A fim de se investigar a natureza dos orbitais moleculares envolvidos nos processos de emissão foram realizados cálculos de NTO (*Nature Transition Orbitals*). Estes cálculos são feitos a partir dos dados gerados por TD-DFT que por sua vez fornecem estimativas de transições que envolvam mudança de multiplicidade (singlete para tripleto). Assim como foi mostrado nos dados de absorção, foram calculados também as transições de menor energia para o estado tripleto de cada complexo em meio de CH_3CN . A partir da transição tripleto de menor energia gerada por TD-DFT, foram obtidos os NTOs de cada estado para obtenção do chamado par partícula-buraco originado desta transição eletrônica e que representa a variação de densidade eletrônica em relação ao estado fundamental quando um dado estado tripleto é populado.

Sendo assim, os NTOs auxiliam na determinação dos principais orbitais envolvidos no processo de população do estado tripleto e que determinam a

natureza do processo radiativo. Os NTOs da partícula representam os orbitais populadas pelo elétron fotoexcitado enquanto os buracos correspondem aos orbitais de origem desse elétron. A figura 22 apresenta as imagens referentes aos NTO's gerados para cada estado tripleto de menor energia (T_1).

Figura 22. Superfícies de contorno referente ao par partícula-buraco gerados para a transição T_1 para cada um dos complexos.

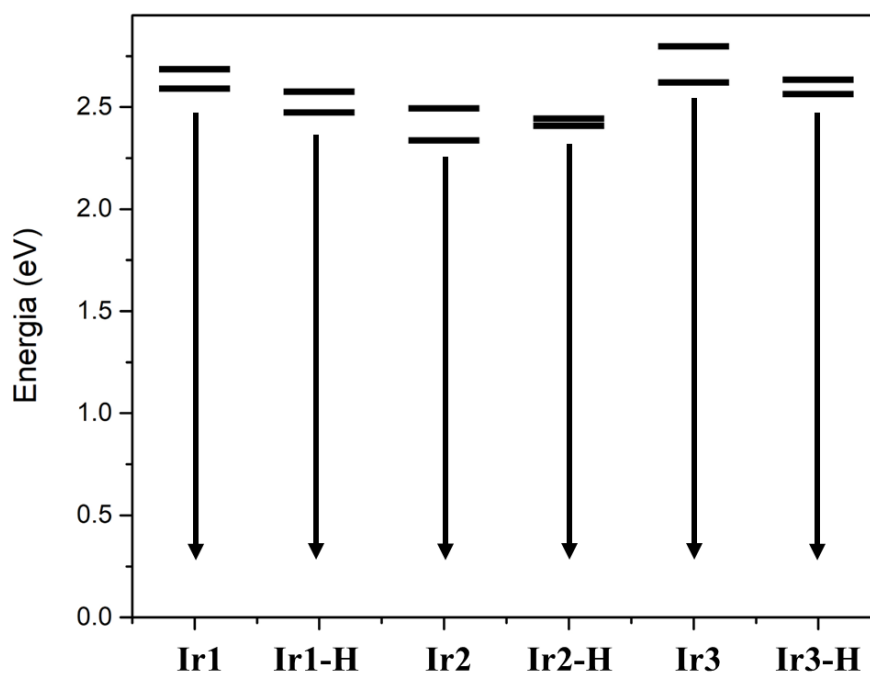


De acordo com os cálculos é possível notar que os estados T_1 possuem um alto grau de mistura entre ${}^3\text{MLCT}$ e ${}^3\text{IL}$. Os estados T_1 dos complexos Ir1, Ir1-H, Ir3 e Ir3-H têm caráter ${}^3\text{MLCT}$ entre os orbitais d do centro metálico e os orbitais π^* do ligante auxiliar (${}^3\text{MLCT}_{\text{Ir(III)} \rightarrow \text{N}^{\wedge}\text{N}}$) com a contribuição ${}^3\text{IL}$ centrada nos orbitais π e π^* do ligante auxiliar (${}^3\text{IL}_{\text{N}^{\wedge}\text{N} \rightarrow \text{N}^{\wedge}\text{N}}$). Já nos complexos Ir2 e Ir2-H por sua vez, os estados T_1 possuem caráter ${}^3\text{MLCT}$ entre os orbitais d do metal e os orbitais π^* dos ligantes doadores $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ (${}^3\text{MLCT}_{\text{Ir(III)} \rightarrow \text{C}^{\wedge}\text{N}}$) aliado ao caráter ${}^3\text{IL}$ centrado nos orbitais π e π^* dos ligantes doadores $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ (${}^3\text{IL}_{\text{C}^{\wedge}\text{N} \rightarrow \text{C}^{\wedge}\text{N}}$).

Nota-se também que nos complexos Ir1 e Ir3 a contribuição dos orbitais da fração benzimidazol do ligante auxiliar e do centro metálico são majoritárias para a origem da partícula fotoexcitada. Enquanto que para os respectivos ácidos conjugados (Ir1-H e Ir3-H) contribuições do ligante $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ podem ser visualizadas nos NTOs referente aos buracos, conferindo assim algum caráter ${}^3\text{LLCT}$ ao estado excitado T_1 dessas espécies, o que se justifica pelo forte caráter

doador sigma dos ligantes C^N. Esse alto grau de mistura para as espécies protonadas leva à diminuição do rendimento quântico de emissão por favorecer o decaimento não-radiativo. Na Figura 23 é apresentado um diagrama referente aos estados excitados de menor energia tripleto calculados por TD-DFT.

Figura 23. Diagrama referente aos estados tripleto de menor energia simulados por TD-DFT.



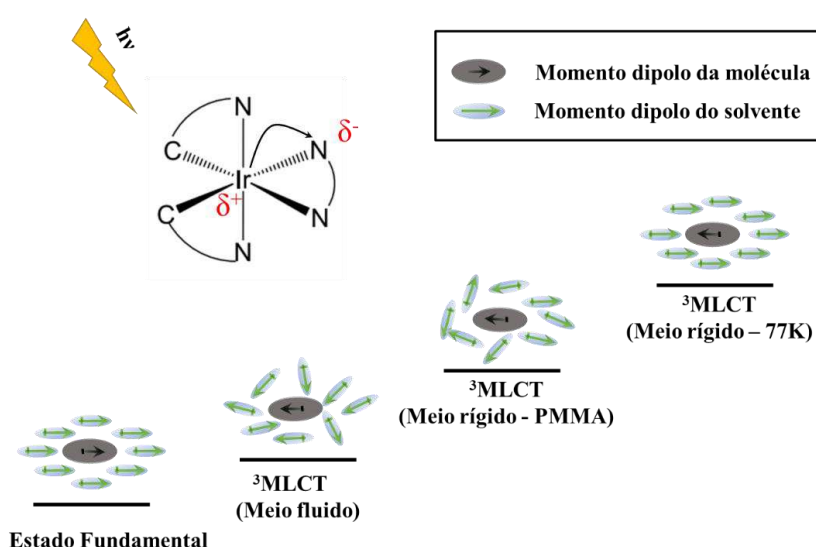
Nota-se que os complexos Ir2-H e Ir3-H apresentam maior proximidade entre seus orbitais de menor energia tripleto, isto reflete em conversões internas mais facilitadas para estas duas espécies, o que corrobora com os Φ_{em} determinados onde entre os dois pares conjugados Ir2/Ir2-H e Ir3/Ir3-H os complexos cujo o anel imidazol está protonado apresentam menor Φ_{em} aliado a menor constante radiativa devido a menor distância energética entre seus estados excitados tripleto.

Informações adicionais sobre a natureza dos estados emissores podem ser obtidas por meio de ensaios de emissão em meio vítreo à baixa temperatura (77 K). Nessas condições as transições não-radiativas são minimizadas em

decorrência da falta de mobilidade molecular e processos difusionais (KESTELL et al., 2002). Como é ilustrado na figura 24, uma molécula que possui um estado emissor $^3\text{MLCT}$ sofre uma mudança significativa em seu momento dipolo quando está no estado excitado. Em emissores fosforescentes, caracterizados por estados excitados emissores com momento de spin total diferentes do estado fundamental, isto significa que o tempo de vida deste estado excitado pode chegar à ordem de micro- ou milissegundos, o que é relativamente longo quando comparado à emissores fluorescentes, onde o estado excitado tem tempo de vida da ordem de nanosegundos.

Com o novo momento de dipolo gerado por um tempo considerável, o meio externo é forçado a se reorientar a fim de estabilizá-lo. Neste ponto a fluidez do meio é determinante, pois em um meio fluido à temperatura ambiente as moléculas do solvente podem se reorientar com maior grau de liberdade a fim de promover esta estabilização. Ocorre que quanto maior a rigidez do meio, menor será o grau de liberdade que o solvente terá, o que leva à desestabilização do estado excitado. (KAHLOW, 1987). Estados excitados que levam a grandes variações de momento dipolo como $^3\text{MLCT}$ ou $^3\text{LLCT}$ tendem a se desestabilizar em meio rígido enquanto estados centrossimétricos, como ^3IL , são menos afetados.

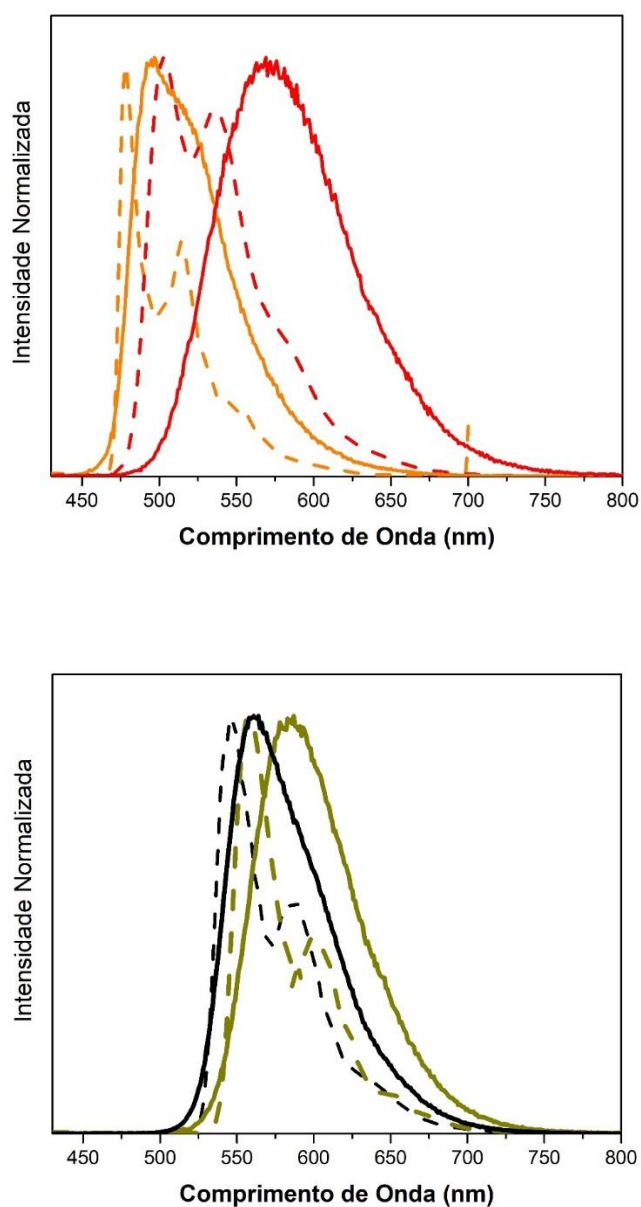
Figura 24. Ilustração do efeito da rigidez do meio sobre a estabilização do momento dipolo gerado em estado excitado $^3\text{MLCT}$.

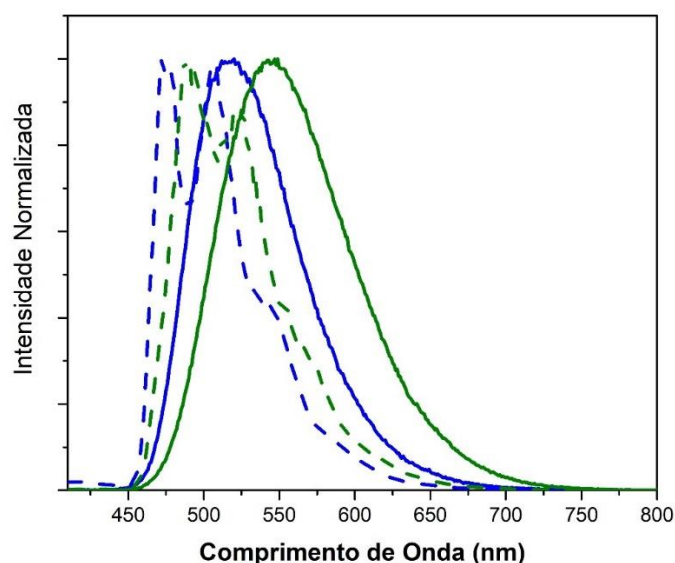


Fonte: Adaptado de Polo, 2007.

Na Figura 25 são mostrados os espectros de emissão estacionária obtidos a 77 K para os complexos estudados a fim de elucidar a natureza de seus estados emissores.

Figura 25. Espectros de emissão estacionária a 77 K (tracejado) e 300 K (contínuo) em propilnitrila/butilnitrila (5:4) dos complexos Ir1-H (vermelho), Ir1 (laranja), Ir2 (amarelo), Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde).

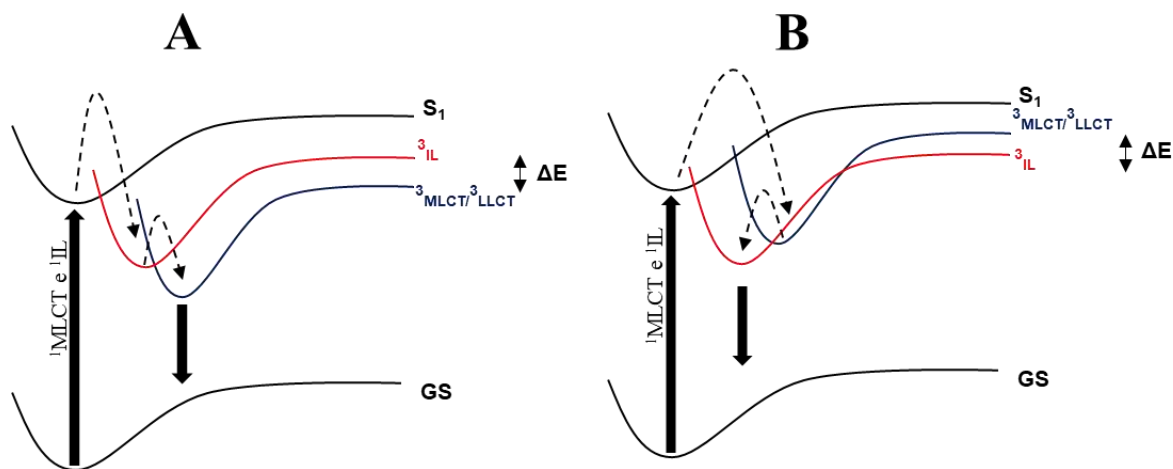




Observa-se que à 77 K os espectros de emissão obtidos sofrem deslocamentos hipsocrômicos, o que ocorre em virtude do chamado efeito rigidocrômico explicado anteriormente, notado de forma mais pronunciada para emissões $^3\text{MLCT}$ (SAJOTO et al., 2009a). Observa-se que os complexos que apresentam maiores deslocamentos hipsocrômicos com o aumento da rigidez do meio são os complexos Ir1-H e Ir3-H e Ir3 com deslocamentos de 64, 60 e 48 nm, respectivamente. Nestes casos pode ser atribuído que seus estados T_1 tem contribuições $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$. Para os complexos Ir1, Ir2-H e Ir2 são observados deslocamentos hipsocrômicos de 14, 13 e 22 nm, respectivamente, coincidindo com o maior caráter ^3IL para os estados T_1 destas espécies. O caráter ^3IL para o estado emissor do Ir2-H justifica o maior tempo de decaimento observado, tendo em vista que estados $^3\text{MLCT}$ decaem mais rápido que estados ^3IL (WANG; DEL GUERZO; SCHMEHL, 2004).

Portanto, é notório que todos os complexos estudados possuem pelo menos dois estados excitados termicamente equilibrados envolvidos no processo emissivo e que podem ser a princípio distinguidos a baixas temperaturas. A Figura 26 ilustra os dois tipos de sistemas encontrados para os complexos avaliados. O sistema A representa o comportamento fotofísico dos complexos Ir1-H, Ir3 e Ir3-H, ao passo que o sistema B representa o comportamento fotofísico referente aos complexos Ir1, Ir2 e Ir2-H.

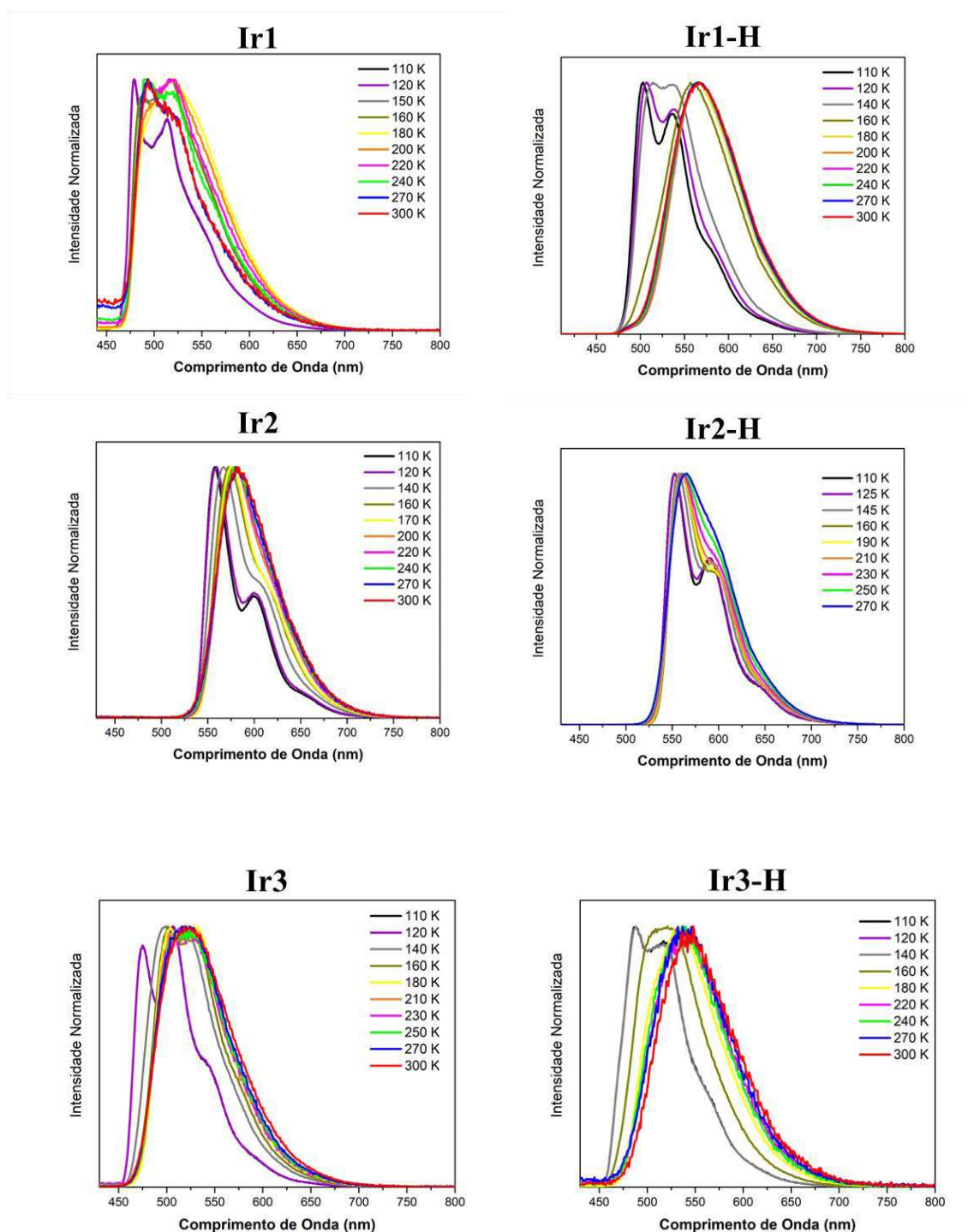
Figura 26. Diagrama simplificado de energia para os processos envolvidos na emissão dos complexos avaliados.



A excitação destes complexos envolve transições $^1\text{MLCT}$ e ^1IL . O forte acoplamento spin-órbita promovido pelo centro metálico leva ao cruzamento intersistema e a população dos estados tripleto $^3\text{MLCT}$ (azul) e ^3IL (vermelho). Esses estados estão separados por diferença de energia (ΔE) e tendem-se a se equilibrar em meio fluido à temperatura ambiente, mas a 77 K o estado $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$ se desestabiliza e a luminescência passa a ser dominada pelo estado ^3IL . (ZYSMAN-COLMAN, [s.d.]). Destaca-se que para o par Ir1/Ir1-H, a simples protonação/desprotonação do ligante 2-(2-piridil)benzimidazol é suficiente para alterar a natureza do estado emissor.

Sabe-se que a taxa de decaimento radiativa pode ser afetada, assim como o rendimento quântico de emissão, por transições não-radiativas entre níveis próximos e equilibrados termicamente (SAJOTO, 2009). Com o intuito de observar o quão acessível termicamente podem estar estes estados na classe de complexos estudados e elucidar melhor o caráter de cada orbital emissor, foram realizados os ensaios de emissão com variação de temperatura em propionitrila/butironitrila (5:4) e em meio polimérico (PMMA). Na Figura 27 são apresentados os espectros de emissão estacionária obtidos em cada temperatura. Os dados com variação de temperatura mostram alterações do máximo de energia, perfil da banda e intensidade de emissão para cada complexo (os espectros não normalizados estão apresentados no D).

Figura 27. Espectros de emissão dos de todos os complexos em baixa temperatura (110 – 300 K) em prop/but (5:4). $\lambda_{exc} = 350\text{nm}$.



Assim como foi discutido nos experimentos a 77 K, os complexos que apresentam maiores deslocamentos advindos do efeito rigidocrômico aliados a uma mudança do perfil da banda de emissão são classificados como emissores ${}^3\text{MLCT}/{}^3\text{LLCT}$. Nos dados com variação de temperatura é possível notar o gradual deslocamento que ocorre nos máximos de emissão dos complexos Ir1-

H, Ir3 e Ir3-H o que evidencia a desestabilização da $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$ que ocorre com o aumento da rigidez do meio. É importante observar que o aumento da energia de emissão (deslocamento hipsocrômico) ocorre com a estruturação gradual da banda de emissão, mostrando que existe mudança do estado emissor para ^3IL , que é caracterizado por emissões mais estruturadas.

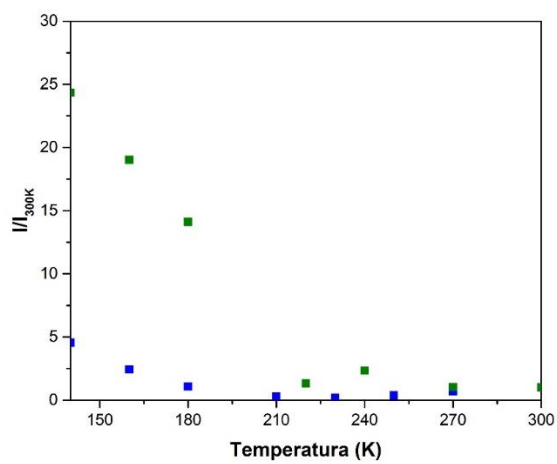
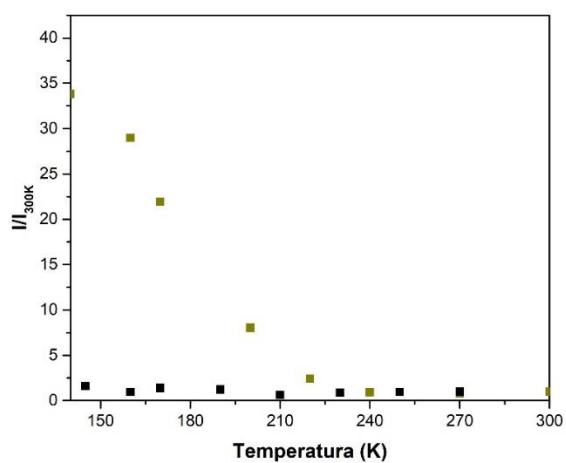
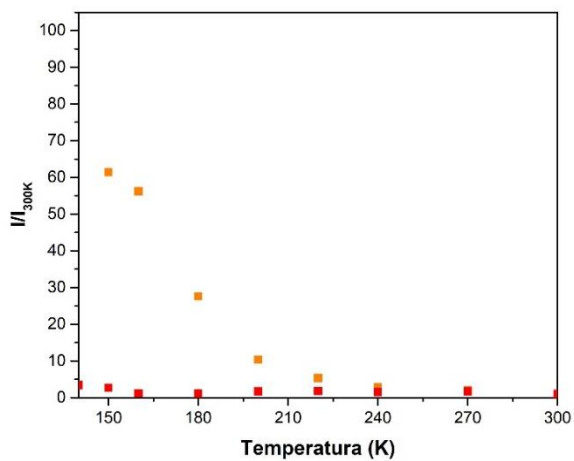
Por outro lado, os espectros para os complexos Ir1, Ir2 e Ir2-H a diferentes temperaturas apresentam baixos deslocamentos de seus máximos de emissão e concomitantemente o aumento da estruturação das bandas de emissão, sugerindo que estes emissores ^3IL não apresentam mudança de estado emissor durante o experimento com variação de temperatura no intervalado avaliado.

A fim de avaliar a diminuição dos processos não-radiativos pelo crescimento do Φ_{em} foram plotadas as razões das integrais dos espectros de emissão a cada temperatura em função do valor obtido a 300 K. Esta razão nos fornece uma aproximação, equação 4, da variação do rendimento quântico em função da temperatura ao considerar que a variação do quadrado do índice de refração do solvente é anulada pela variação na absorbância da amostra, (Equação 5) (RAMOS et al., 2022; WORL et al., 1991). Na Figura 28 estão representadas as curvas de decaimento da emissão em função da temperatura.

$$\Phi_{em}^T \approx \Phi_{em}^{298} \frac{S_T}{S_{298}} \quad (5)$$

$$\Phi_{em}^T = \Phi_{em}^{298} \left(\frac{S_T}{S_{298}} \right) \left(\frac{A_{298}}{A_T} \right) \left(\frac{\eta_T}{\eta_{298}} \right)^2 \quad (6)$$

Figura 28. Decaimento de emissão dependente da temperatura para os complexos estudados de 140 – 300 K em prop/but (5:4). $\lambda_{exc} = 350\text{nm}$. Ir1-H (vermelho), Ir1 (laranja), Ir2 (amarelo), Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (laranja).



Nota-se que os complexos que apresentam maior variação de intensidade relativa de emissão em função da temperatura são o Ir1, Ir2 e Ir3-H, enquanto os complexos Ir1-H, Ir2-H e Ir3 tem variação consideravelmente menor. O comportamento observado em função da temperatura revela, portanto, a complexidade dos processos de decaimento dessas espécies e as possíveis interconversões entre os diferentes estados excitados.

Como dito anteriormente, estados $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$ são fortemente desestabilizados em meios rígidos, enquanto a energia de estados ^3IL é menos afetada. À medida que a temperatura do meio supera a região de transição vítrea (120-150 K), o rearranjo das moléculas de solvente em função da mudança de dipolo volta a ocorrer e a energia dos estados $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$ é reestabelecida. Tal comportamento é evidenciado na Figura 27 por exemplo, em que o máximo de emissão das bandas larga e não estruturada praticamente não variam na faixa de temperatura entre 160 e 300 K. Nessa região, as constantes de velocidade associadas aos processos não radiativos (cruzamento intersistema, conversão interna) sofrem diferentes variações em função da energia relativa dos estados excitados e de sua natureza.

Esperar-se-ia, por exemplo, que as espécies protonadas teriam maior variação da intensidade de emissão em razão de um possível equilíbrio de protonação/desprotonação, mas tal comportamento foi observado apenas para a par Ir3/Ir3-H. Para os demais pares conjugados, as espécies desprotonadas (Ir1 e Ir2) foram mais afetadas pela variação da temperatura. Em ambos os casos a emissão é majoritariamente advinda de estados ^3IL , cujo decaimento radiativo parece se beneficiar, a baixas temperaturas, da diminuição de interconversão com os estados $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$ próximos em energia. De fato, os estados $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$ tendem a decair para os respectivos estados fundamentais com constantes de velocidade maiores que aquelas para estados ^3IL devido a maior ortogonalidade (EL-SAYED VOL; EL-SAYED, [s.d.]) justificando o menor efeito, a baixas temperaturas, da diminuição de interconversão para os emissores $^3\text{MLCT}/^3\text{LLCT}$.

Na literatura, Tissa Sajoto, 2009 e Lifan Yang, 2008 descreveram para outros complexos ciclometalados de Ir(III) a existência de um equilíbrio entre os estados $^3\text{MLCT}$ e ^3IL que pode ser termicamente controlado no intervalo de temperatura avaliado (90 a 300 K) (SAJOTO et al., 2009b; YANG et al., 2008) o

que corrobora para a hipótese levantada. Não é possível, porém, determinar a partir dos dados disponíveis a principal razão para as variações observadas entre os diferentes pares conjugados. As variações relativas no Φ_{em} são, por definição, advindas de um somatório de fatores. Para maior elucidação da influência da temperatura, seria necessário o monitoramento dos processos não radiativos empregando técnicas rápidas como a espectroscopia de absorção resolvida no tempo na região do infravermelho.

4.3. ENSAIOS DE BIOMARCAÇÃO.

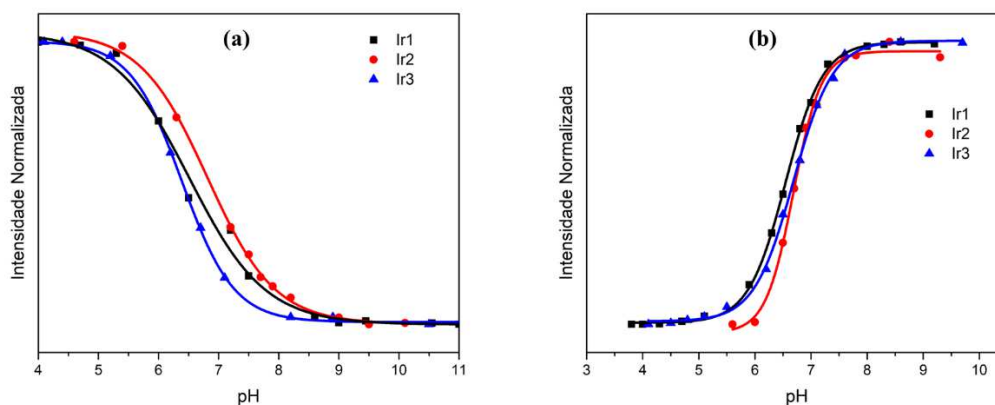
Os complexos sintetizados foram testados como potenciais biomarcadores em células HeLa, para que se pudesse avaliar o efeito das variações estruturais na permeabilização celular dessas espécies, já que se tem um gradiente de lipofilicidade onde $Ir2 > Ir1 > Ir3$, assim como avaliar a influência da protonação na incorporação celular bem como a compartimentalização destes complexos pela célula.

Na comunicação de Murphy e colaboradores os complexos Ir1-H e Ir1 foram avaliados quanto a seletividade para marcação de lisossomos em células de CHO e no trabalho de Yu e colaboradores o complexo Ir1-H foi avaliado quanto a sua propriedade anti-metástase e dano de lisossomo por terapia fotodinâmica (MURPHY et al., 2010; WANG et al., 2017). Estes dois relatos chamam atenção para a seletividade que o complexo Ir1-H possui frente a localização em uma classe específica de organelas ácidas (lisossomos) justificando a avaliação da localização celular dos demais complexos sintetizados neste trabalho por meio de estudos de biomarcação.

Por se tratar de três grupos de pares ácido/base conjugados foram realizados estudos com o objetivo de determinar suas constantes de dissociação protônicas. Sabendo que os pares ácido/base Ir1/Ir1-H, Ir2/Ir2-H e Ir3/Ir3-H, possuem diferentes comprimentos de onda de absorção em suas bandas MLCT e diferentes comprimentos de onda emissão, foi realizada uma titulação espectrofotométrica (Figura 29) monitorada por UV-VIS (a) e por Emissão Estacionária (b) a fim de determinar a constante de dissociação protônica (K_{β})

no estado fundamental e no estado excitado (K_{β}^*), respectivamente. O estudo foi realizado em meio de DMSO:H₂O (1:1).

Figura 29. Titulação espectrofotométrica dos complexos Ir1-H, Ir2-H e Ir3H com equivalentes de KOH em meio de DMSO/H₂O(1:1), monitorada por UV-VIS (λ_{\max} espécie protonada) (a) e Emissão Estacionária (λ_{em} espécie desprotonada) (b).



A partir do ponto de maior inflexão da curva, onde 50% das espécies estão na forma protonada e 50% na forma desprotonada em meio de DMSO/H₂O (1:1) é estimado o valor corresponde ao pK_{β} e pK_{β}^* nas titulações monitoradas por UV-VIS e Emissão Estacionária, respectivamente. Os valores determinados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Constantes de acidez determinadas em meio de DMSO/H₂O(1:1), monitorada por UV-VIS (λ_{\max} espécie protonada) e Emissão Estacionária (λ_{em} espécie desprotonada).

Complexos	pK_{β}	pK_{β}^*	k_{β}	k_{β}^*
Ir1-H \rightleftharpoons Ir1	6.5	6.5	3.1×10^{-7}	3.1×10^{-7}
Ir2-H \rightleftharpoons Ir2	6.8	6.7	1.6×10^{-7}	2.0×10^{-7}
Ir3-H \rightleftharpoons Ir3	6.4	6.7	4.0×10^{-7}	2.0×10^{-7}

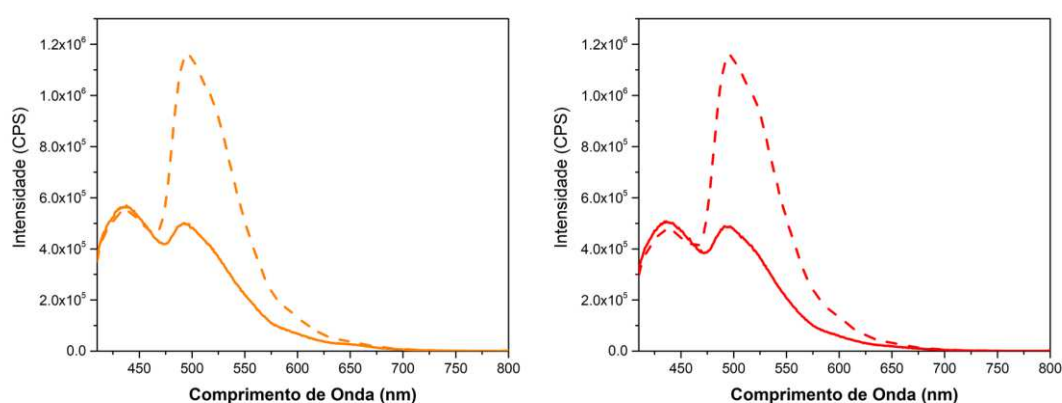
O par conjugado Ir1-H/Ir1 possui seu pK_{β}^* descrito na mesma mistura de solventes como sendo 6,6 (MURPHY et al., 2010) coincidindo com os dados apresentados neste trabalho. Nota-se que não há mudança significativa entre o pK_{β} e pK_{β}^* para nenhum dos complexos estudados e que, de acordo com a

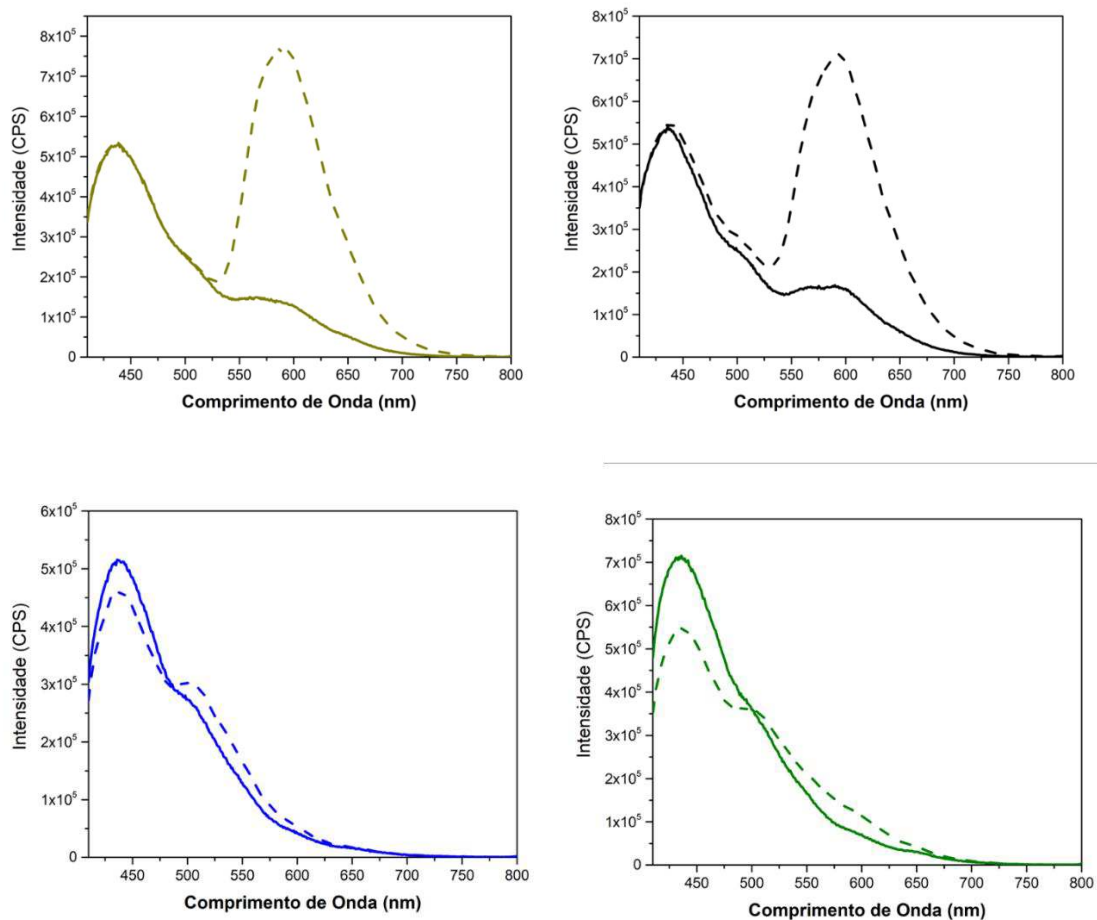
equação de Handerson-Hasselbalch (Equação 6), em pH acima de 7,7 todos os complexos estudados neste trabalho se encontram em sua forma desprotonada (neutra), ao passo que pH abaixo de 5,4 a espécie que prevalece são os ácidos conjugados já que os maiores e menores pHs encontrados são 6,7 e 6,4, respectivamente.

$$\text{pH} = \text{p}k_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]} \quad (6)$$

Todos os seis complexos tiveram seus %uptake (taxa de incorporação) determinados nas células HeLa por meio de medidas de emissão estacionária no qual seus espectros de emissão obtidos para a quantificação estão apresentados na Figura 30.

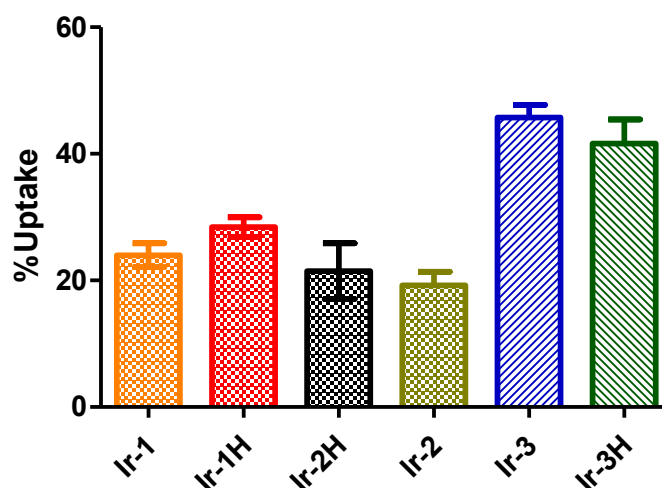
Figura 30. Espectros de emissão obtidos nos experimentos de incorporação dos complexos Ir1 (laranja), Ir1-H (vermelho), Ir2 (amarelo) e Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde) nas células HeLa. Onde a linha contínua se refere a emissão do complexo incorporado na célula e a linha tracejada se refere ao complexo presente no sobrenadante.





É possível observar nos espectros de emissão que os pares conjugados apresentam o mesmo perfil de banda de emissão entre si. Este comportamento se deve a utilização de meios tamponados com pH $\sim 7,2$. Nesta condição, as espécies presentes no meio para incorporação celular são majoritariamente as espécies desprotonadas, ou seja, Ir1, Ir2 e Ir3. Na Figura 31 é apresentado os %Uptake determinados com base na equação 1.

Figura 31. %Uptake determinado para os complexos incubados por 4 h com concentração de 1 μ M. Ir1 (laranja), Ir1-H (vermelho), Ir2-H (preto), Ir2 (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde).



Nota-se que o aumento de lipofilicidade do Ir1 para o Ir2 não proporcionaram mudanças nos percentuais de incorporação, enquanto o aumento de hidroflicidade (Ir3) aumentou significativamente o percentual de incorporação destes complexos nas células HeLa, mostrando %uptake acima de 40%. O %uptake é importante para avaliar o quanto cada complexo interage com a membrana celular e penetra a célula. Este mecanismo depende em geral de características como lipofilicidade/hidroflicidade, carga e tamanho das estruturas empregadas (ZHAO; HUANG; LI, 2011). Portanto, a maior permeabilização dos complexos Ir3 e Ir3-H pode se dar em decorrência de seu menor tamanho em relação aos demais complexos.

Observa-se que não há diferença entre os ácidos/bases conjugados em relação aos %uptake determinados o que se alinha com a discussão de que nas condições de incorporação, a maior parte das espécies encontradas são referentes aos complexos na forma desprotonada.

Nos demais ensaios, a avaliação da luminescência dos complexos se deu em sistemas aerados. Em amostras fosforescentes o O₂ atua como supressor no decaimento de seu estado excitado, logo foram determinados os τ para todos os complexos em sistemas aerados no qual seus valores estão apresentados na tabela 8 (curvas de decaimento estão no apêndice E).

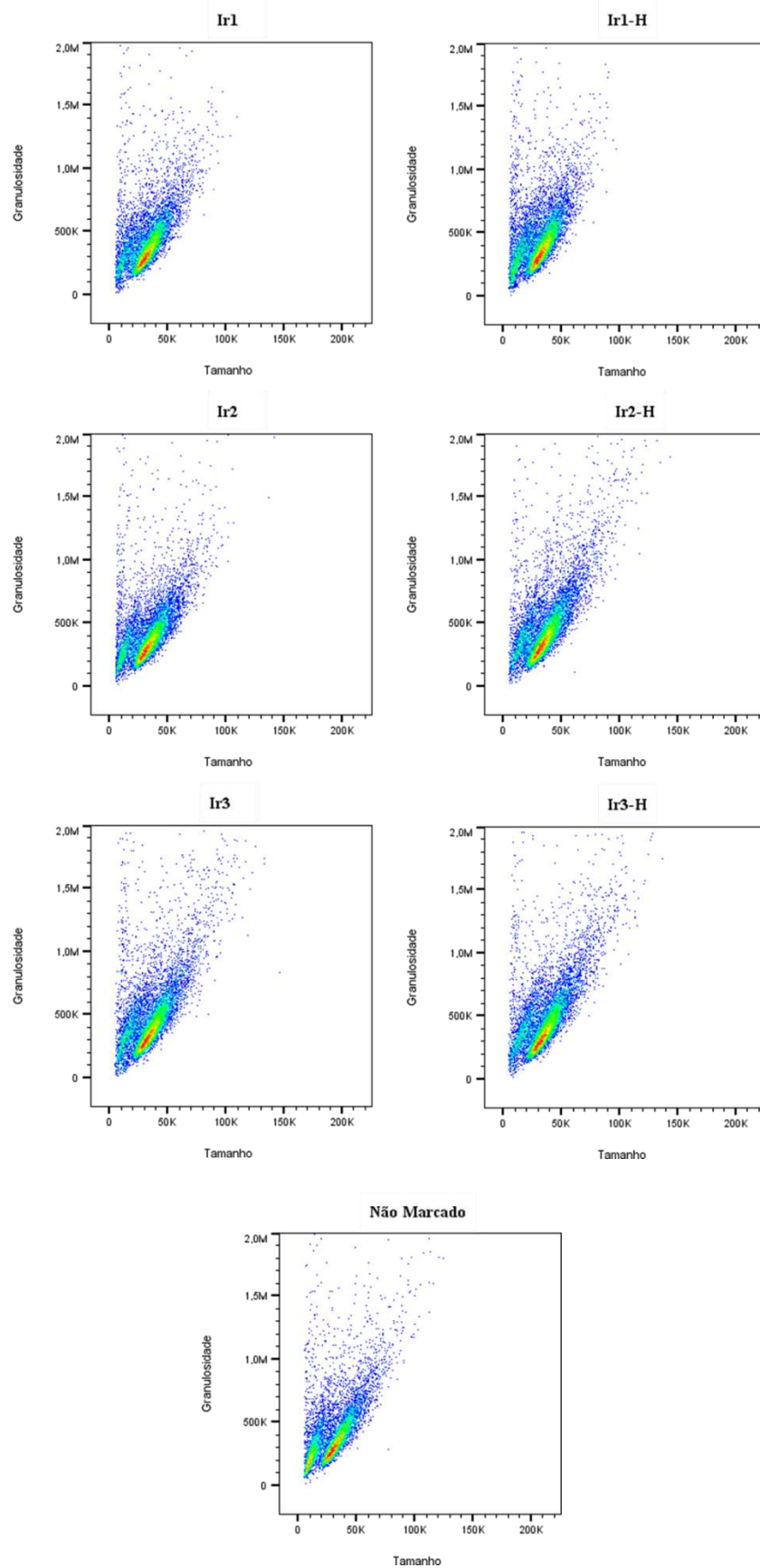
Tabela 8. Tempos de vida no estado excitado para os complexos estudados em meio de CH₃CN aerado.

Complexos	Ir1-H	Ir1	Ir2-H	Ir2	Ir3-H	Ir3
τ (ns)	63,7	32,5	157	97,0	68,3	43,9

Nota-se que a emissão destes complexos possui decaimento, em sistemas aerados, acima dos tempos de atraso tipicamente empregados em estudos de imageamento celular por emissão resolvida no tempo (~10 ns) (SCHNECKENBURGER et al., 2004), o que viabilizaria o uso destes complexos até mesmo em estudos como estes. Neste trabalho porém foram empregadas apenas técnicas de emissão estacionária para avaliar a incorporação destes complexos em células HeLa, como será mostrado a seguir.

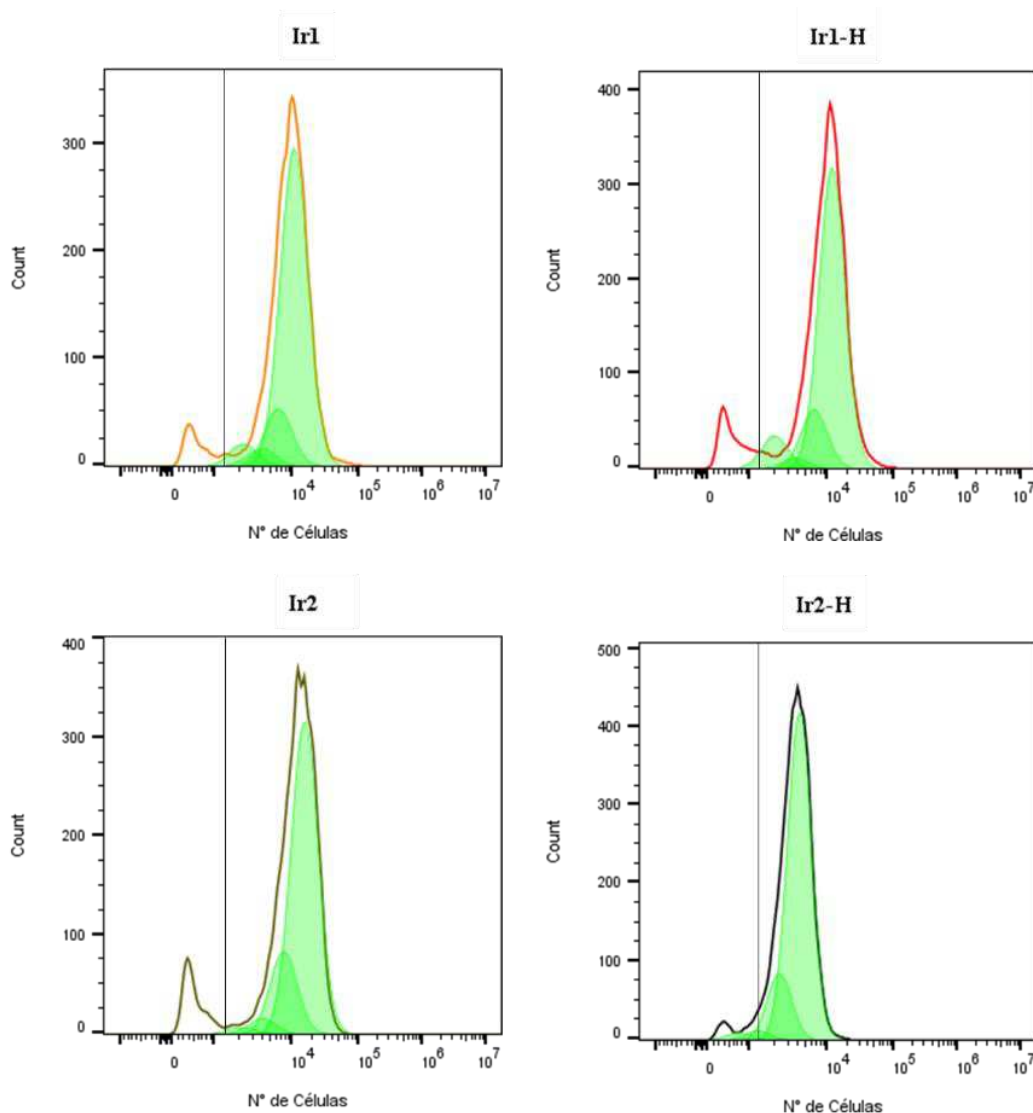
A fim de se obter maiores informações sobre a incorporação celular das espécies em estudo, foram realizados experimentos de citometria de fluxo com a utilização do filtro K0525 ($\lambda_{exc}=405$ nm e $\lambda_{em} = 525$ nm). Na Figura 32 são mostrados os mapas de granulidade e tamanho das células obtidos e que permitem avaliar a morfologia das células antes e após a incorporação dos complexos.

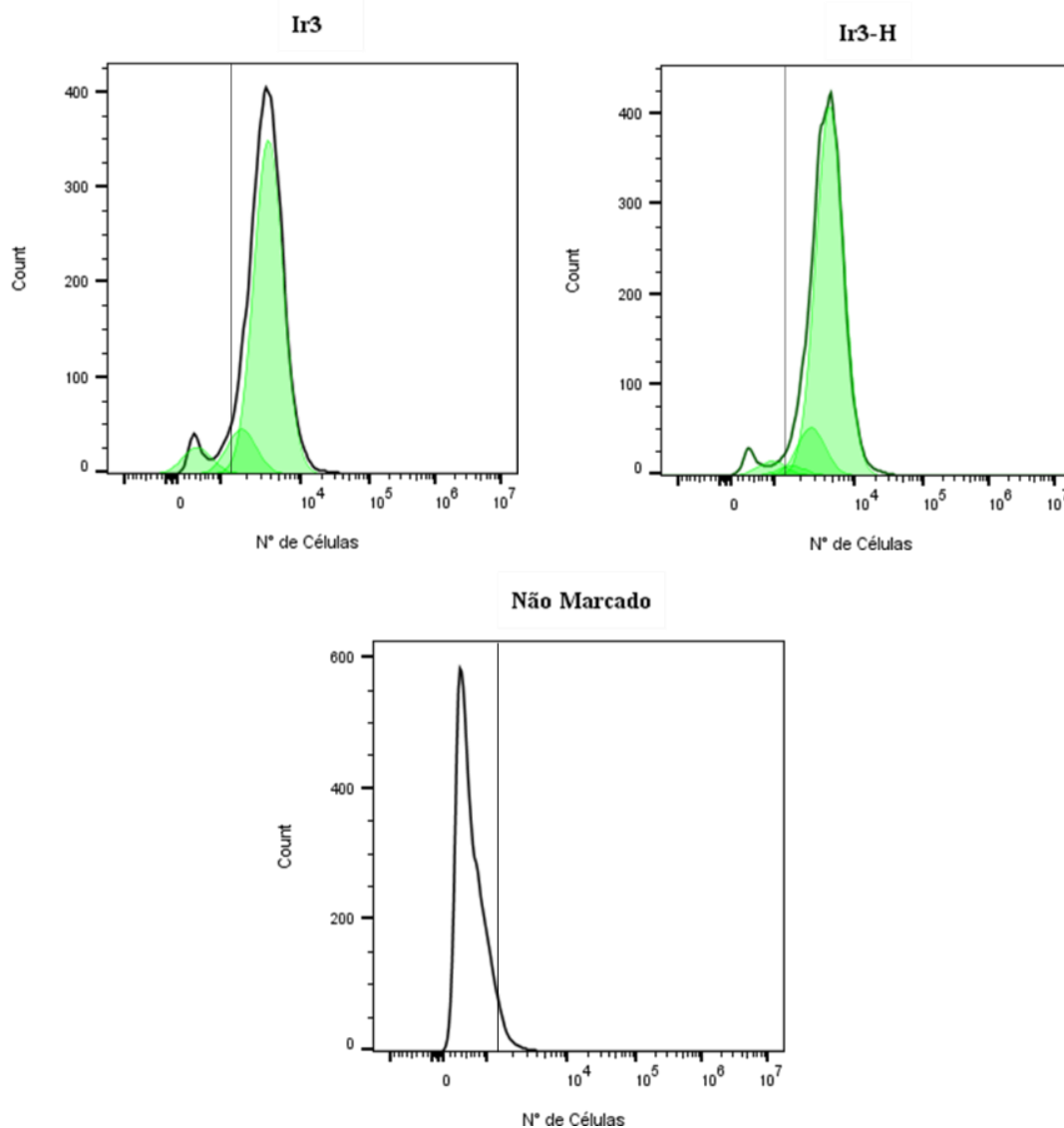
Figura 32. Relação de tamanho x granulidade encontrado nos ensaios de marcação com HeLa.



Nota-se que a marcação com os complexos de Ir(III) estudados não apresentou indícios de alteração na morfologia das células HeLa, uma vez que as populações sem marcação apresentam mapas de granulosidade e tamanho de células similares aos das amostras marcadas. Isto sugere que a incorporação destes marcadores nas condições avaliadas não causa danos significativos nas células avaliadas inerente de uma baixa citotoxicidade destes complexos neste conjunto de células. Na Figura 33 são mostrados os histogramas obtidos por citometria de fluxo diante a incorporação de cada complexo.

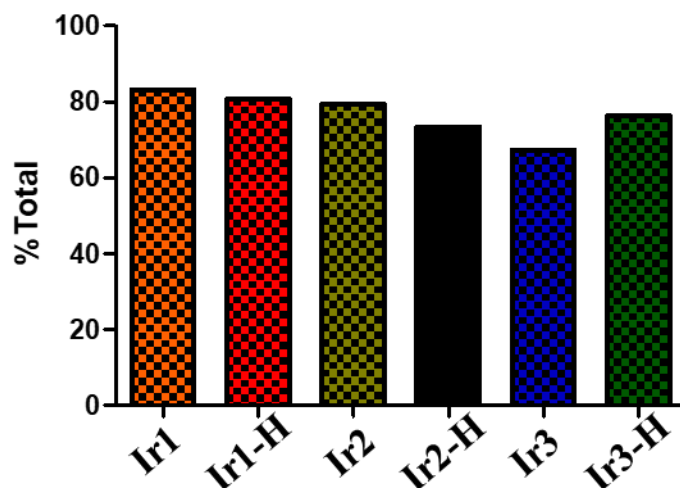
Figura 33. Histogramas obtidos para os complexos avaliados em células HeLa sob utilização do filtro KO525 com tempos de incubação de 4 h e concentração de 1 μ M. A barra em preto indica o final da autofluorescência das células.





Observa-se significativa quantidade de células marcadas para todos os complexos avaliados, no qual em todos os casos o número de células que apresentam emissão é maior que a emissão advinda da autofluorescência celular. Para auxiliar na quantificação das populações de células marcadas, os percentuais para cada complexo são apresentados na Figura 34.

Figura 34. Percentual de células marcadas determinados com base nos histogramas obtido para os complexos avaliados em células HeLa sob utilização do filtro KO525 com tempos de incubação de 4 h e concentração de 1 μ M. Ir1 (laranja), Ir1-H (vermelho), Ir2 (amarelo), Ir2-H (preto), Ir3 (azul) e Ir3-H (verde).

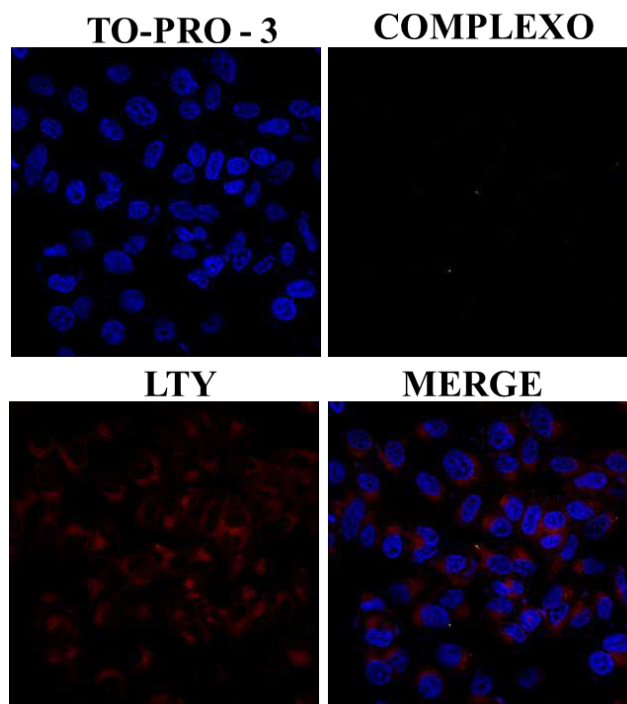


É interessante que, de acordo com a citometria, não há diferenças entre os marcadores testados, no qual todos os complexos avaliados, independentemente de suas modulações estruturais conseguem marcar populações acima de 70%.

Para auxiliar no entendimento sobre a região celular em que os complexos atuam, foram realizados experimentos de microscopia confocal onde são coletados imagens das células sob a excitação de feixes específicos. Nos experimentos em questão optou-se pela utilização de marcadores fluorescentes padrões para o núcleo celular (To-Pro-3) e lisossomos (Lysotracker Yellow) incorporados juntamente com os complexos avaliados.

Inicialmente são apresentadas imagens referentes aos controles realizados com o To-Pro-3 e Lysotracker Yellow (LTY) (Figura 35).

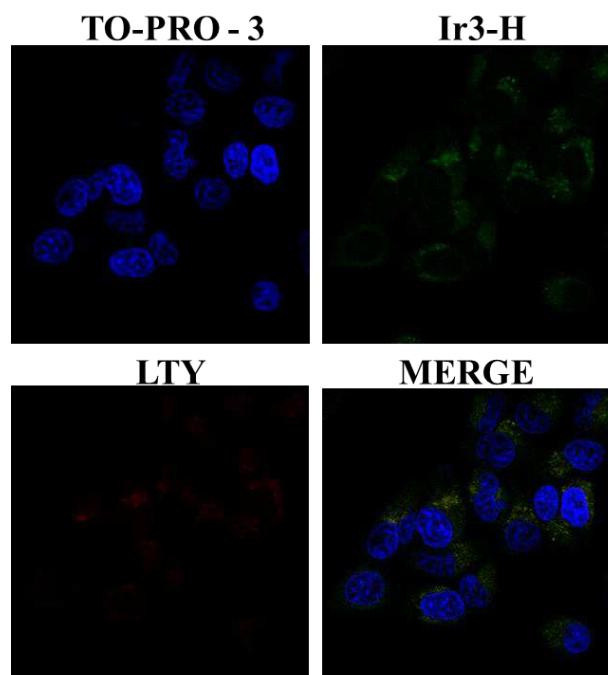
Figura 35. Imagens obtidas por microscopia confocal para marcação com To-Pro-3 e LTY.



Nota-se que os padrões utilizados mostraram bons sinais nos canais utilizados e que além disso as regiões das células marcadas pelo To-Pro-3 e LTY se alinham bem com as morfologias esperadas para o núcleo e lisossomos, respectivamente. Este experimento, além de evidenciar o bom funcionamento destes marcadores padrões nas células HeLa, são mostrados a fim de evidenciar que não há marcação por nenhum destes dois padrões no canal selecionado para os complexos.

Na figura 36 são mostradas imagens referentes a marcação com o To-Pro-3 e um dos complexos (Ir3-H).

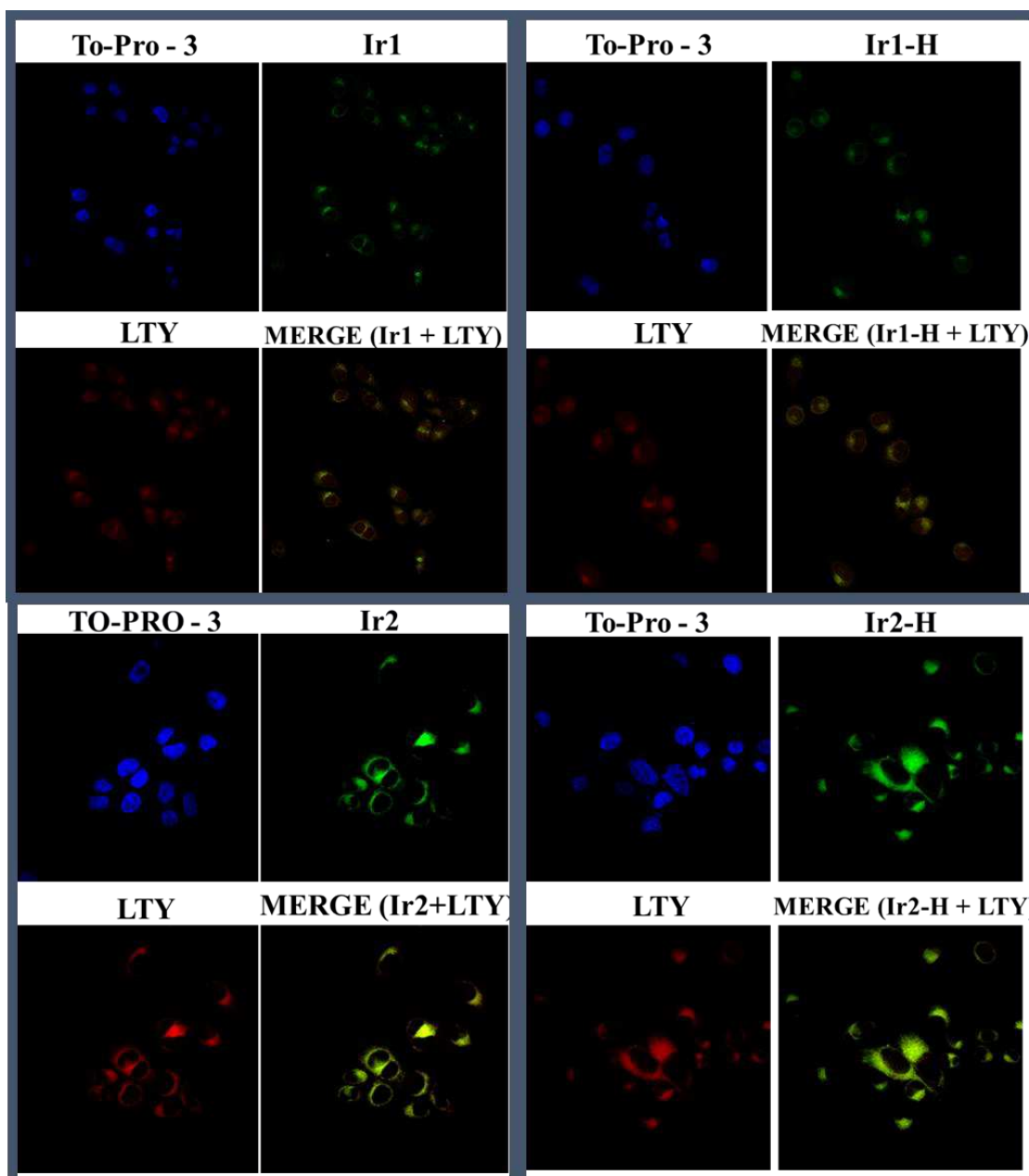
Figura 36. Imagens obtidas por microscopia confocal para marcação com To-Pro – 3 e Ir3-H.



Nota-se que o complexo Ir3-H apresenta emissão na célula e que sua localização na célula se dá na região perinuclear, mostrando que os experimentos de marcação com este complexo apresentaram bom funcionamento. Entretanto é necessário observar que o complexo Ir3-H também apresentou emissão no canal referente ao LTY, uma emissão fraca, porém presente neste canal, evidenciando que nos parâmetros utilizados o complexo Ir3-H interfere na imagem referente à marcação com LTY. Sabe-se que todos os complexos estudados neste trabalho abrangem a faixa de emissão de 500 a 700 nm, logo assume-se que todos interferirão no canal de emissão do LTY.

Na tentativa de avaliar as influências desta interferência em estudos de colocalização com o LTY, foram realizadas incubações distintas para os complexos Ir1, Ir1-H, Ir2 e Ir2-H, no qual cada complexo foi incubado juntamente os padrões To-pro-3 e LTY (Figura 37). Estes complexos foram escolhidos a fim de obter um comparativo com a literatura (I1-H) e emissões mais deslocadas para o vermelho que se aproximassem ainda mais da emissão do LTY.

Figura 37. Imagens obtidas por microscopia confocal para marcação com os complexos Ir1 e Ir1-H, Ir2 e Ir2-H.



Nota-se que ambos complexos possuem localizações muito parecidas entre si, além de estarem em regiões perinucleares semelhantes com o que foi relatado para o complexo Ir1-H no trabalho de Yu e colaboradores onde o coeficiente de correlação de Pearson's (PCC) entre o complexo Ir1-H e seu marcador padrão de lisossomos, reportado na comunicação de Yu e colaboradores foi de 0,57 (WANG et al., 2017). Neste trabalho optou-se por reportar os coeficientes de correlação de Person's assim como os coeficientes

de correlação de Mander's. Os coeficientes determinados estão apresentados tabela 8.

Tabela 8. Coeficientes de correlação de Pearson's (PCC) e Mander's (M1 e M2) determinado a partir das imagens de microscopia confocal para a colocação dos complexos com o LTY.

Complexos	PCC	M1 (LTY em Complexo)	M2 (complexo em LTY)
Ir1	0.608	0.511	0.933
Ir1-H	0.75	0.719	0.953
Ir2	0.943	0.911	0.992
Ir2-H	0.949	0.961	0.98

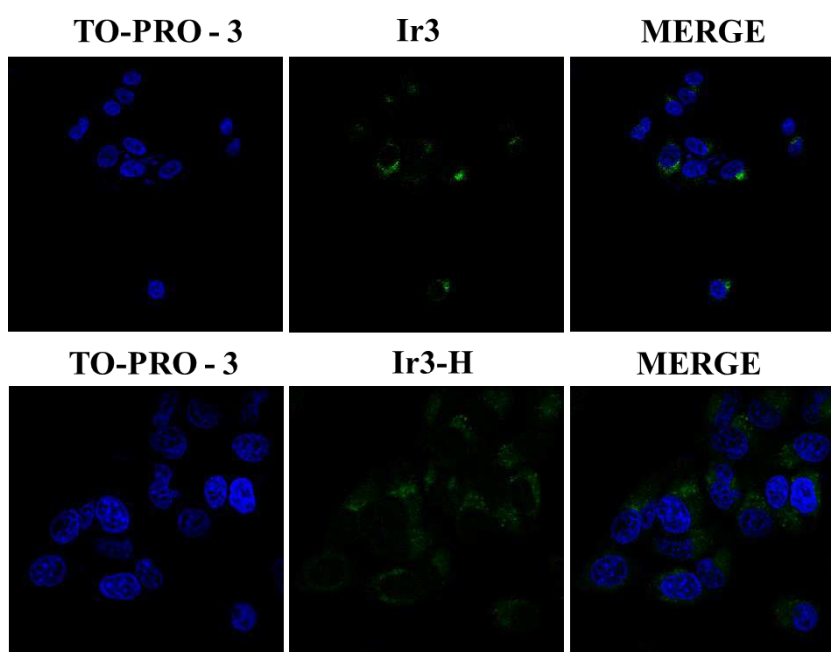
Uma vez que foi mostrado a interferência que os complexos testados têm frente ao canal de emissão do LTY, é esperado que valores superestimados de PCC sejam obtidos, já que há sinais com a mesma origem presentes nos dois canais de monitoramento. Entretanto, determinações menos superestimadas sobre esta colocação podem ser obtidos através do coeficiente de correlação de Mander's referente a sobreposição da marcação do LTY sobre a marcação dos complexos, uma vez que a marcação com LTY não aparece no canal referente aos complexos. A sobreposição do complexo sobre a marcação do LTY por sua vez, evidencia claramente que existe marcação inerente do complexo presente no canal do LTY mostrando coeficientes acima de 0,90 para todos os complexos.

Nota-se que ocorre um aumento dos coeficientes de correlação significativo para o complexo Ir2-H. Este complexo teve sua emissão adquirida em 558 nm, enquanto os complexos Ir1-H e Ir1 tiveram suas emissões centradas em 531 e 521 nm, respectivamente. Portanto nota-se que os coeficientes de correlação aumentam à medida que o comprimento de onda de emissão dos complexos é mais próximo do comprimento de onda do LTY (596 nm), o que evidencia o efeito de suas sobreposições nos estudos de colocação. Logo

não foi possível realizar estudos de colocalização com a utilização do LTY, uma vez que um marcador com emissão mais distante dos complexos é necessário.

Na Figura 38 são apresentadas imagens referentes aos complexos Ir3 e Ir3-H nas células HeLa. Como foi notado a inconsistência dos estudos de colocalização com a utilização do LTY, as marcações com os complexos Ir3 e Ir3-H foram realizadas com o acréscimo apenas do To-Pro-3.

Figura 38. Imagens obtidas por microscopia confocal para marcação com os complexos Ir3 e Ir3-H.



Observa-se que este par conjugado apresentou menor emissão quando incorporado nas células HeLa, apesar de estarem localizados em regiões parecidas com os demais complexos mostrados anteriormente. A menor intensidade de sinal para este par conjugado é esperada uma vez que este sistema possui menor ϵ , o que prejudicou a avaliação de sua marcação com um laser excitação no visível (488 nm).

Portanto nota-se que assim como tem sido relatado por outras comunicações, os complexos bis-heterolépticos de Ir(III) são fortes candidatos para biomarcação de células assim como mostram boa especificidade para marcação compartimentalizada nas células (ZHAO et al., 2010). Neste trabalho, foi evidenciado a ótima incorporação celular que estes complexos de Ir(III) possuem frente as células HeLa além de apresentar imagens de microscopia

confocal que sugerem a localização destes complexos distribuída pelo citoplasma e com potencial especificidade para marcação de lisossomos.

5. CONCLUSÕES

Os seis complexos bis-heterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2-piridil)benzimidazol como ligante auxiliar foram sintetizados com adequada pureza conforme evidenciado pelas técnicas de ^1H RMN, CHN e DRX de monocristal. Seus comportamentos fotofísicos foram estudados em meio fluido e rígido no qual notou-se que a adição e remoção do próton imidazólico do ligante auxiliar causa mudanças significativas em seus máximos de emissão. Foi possível observar emissores $^3\text{MLCT}$ (Ir1-H, Ir3-H e Ir3) e ^3IL (Ir1, Ir2 e Ir2-H), com destaque para o par conjugado Ir1/Ir1-H, em que o grau de protonação leva a grandes alterações fotofísicas em soluções fluidas a temperatura ambiente, mudando inclusive a natureza do estado emissor.

Os complexos Ir2/Ir2-H são ambos emissores ^3IL no qual apresentaram os menores Φ_{em} dentre todos os complexos, ao passo que para o par conjugado Ir3/Ir3-H, ambos mostraram emissões $^3\text{MLCT}$, apresentando os maiores Φ_{em} dentre os complexos estudados. Notou-se com base nos dados de TD-DFT que a protonação do ligante imidazol, nestes dois pares conjugados, causa uma aproximação energética de seus estados tripleto excitados, fazendo com que os complexos Ir2-H e Ir3-H apresentem menores Φ_{em} que seus pares conjugados. O aumento de densidade eletrônica nos ligantes C^N mostrou estabilizar emissões ^3IL diminuindo os Φ_{em} , ao passo que menores ligantes C^N aumentam o caráter $^3\text{MLCT}$ do estado emissor e seus Φ_{em} . Os experimentos de emissão com variação de temperatura mostraram a existência de processos não-radiativos complexos para serem estudados sem o auxílio de outras técnicas resolvidas no tempo, dos quais estudos futuros poderão contribuir para elucidação e racionalização destes processos.

A avaliação do potencial destes complexos como biomarcadores foi realizada por meio de experimentos com células HeLa no qual estes ensaios revelaram que os complexos testados são bons candidatos para biomarcação de células, mostrando luminescência significativa sobre o citoplasma celular, além de mostrarem ótimos %uptake, adequada estabilidade para marcação

celular e ausência de danos na morfologia celular que sugerem baixas toxicidades destes complexos nas condições avaliadas neste trabalho. Notou-se que estruturas menores tendem a aumentar significativamente os %uptake, no qual o complexo Ir3 apresentou maior incorporação entre os demais (42%). Entretanto notou-se que o aumento do ϵ nestas estruturas exerce papel importante para aquisição de boas imagens, logo os complexos Ir2/Ir2-H por possuírem maior insaturação mostraram marcação mais intensa. De acordo com os dados de microscopia confocal os complexos estudados não apresentam grandes diferenças na colocalização entre eles dos quais poderão ser mais explorados em trabalhos futuros.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Demais estudos fotofísicos com a utilização de técnicas resolvidas no tempo poderão ser realizados para compreender os processos não-radiativos envolvidos em cada complexo e caracterizá-los quanto às suas constantes de velocidade e sua dependência com a temperatura.

Estudos futuros com a utilização de marcadores comerciais de lisossomos cujo seus espectros de absorção e emissão sejam mais distantes dos complexos avaliados como potenciais biomarcadores poderão ser realizados com o objetivo de avaliar com maior precisão a colocalização destes complexos sobre marcadores comerciais específicos para lisossomos podendo discutir sobre possíveis variações da marcação compartimentalizada sobre os lisossomos entre os diferentes complexos estudados.

7. APÊNDICE

A. Espectros de ^1H - ^1H COSY em DMSO d^6 dos complexos Ir1, Ir1-H, Ir2 e Ir2-H, 400 MHz.

Figura A1. Espectro de ^1H - ^1H COSY em DMSO d^6 do complexo Ir1, 400 MHz.

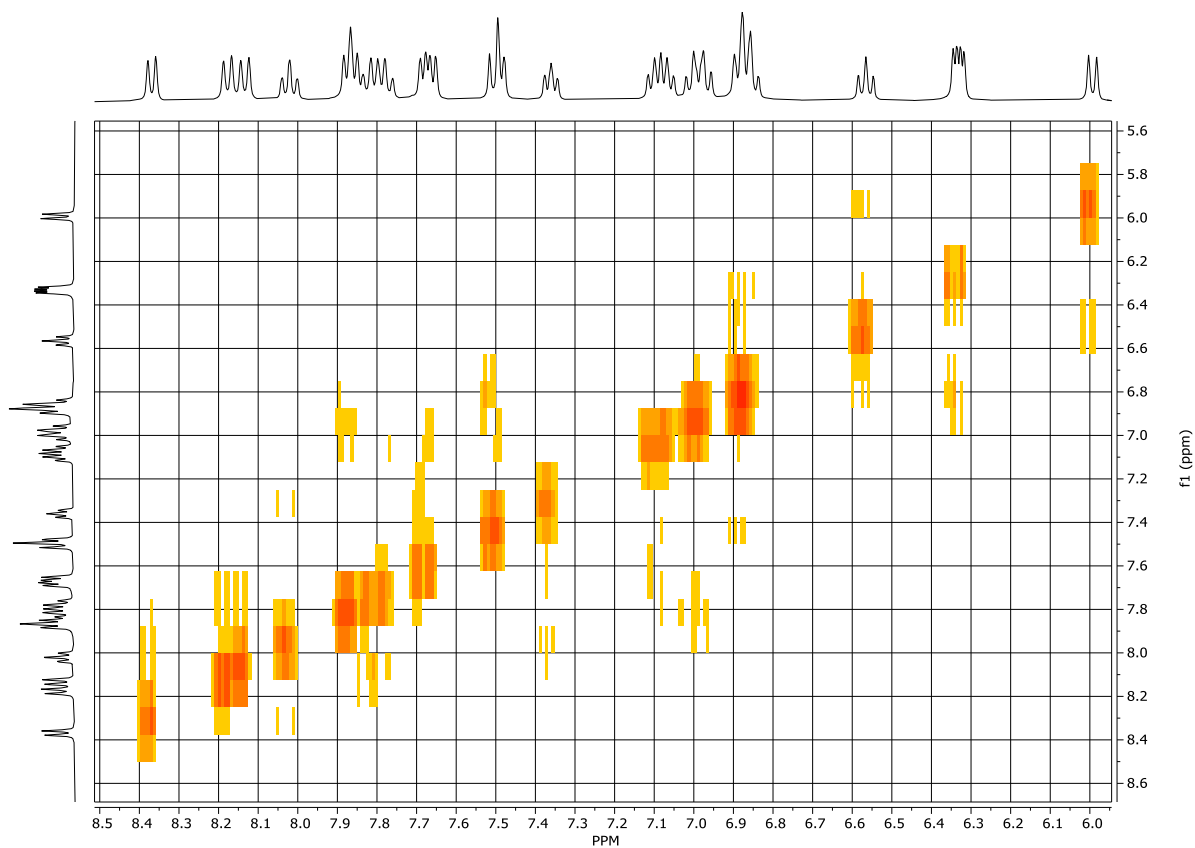


Figura A2. Espectro de ^1H - ^1H COSY em $\text{DMSO } d^6$ do complexo Ir1-H, 400 MHz.

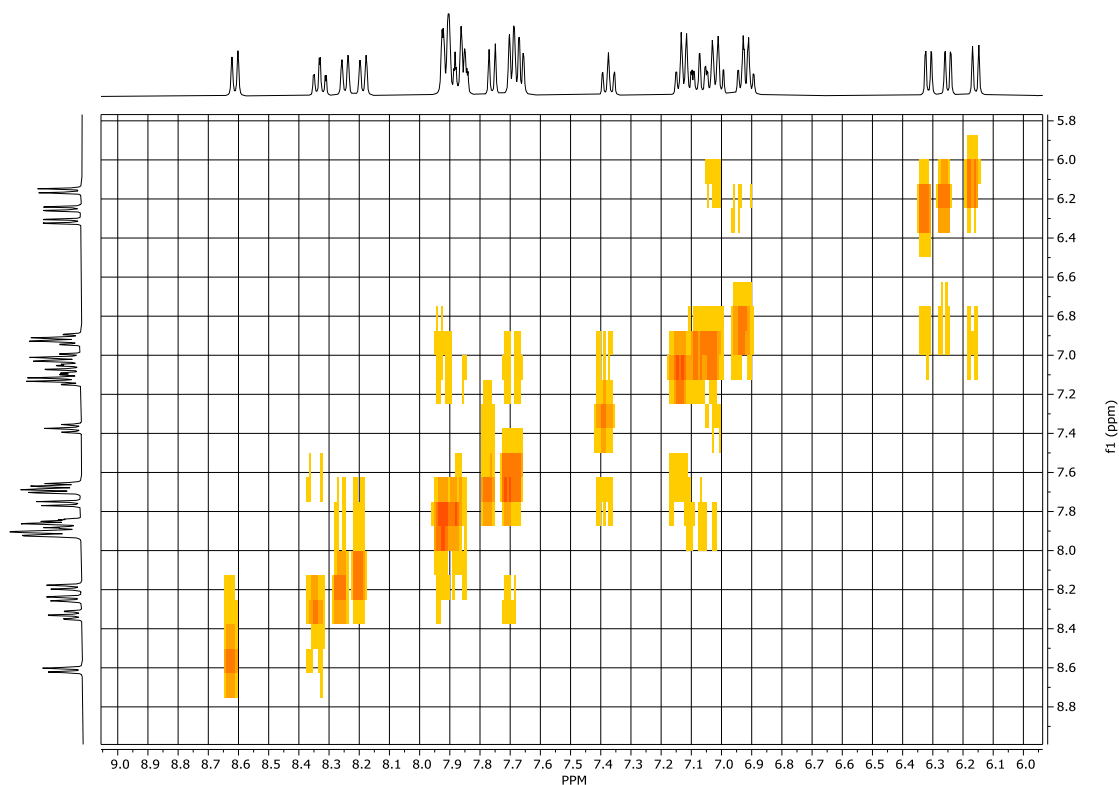


Figura A3. Espectro de ^1H - ^1H COSY em $\text{DMSO } d^6$ do complexo Ir2, 400 MHz.

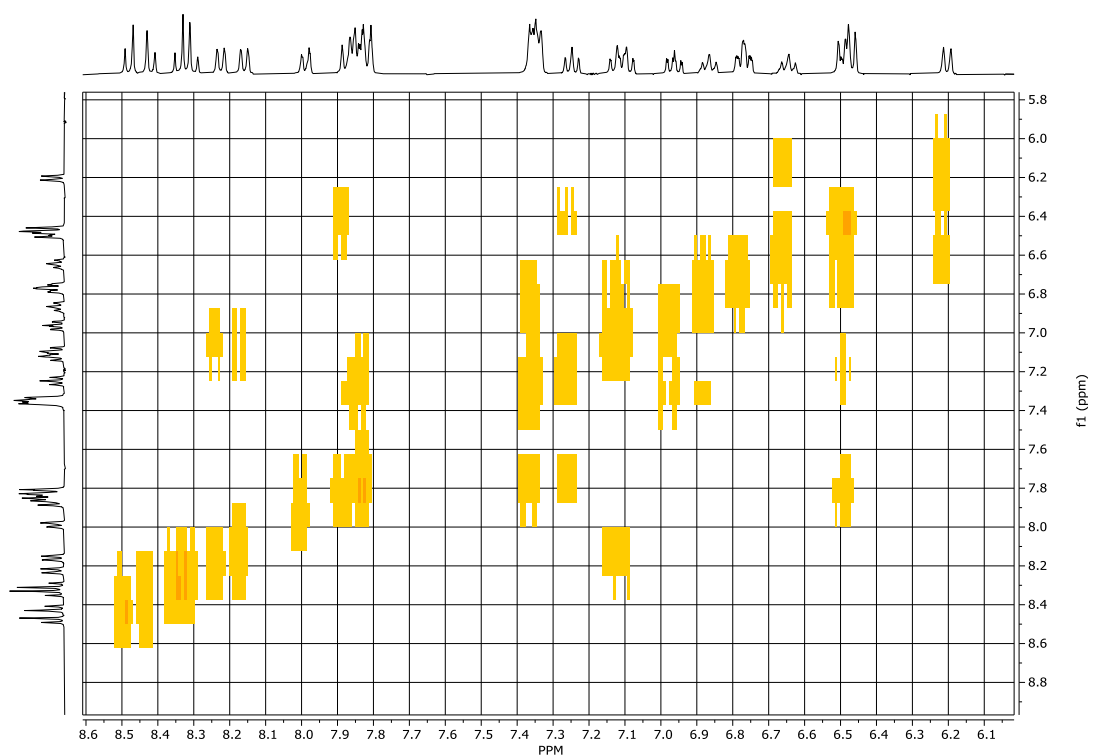
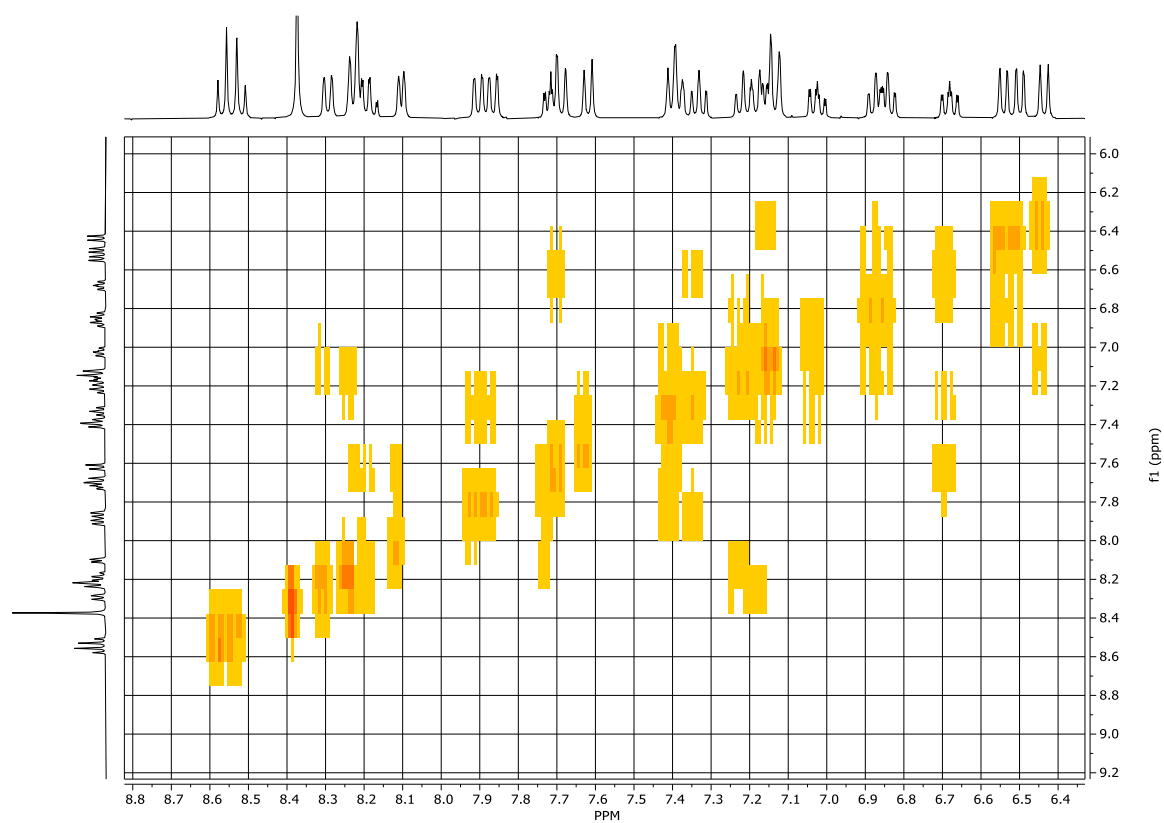


Figura A4. Espectro de ^1H - ^1H COSY em $\text{DMSO } d^6$ do complexo Ir2-H, 400 MHz.



B. Espectros de absorção no UV-VIS (experimental) com suas respectivas forças de osciladores teóricas otimizadas por DFT-TD em CH₃CN.

Figura B1. Espectro de absorção na região UV-VIS do complexo Ir1 em CH₃CN.

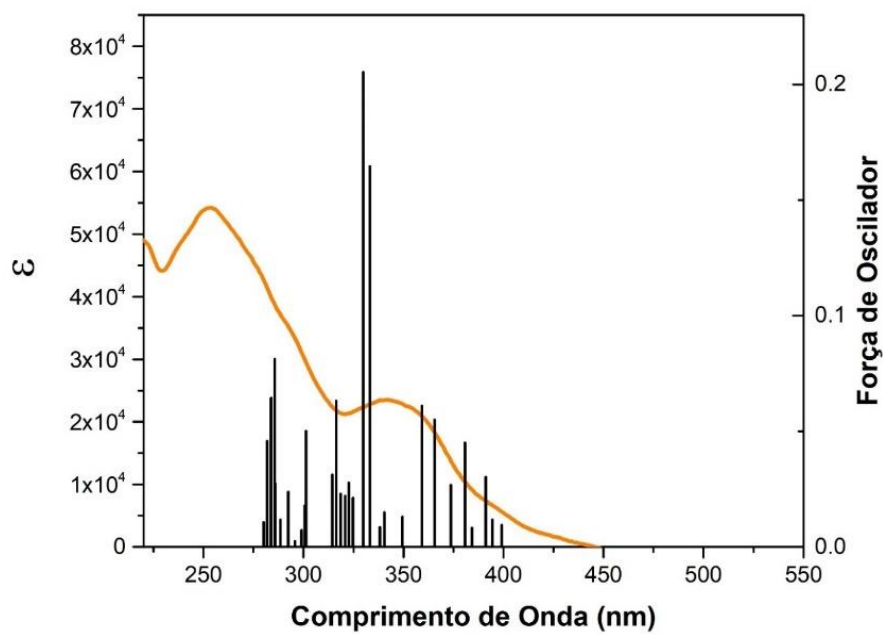


Figura B2. Espectro de absorção na região UV-VIS do complexo Ir1-H em CH₃CN.

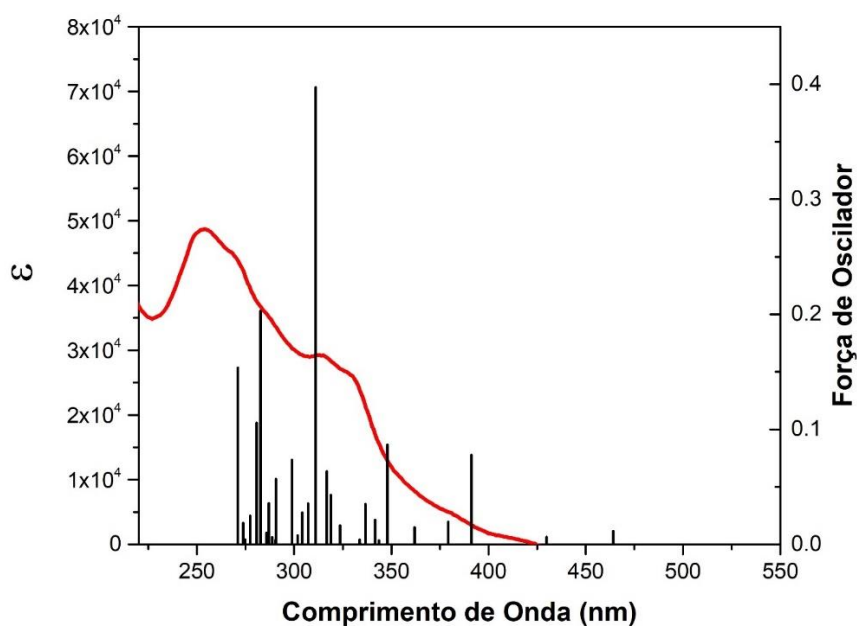


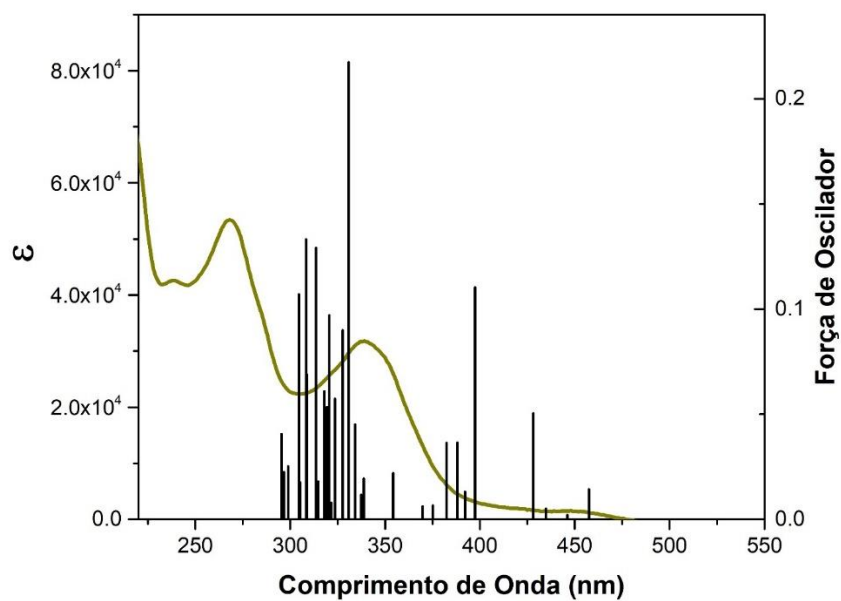
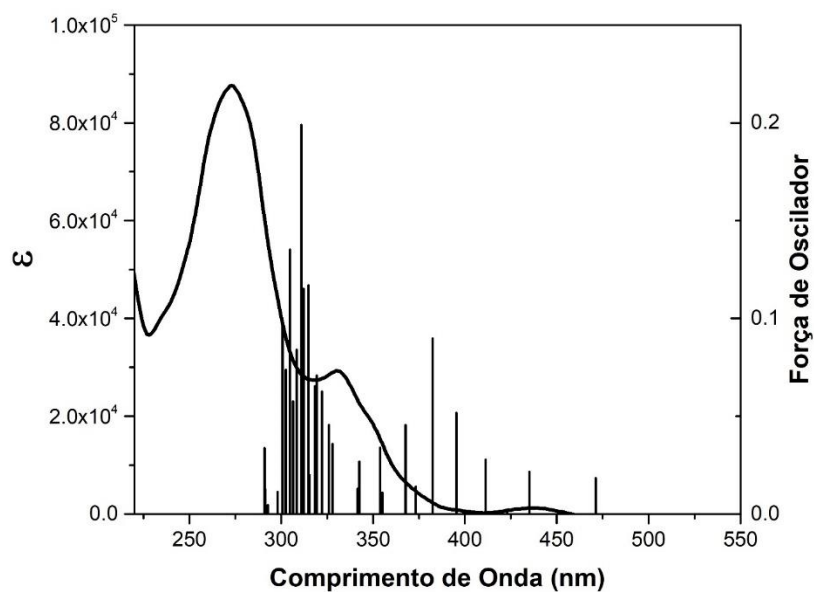
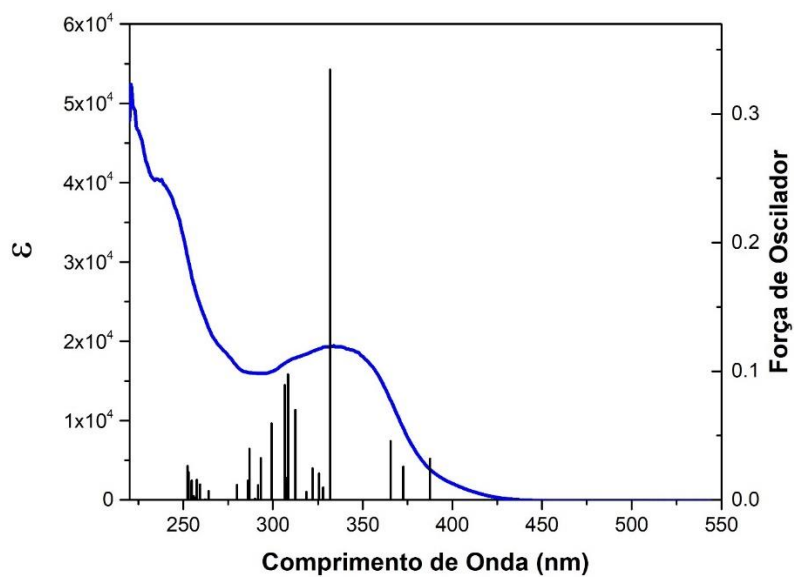
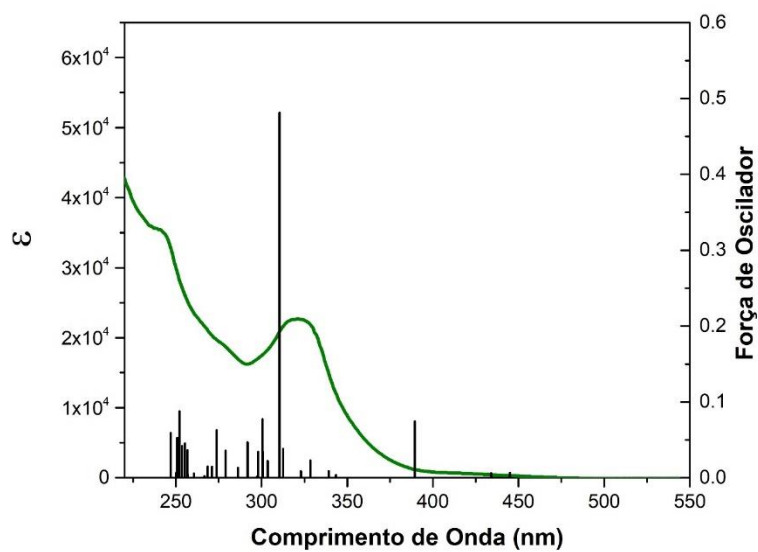
Figura B3. Espectro de absorção na região UV-VIS do complexo Ir2 em CH₃CN.**Figura B4.** Espectro de absorção na região UV-VIS do complexo Ir2-H em CH₃CN.

Figura B5. Espectro de absorção na região UV-VIS do complexo Ir3 em CH₃CN.**Figura B6.** Espectro de absorção na região UV-VIS do complexo Ir3-H em CH₃CN.

C. DADOS CRISTALOGRAFICOS.

Tabela C1. Dados cristalográficos do complexo Ir3-H.

Fórmula Empírica	$C_{31}H_{27}N_7OPF_6Ir$	
Massa molar ($g \cdot mol^{-1}$)	850,76	
Temperatura de coleta (K)	200(2)	
Comprimento de Onda (Å)	0,71073	
Sistema Cristalino	Monoclínico	
Grupo Espacial	$P2_1/n$	
Parâmetros da cela unitária	$a = 15,0906(6)$ Å	$\alpha = 90,000(5)^\circ$.
	$b = 13,0560(13)$ Å	$\beta = 110,89^\circ$.
	$c = 17,144$ Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume (Å ³)	3155, 8(3)	
Z	4	
Densidade calculada ($mg \cdot m^{-3}$)	1,791	
Coefficiente de absorção (mm^{-1})	4,355	
F(000)	1664	
Intervalo de Θ (°)	4,728 até 29,342	
Intervalo de hkl	-20 a 20	
	-17 a 17	
	-23 a 21	
Reflexões coletadas	24390	
Reflexões únicas (R_{int})	8487 [$R_{int} = 0,0974$]	
Completude para $\Theta = 25,242^\circ$	99,2 %	
Coefficiente de transmissão máx.; min.	0,6641 e 0,3953	
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa em F^2	
Qualidade do fit em F^2	0,985	
R [$I > 2\sigma(I)$]; wR	R1 = 0,0542, wR2 = 0,1322	
R (todos os dados), wR	R1 = 0,0811, wR2 = 0,1440	
Coefficiente de Extinção	0,0076(5)	
$\Delta\rho_{máx}; \Delta\rho_{min}$ (e. Å ⁻³)	2,214; -2,655	

Tabela C2. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópicos equivalentes (Å² $\times 10^3$) para piar. U(eq) é definido como um terço do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.

	x	y	z	U(eq)
P(1)	2277(2)	5303(2)	8960(2)	67(1)

C(12)	5746(6)	5594(6)	8433(6)	61(2)
O(1S)	2600(5)	8259(7)	8566(5)	86(2)
C(1S)	1870(9)	8417(13)	7855(10)	122(5)
IR1	7072(1)	8673(1)	8704(1)	37(1)
C(5)	4028(6)	10959(6)	9042(5)	54(2)
N(3)	7760(4)	8465(4)	9938(4)	41(1)
N(1)	5863(4)	9303(4)	8891(4)	41(1)
N(6)	7185(5)	8731(4)	7072(4)	47(1)
N(5)	6575(4)	8958(4)	7470(3)	40(1)
N(2)	6138(4)	7370(4)	8561(4)	39(1)
C(40)	8101(4)	7988(5)	8380(5)	41(2)
C(30)	7924(4)	9932(5)	8958(4)	37(1)
C(31)	8842(5)	7391(6)	8839(5)	49(2)
C(2)	5980(6)	11186(5)	9260(5)	49(2)
C(9)	5280(5)	7575(5)	8602(5)	45(2)
C(13)	6361(6)	6387(6)	8476(5)	52(2)
C(1)	5529(5)	10254(6)	9036(4)	44(2)
N(4)	8405(4)	9217(5)	10323(4)	53(2)
C(33)	9413(6)	7247(6)	7699(6)	61(2)
C(8)	5151(5)	8658(5)	8751(4)	42(1)
C(6)	4572(5)	10124(6)	8939(5)	47(2)
N(7)	4353(4)	9113(5)	8762(4)	46(1)
C(22)	8507(7)	8036(7)	11260(5)	66(2)
C(4)	4486(6)	11886(6)	9255(5)	55(2)
C(3)	5450(6)	11997(6)	9367(5)	53(2)
C(11)	4868(6)	5817(7)	8473(7)	68(2)
C(21)	7853(5)	7761(6)	10515(5)	50(2)
C(32)	9516(5)	7029(6)	8524(6)	54(2)
C(29)	8014(5)	10669(5)	8413(5)	46(2)
C(39)	5813(6)	9405(7)	6885(5)	59(2)
C(10)	4632(6)	6809(6)	8555(5)	53(2)
C(26)	9140(6)	10816(6)	10106(6)	67(2)
C(28)	8663(6)	11457(6)	8704(6)	59(2)
C(38)	5951(9)	9449(8)	6132(6)	82(3)
C(35)	7996(5)	8182(6)	7543(5)	46(2)
C(34)	8651(6)	7815(6)	7204(5)	57(2)
C(27)	9216(7)	11538(7)	9533(7)	71(2)

C(37)	6824(8)	9005(8)	6271(6)	74(3)
C(23)	8882(7)	8978(8)	11131(6)	69(2)
C(25)	8493(5)	10015(6)	9787(5)	51(2)
F(21)	2135(11)	4801(10)	9748(9)	106(3)
F(22)	1779(10)	4320(11)	8359(10)	106(3)
F(23)	3161(9)	4530(11)	9324(10)	106(3)
F(24)	2649(17)	5798(14)	8300(13)	106(3)
F(25)	2842(11)	6209(10)	9614(10)	106(3)
F(26)	1374(9)	5892(10)	8447(9)	106(3)
F(11)	1585(16)	5008(16)	9430(15)	112(4)
F(12)	1446(12)	4769(16)	8299(11)	112(4)
F(13)	2842(15)	4315(13)	8881(14)	112(4)
F(14)	2670(30)	5590(20)	8244(17)	112(4)
F(15)	3260(12)	5809(16)	9578(11)	112(4)
F(16)	1891(15)	6388(11)	9140(14)	112(4)

Tabela C3. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) do complexo Ir3-H.

P(1)-F(12)	1,527(15)
P(1)-F(26)	1,539(13)
P(1)-F(24)	1,570(18)
P(1)-F(11)	1,576(13)
P(1)-F(13)	1,579(15)
P(1)-F(14)	1,583(17)
P(1)-F(21)	1,583(14)
P(1)-F(16)	1,602(14)
P(1)-F(23)	1,611(14)
P(1)-F(15)	1,624(15)
P(1)-F(25)	1,643(15)
P(1)-F(22)	1,650(15)
C(12)-C(13)	1,375(11)
C(12)-C(11)	1,382(11)
O(1S)-C(1S)	1,336(14)
IR1-N(5)	2,010(5)
IR1-N(3)	2,016(6)
IR1-C(40)	2,032(5)
IR1-C(30)	2,036(6)

IR1-N(1)	2,127(5)
IR1-N(2)	2,167(5)
C(5)-C(4)	1,376(12)
C(5)-C(6)	1,413(10)
N(3)-C(21)	1,320(9)
N(3)-N(4)	1,373(9)
N(1)-C(8)	1,318(9)
N(1)-C(1)	1,395(9)
N(6)-C(37)	1,332(11)
N(6)-N(5)	1,361(7)
N(6)-C(35)	1,400(10)
N(5)-C(39)	1,359(10)
N(2)-C(13)	1,348(9)
N(2)-C(9)	1,348(8)
C(40)-C(31)	1,361(10)
C(40)-C(35)	1,410(10)
C(30)-C(25)	1,378(10)
C(30)-C(29)	1,380(9)
C(31)-C(32)	1,393(9)
C(2)-C(3)	1,377(10)
C(2)-C(1)	1,380(10)
C(9)-C(10)	1,381(10)
C(9)-C(8)	1,462(10)
C(1)-C(6)	1,404(9)
N(4)-C(23)	1,351(10)
N(4)-C(25)	1,426(10)
C(33)-C(34)	1,377(13)
C(33)-C(32)	1,397(12)
C(8)-N(7)	1,349(8)
C(6)-N(7)	1,368(10)
C(22)-C(21)	1,355(12)
C(22)-C(23)	1,404(13)
C(4)-C(3)	1,407(11)
C(11)-C(10)	1,364(12)
C(29)-C(28)	1,385(10)
C(39)-C(38)	1,380(12)
C(26)-C(27)	1,395(13)
C(26)-C(25)	1,402(11)

C(28)-C(27)	1,371(14)
C(38)-C(37)	1,380(14)
C(35)-C(34)	1,398(8)
F(26a)-P(1)-F(24)	81,5(10)
F(12b)-P(1)-F(11)	75,5(11)
F(12b)-P(1)-F(13)	83,6(11)
F(11b)-P(1)-F(13)	108,7(10)
F(12b)-P(1)-F(14)	87,9(14)
F(11b)-P(1)-F(14)	161,8(17)
F(13b)-P(1)-F(14)	76,3(13)
F(26a)-P(1)-F(21)	109,5(7)
F(24a)-P(1)-F(21)	167,7(11)
F(12b)-P(1)-F(16)	106,7(12)
F(11b)-P(1)-F(16)	76,4(10)
F(13b)-P(1)-F(16)	169,5(12)
F(14b)-P(1)-F(16)	101,8(12)
F(26a)-P(1)-F(23)	167,7(8)
F(24a)-P(1)-F(23)	94,5(10)
F(21a)-P(1)-F(23)	75,9(8)
F(12b)-P(1)-F(15)	170,9(9)
F(11b)-P(1)-F(15)	112,6(12)
F(13b)-P(1)-F(15)	89,6(11)
F(14b)-P(1)-F(15)	84,6(13)
F(16b)-P(1)-F(15)	79,9(11)
F(26a)-P(1)-F(25)	99,7(8)
F(24a)-P(1)-F(25)	87,9(9)
F(21a)-P(1)-F(25)	84,9(8)
F(23a)-P(1)-F(25)	91,7(7)
F(26a)-P(1)-F(22)	85,3(7)
F(24a)-P(1)-F(22)	94,0(9)
F(21a)-P(1)-F(22)	92,4(7)
F(23a)-P(1)-F(22)	83,4(7)
F(25a)-P(1)-F(22)	174,9(7)
C(13)-C(12)-C(11)	118,6(7)
N(5)-IR1-N(3)	171,3(2)
N(5)-IR1-C(40)	80,2(3)
N(3)-IR1-C(40)	94,0(3)
N(5)-IR1-C(30)	92,6(3)

N(3)-IR1-C(30)	80,5(3)
C(40)-IR1-C(30)	85,9(2)
N(5)-IR1-N(1)	93,9(2)
N(3)-IR1-N(1)	92,4(2)
C(40)-IR1-N(1)	172,2(3)
C(30)-IR1-N(1)	99,5(2)
N(5)-IR1-N(2)	92,4(2)
N(3)-IR1-N(2)	94,8(2)
C(40)-IR1-N(2)	98,8(2)
C(30)-IR1-N(2)	173,6(2)
N(1)-IR1-N(2)	76,3(2)
C(4)-C(5)-C(6)	116,9(7)
C(21)-N(3)-N(4)	105,7(6)
C(21)-N(3)-IR1	139,2(5)
N(4)-N(3)-IR1	114,8(4)
C(8)-N(1)-C(1)	106,1(5)
C(8)-N(1)-IR1	114,4(4)
C(1)-N(1)-IR1	139,1(4)
C(37)-N(6)-N(5)	110,9(7)
C(37)-N(6)-C(35)	133,2(6)
N(5)-N(6)-C(35)	115,5(5)
C(39)-N(5)-N(6)	105,6(6)
C(39)-N(5)-IR1	139,2(5)
N(6)-N(5)-IR1	115,0(4)
C(13)-N(2)-C(9)	118,4(6)
C(13)-N(2)-IR1	125,6(5)
C(9)-N(2)-IR1	115,9(4)
C(31)-C(40)-C(35)	117,5(6)
C(31)-C(40)-IR1	130,1(5)
C(35)-C(40)-IR1	112,3(5)
C(25)-C(30)-C(29)	117,9(6)
C(25)-C(30)-IR1	113,4(5)
C(29)-C(30)-IR1	128,7(5)
C(40)-C(31)-C(32)	122,3(7)
C(3)-C(2)-C(1)	117,6(7)
N(2)-C(9)-C(10)	121,8(7)
N(2)-C(9)-C(8)	113,0(6)
C(10)-C(9)-C(8)	125,1(6)

N(2)-C(13)-C(12)	122,2(7)
C(2)-C(1)-N(1)	131,3(6)
C(2)-C(1)-C(6)	121,6(6)
N(1)-C(1)-C(6)	107,1(6)
C(23)-N(4)-N(3)	110,8(7)
C(23)-N(4)-C(25)	133,8(7)
N(3)-N(4)-C(25)	115,2(6)
C(34)-C(33)-C(32)	120,1(6)
N(1)-C(8)-N(7)	113,0(6)
N(1)-C(8)-C(9)	120,0(5)
N(7)-C(8)-C(9)	127,1(6)
N(7)-C(6)-C(1)	107,4(6)
N(7)-C(6)-C(5)	131,9(7)
C(1)-C(6)-C(5)	120,7(7)
C(8)-N(7)-C(6)	106,4(6)
C(21)-C(22)-C(23)	106,4(7)
C(5)-C(4)-C(3)	121,6(7)
C(2)-C(3)-C(4)	121,6(7)
C(10)-C(11)-C(12)	119,7(7)
N(3)-C(21)-C(22)	111,6(7)
C(31)-C(32)-C(33)	119,3(7)
C(30)-C(29)-C(28)	120,1(7)
N(5)-C(39)-C(38)	109,8(8)
C(11)-C(10)-C(9)	119,2(7)
C(27)-C(26)-C(25)	116,7(9)
C(27)-C(28)-C(29)	121,4(8)
C(37)-C(38)-C(39)	105,9(8)
C(34)-C(35)-N(6)	122,5(7)
C(34)-C(35)-C(40)	121,5(7)
N(6)-C(35)-C(40)	115,9(5)
C(33)-C(34)-C(35)	119,1(7)
C(28)-C(27)-C(26)	120,3(8)
N(6)-C(37)-C(38)	107,8(7)
N(4)-C(23)-C(22)	105,4(8)
C(30)-C(25)-C(26)	123,5(8)
C(30)-C(25)-N(4)	116,1(6)
C(26)-C(25)-N(4)	120,4(8)

Tabela C4. Parâmetros de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para piaoir. O anisotrópico expoente do fator de deslocamento assume a forma: $-2p^2[h^2a^{*2}U^{11} + \dots + 2hk a^* b^* U^{12}]$.

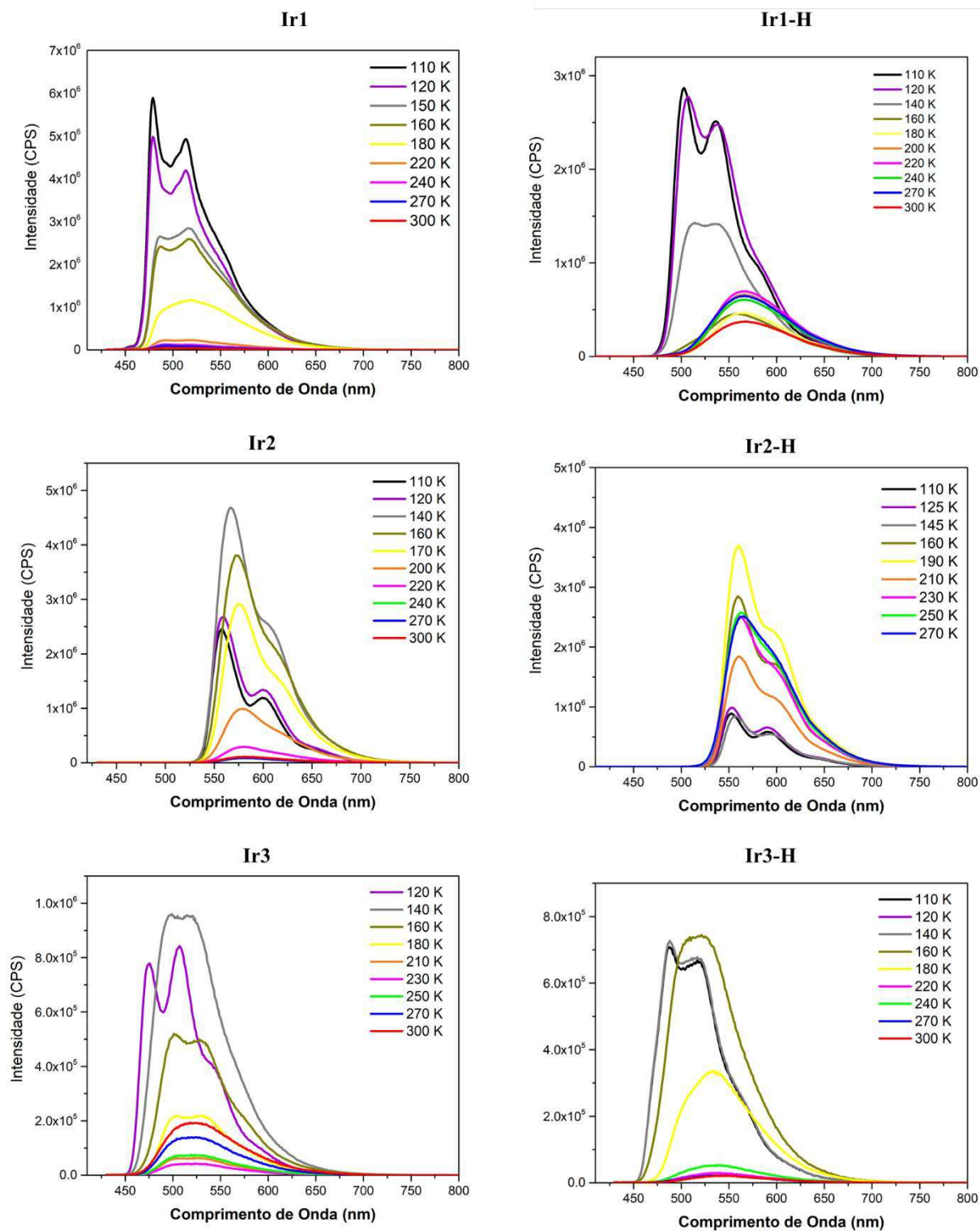
	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
P(1)	73(2)	57(1)	83(2)	4(1)	42(1)	-4(1)
C(12)	64(5)	42(4)	88(6)	-10(4)	39(5)	-2(4)
O(1S)	54(3)	98(5)	109(6)	23(5)	33(4)	-9(4)
C(1S)	84(8)	143(12)	117(12)	37(11)	11(8)	-16(8)
IR1	39(1)	40(1)	40(1)	0(1)	23(1)	0(1)
C(5)	58(4)	55(4)	58(5)	10(4)	33(4)	11(4)
N(3)	49(3)	42(3)	39(3)	-1(2)	25(2)	1(2)
N(1)	38(3)	51(3)	46(3)	3(3)	28(2)	7(2)
N(6)	63(4)	46(3)	39(3)	1(2)	29(3)	1(3)
N(5)	47(3)	42(3)	34(3)	-1(2)	18(2)	0(2)
N(2)	41(3)	38(3)	43(3)	-3(2)	21(2)	-6(2)
C(40)	36(3)	43(3)	58(4)	-9(3)	34(3)	1(3)
C(30)	39(3)	29(3)	49(4)	-8(3)	22(3)	-8(2)
C(31)	45(4)	50(4)	57(4)	-6(4)	27(3)	-3(3)
C(2)	55(4)	51(4)	52(4)	-1(3)	33(3)	3(3)
C(9)	48(4)	49(4)	46(4)	1(3)	27(3)	-1(3)
C(13)	51(4)	55(4)	58(4)	-4(4)	29(3)	-4(3)
C(1)	50(4)	52(4)	40(4)	4(3)	27(3)	5(3)
N(4)	56(3)	59(4)	45(3)	-1(3)	19(3)	-2(3)
C(33)	55(4)	62(5)	83(6)	-14(4)	47(4)	0(4)
C(8)	38(3)	49(4)	45(3)	8(3)	25(3)	4(3)
C(6)	48(4)	57(4)	50(4)	8(3)	32(3)	9(3)
N(7)	42(3)	50(3)	54(3)	1(3)	27(3)	3(3)
C(22)	81(6)	71(6)	46(4)	17(4)	24(4)	5(5)
C(4)	66(5)	54(4)	57(5)	6(4)	37(4)	15(4)
C(3)	72(5)	50(4)	53(4)	2(3)	40(4)	1(4)
C(11)	62(5)	51(5)	95(7)	-6(5)	34(5)	-17(4)
C(21)	56(4)	49(4)	53(4)	5(3)	30(3)	2(3)
C(32)	38(3)	58(4)	71(5)	-9(4)	25(3)	6(3)
C(29)	39(3)	50(4)	53(4)	-1(3)	23(3)	0(3)
C(39)	61(5)	62(5)	53(5)	9(4)	19(4)	16(4)

C(10)	54(4)	47(4)	63(5)	2(4)	29(4)	-2(3)
C(26)	70(5)	50(5)	72(6)	-2(4)	14(4)	-16(4)
C(28)	62(5)	42(4)	81(6)	2(4)	35(5)	-10(3)
C(38)	115(8)	83(7)	44(5)	7(5)	25(5)	29(6)
C(35)	48(4)	49(4)	52(4)	-9(3)	32(3)	-5(3)
C(34)	71(5)	55(4)	69(5)	-16(4)	54(4)	-8(4)
C(27)	70(6)	63(5)	74(6)	1(5)	20(5)	-21(4)
C(37)	124(8)	59(5)	57(5)	8(5)	54(5)	19(6)
C(23)	67(5)	80(6)	47(4)	2(5)	6(4)	-9(5)
C(25)	51(4)	50(4)	56(4)	-4(3)	25(3)	-5(3)
F(21)	107(5)	95(4)	125(5)	3(3)	53(4)	0(3)
F(22)	107(5)	95(4)	125(5)	3(3)	53(4)	0(3)
F(23)	107(5)	95(4)	125(5)	3(3)	53(4)	0(3)
F(24)	107(5)	95(4)	125(5)	3(3)	53(4)	0(3)
F(25)	107(5)	95(4)	125(5)	3(3)	53(4)	0(3)
F(26)	107(5)	95(4)	125(5)	3(3)	53(4)	0(3)
F(11)	127(7)	108(7)	135(8)	-3(5)	87(6)	-12(5)
F(12)	127(7)	108(7)	135(8)	-3(5)	87(6)	-12(5)
F(13)	127(7)	108(7)	135(8)	-3(5)	87(6)	-12(5)
F(14)	127(7)	108(7)	135(8)	-3(5)	87(6)	-12(5)
F(15)	127(7)	108(7)	135(8)	-3(5)	87(6)	-12(5)
F(16)	127(7)	108(7)	135(8)	-3(5)	87(6)	-12(5)

Tabela C5. Ligações de hidrogênio por piaoir [Å e °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(7)-H(7)...O(1S)	0,86	1,92	2,778(8)	174,5
O(1S)-H(1S)...F(25a)	0,82	2,39	3,172(15)	159,4
O(1S)-H(1S)...F(16b)	0,82	2,17	2,973(17)	165,0

D. ESPECTROS DE EMISSÃO ESTACIONÁRIA COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA.



E. CURVAS DE DECAIMENTO DE ESTADO EXCITADO EM CH₃CN NA PRESENÇA DE O₂

Figura E1. Curva de decaimento para os complexos Ir1 (laranja) e Ir1-H (vermelho).

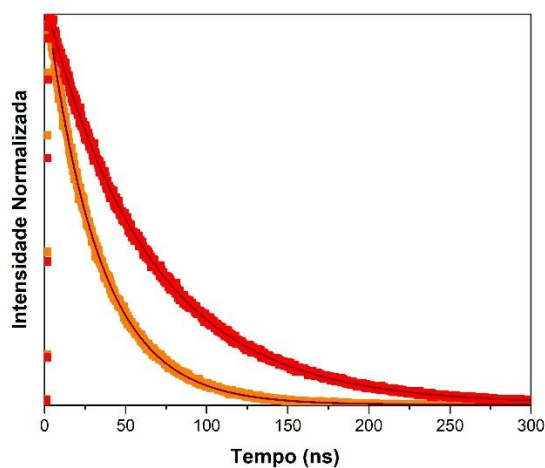


Figura E2. Curva de decaimento para os complexos Ir2 (amarelo) e Ir2-H (preto).

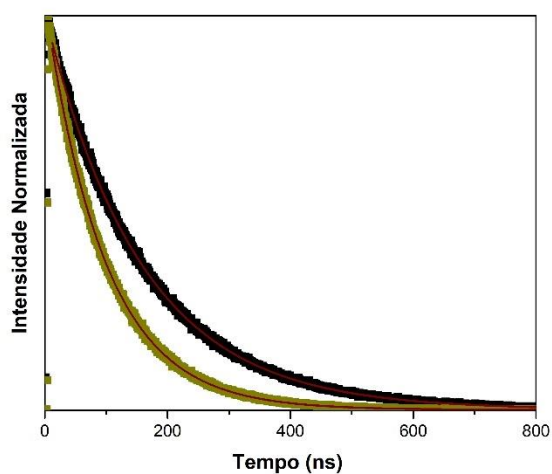
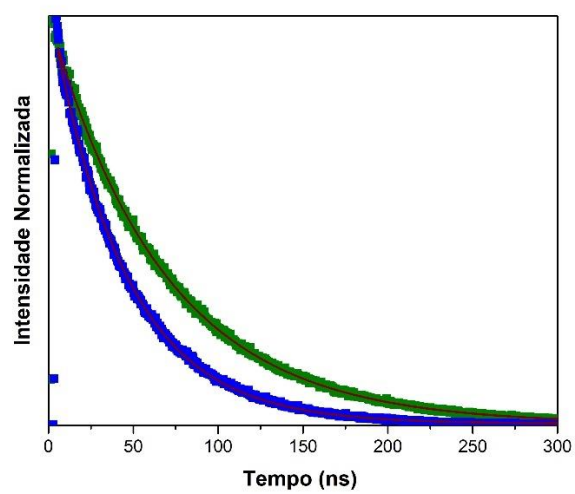


Figura E3. Curva de decaimento para os complexos Ir3 (azul) e Ir3-H (verde).



8. REFERÊNCIAS

BAI, R. et al. Blue-Emitting Iridium(III) Complexes for Light-Emitting Electrochemical Cells: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Advanced Functional Materials*Wiley-VCH Verlag, v. 30, n. 33, p. 1907169, 2020.

<https://doi.org/10.1002/adfm.201907169>

BARIGELLETTI, F. et al. Temperature dependence of the luminescence of cyclometalated palladium(II), rhodium(III), platinum(II), and platinum(IV) complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 27, n. 20, p. 3644-3647, 1988.

<https://doi.org/10.1021/ic00293a041>

BUFFETEAU, T. et al. Infrared Spectroscopy of Ionic Liquids: Quantitative Aspects and Determination of Optical Constants. v. 64, n. 1, p. 112-119, 2010.

<https://doi.org/10.1366/000370210790572089>

CHEN, Y. et al. Phosphorescent iridium(III) complexes as multicolor probes for specific mitochondrial imaging and tracking. *Biomaterials*, v. 35, n. 1, p. 2-13, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.051>

CHEN, Z. Q.; BIAN, Z. Q.; HUANG, C. H. Functional Ir(III) complexes and their applications. *Advanced Materials*, v. 22, n. 13, p. 1534-1539, 2010.

<https://doi.org/10.1002/adma.200903233>

CHI, Y.; CHOU, P. T. Transition-metal phosphors with cyclometalating ligands: Fundamentals and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 2, p. 638-655, 2010.

<https://doi.org/10.1039/B916237B>

DE ANGELIS, F. et al. Controlling phosphorescence color and quantum yields in cationic iridium complexes: A combined experimental and theoretical study. *Inorganic Chemistry*, v. 46, n. 15, p. 5989-6001, 2007.

<https://doi.org/10.1021/ic700435c>

DENNY, W. A.; REWCASTLE, G. W.; BAGULEY, B. C. Potential antitumor agents. 59. Structure-activity relationships for 2-phenylbenzimidazole-4-carboxamides, a new class of minimal DNA-intercalating agents which may not act via topoisomerase II. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, n. 2, p. 814-819, 1990.

<https://doi.org/10.1021/jm00164a054>

EL-SAYED VOL, M. A.; EL-SAYED, M. A. Its Radiative and Nonradiative Properties. *Accounts of chemical research*, v. 1, n. 1, p. 8-16, 1968.

<https://doi.org/10.1021/ar50001a002>

FAN, C.; YANG, C. Yellow/orange emissive heavy-metal complexes as phosphors in monochromatic and white organic light-emitting devices. *Chemical Society Reviews* Royal Society of Chemistry, v. 43, n. 17, p. 6439-6469, 2014.

<https://doi.org/10.1039/C4CS00110A>

FERNÁNDEZ-MOREIRA, V.; THORP-GREENWOOD, F. L.; COOGAN, M. P. Application of d6 transition metal complexes in fluorescence cell imaging. *Chemical Communications*, v. 46, n. 2, p. 186-202, 2010.

<https://doi.org/10.1039/B917757D>

FONSECA, T.; GIGANTE, B.; GILCHRIST, T. L. A short synthesis of phenanthro[2,3- d]imidazoles from dehydroabiatic acid. Application of the methodology as a convenient route to benzimidazoles. *Tetrahedron*, v. 57, n. 9, p. 1793-1799, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)01158-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)01158-3)

HAGER, G. D.; CROSBY, G. A. Charge-transfer excited states of ruthenium(II) complexes. I. Quantum yield and decay measurements. *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, n. 24, p. 7031-7037, 1975.

<https://doi.org/10.1021/ja00857a013>

HARDING, R. E. et al. Non-radiative decay mechanisms in blue phosphorescent iridium(III) complexes. *Organic Electronics*, v. 9, n. 3, p. 377-384, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.orgel.2008.01.009>

HOBRECKER, F. Ueber Reduktionsprodukte der Nitracetamidverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 5, n. 2, p. 920-924, 1872.

<https://doi.org/10.1002/cber.18720050295>

HUA-WEI LIU et al. Cyclometalated iridium(III) bipyridine complexes functionalized with an N-methylamino-oxy group as novel phosphorescent labeling reagents for reducing sugars. *Organometallics*, v. 29, n. 16, p. 3474-3476, 2010.

<https://doi.org/10.1021/om100597g>

KAMADA, K. et al. Photocatalytic CO₂ Reduction Using a Robust Multifunctional Iridium Complex toward the Selective Formation of Formic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, v. 142, n. 23, p. 10261-10266, 2020.

<https://doi.org/10.1021/jacs.0c03097>

KANDOTH, N. et al. Mechanisms of photoredox catalysts: The role of optical spectroscopy. *Sustainable Energy and Fuels*, v. 5, n. 3, p. 638-665, 2021.

<https://doi.org/10.1039/D0SE01454K>

KERI, R. S. et al. Comprehensive review in current developments of benzimidazole-based medicinal chemistry. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 86, n. 1, p. 799-845, 2015.

<https://doi.org/10.1111/cbdd.12462>

KESTELL, J. D. et al. Medium dependence of intramolecular vibrational modes coupled to MLCT transitions in metal polypyridyl complexes. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 106, n. 24, p. 5768-5778, 2002.

<https://doi.org/10.1021/jp0204758>

KIM, J. S. et al. Substituted 2,5'-Bi-1 H -benzimidazoles: Topoisomerase I Inhibition and Cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 992-998, 1996.

<https://doi.org/10.1021/jm950412w>

KOHARA, Y. et al. Synthesis and Angiotensin II Receptor Antagonistic Activities of Benzimidazole Derivatives Bearing Acidic Heterocycles as Novel Tetrazole Bioisosteres. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 26, p. 5228-5235, 1996.

<https://doi.org/10.1021/jm960547h>

KURAMOCHI, Y.; ISHITANI, O. Iridium(III) 1-Phenylisoquinoline Complexes as a Photosensitizer for Photocatalytic CO₂ Reduction: A Mixed System with a Re(I) Catalyst and a Supramolecular Photocatalyst. *Inorganic Chemistry*, v. 55, n. 11, p. 5702-5709, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00777>

KURAMOCHI, Y.; ISHITANI, O. An Ir(III) Complex Photosensitizer With Strong Visible Light Absorption for Photocatalytic CO₂ Reduction. *Frontiers in Chemistry*, v. 7, p. 259, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00259>

LADOUCEUR, S.; FORTIN, D.; ZYSMAN-COLMAN, E. Role of substitution on the photophysical properties of 5,5'-diaryl-2,2'-bipyridine (bpy*) in [Ir(ppy)₂(bpy*)]PF₆ complexes: A combined experimental and theoretical study. *Inorganic Chemistry*, v. 49, n. 12, p. 5625-5641, 2010.

<https://doi.org/10.1021/ic100521t>

LAPLANTE, S. R. et al. Binding Mode Determination of Benzimidazole Inhibitors of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase by a Structure and Dynamics Strategy. *Angewandte Chemie*, v. 116, n. 33, p. 4406-4411, 2004.

<https://doi.org/10.1002/ange.200460326>

LEUNG, C. W. T. et al. A photostable AIE luminogen for specific mitochondrial imaging and tracking. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n. 1, p. 62-65, 2013.

<https://doi.org/10.1021/ja310324q>

LIU, Z.; BIAN, Z.; HUANG, C. Luminescent iridium complexes and their applications. *Topics in Organometallic Chemistry*, v. 28, p. 113-142, 2010.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-01866-4_4

LO, K. K.-W.; NG, D. C.-M.; CHUNG, C.-K. First Examples of Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Complexes as Labeling Reagents for Biological Substrates. *Organometallics*, v. 20, n. 24, p. 4999-5001, 2001.

<https://doi.org/10.1021/om010652b>

LO, S. C. et al. Blue phosphorescence from iridium(III) complexes at room temperature. *Chemistry of Materials*, v. 18, n. 21, p. 5119-5129, 2006.

<https://doi.org/10.1021/cm061173b>

LORENTE, P. et al. ¹H/¹⁵N NMR chemical shielding, dipolar ¹⁵N,²H coupling and hydrogen bond geometry correlations in a novel series of hydrogen-bonded

acid-base complexes of collidine with carboxylic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 39, n. S1, p. S18-S29, 2001.

<https://doi.org/10.1002/mrc.946>

LOWRY, M. S. et al. Single-Layer Electroluminescent Devices and Photoinduced Hydrogen Production from an Ionic Iridium(III) Complex. *Chemistry of materials*, v. 17, n. 23, p. 5712-5719, 2005.

<https://doi.org/10.1021/cm051312+>

LOWRY, M. S.; BERNHARD, S. Synthetically tailored excited states: Phosphorescent, cyclometalated iridium(III) complexes and their applications. *Chemistry - A European Journal*, v. 12, n. 31, p. 7970-7977, 2006.

<https://doi.org/10.1002/chem.200600618>

MARTÍNEZ-ALONSO, M. et al. Highly Stable and Efficient Light-Emitting Electrochemical Cells Based on Cationic Iridium Complexes Bearing Arylazole Ancillary Ligands. *Inorganic Chemistry*, v. 56, n. 17, p. 10298-10310, 2017.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01167>

MEIER, S. B. et al. Dynamic doping in planar ionic transition metal complex-based light-emitting electrochemical cells. *Advanced Functional Materials*, v. 23, n. 28, p. 3531-3538, 2013.

<https://doi.org/10.1002/adfm.201202689>

MEYER, T. J. Photochemistry of metal coordination complexes: metal to ligand charge transfer excited states *Pure and Applied Chemistry*, v. 58, n. 9, p. 1193-1206, 1986.

<https://doi.org/10.1351/pac198658091193>

MIGAWA, M. T. et al. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of α -Nucleosides: D- and L-Isomers of Lyxofuranosyl- and (5-Deoxylyxofuranosyl)benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 8, p. 1242-1251, 1998.

<https://doi.org/10.1021/jm970545c>

MURPHY, L. et al. The time domain in co-stained cell imaging: Time-resolved emission imaging microscopy using a protonatable luminescent iridium complex. *Chemical Communications*, v. 46, n. 46, p. 8743-8745, 2010.

<https://doi.org/10.1039/c0cc03705b>

NEVE, F. et al. Cationic cyclometalated iridium luminophores: Photophysical, redox, and structural characterization. *Organometallics*, v. 23, n. 24, p. 5856-5863, 2004.

<https://doi.org/10.1021/om049493x>

NEVE, F.; CRISPINI, A. Metal-Containing Amphiphiles: Orthometallated Iridium(III) Complexes with Substituted 6-Phenyl-2,2-bipyridines. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 2000, n. 5, p. 1039-1043, 2000.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(200005\)2000:5<1039::AID-EJIC1039>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(200005)2000:5<1039::AID-EJIC1039>3.0.CO;2-2)

NONOYAMA, M. Benzo[h]quinolin-10-yl- N Iridium(III) Complexes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 47, n. 3, p. 767-768, 1974.

<https://doi.org/10.1246/bcsj.47.767>

NOZAKI, K. Theoretical Studies on Photophysical Properties and Mechanism of Phosphorescence in [fac-Ir(2-phenylpyridine) ₃]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 53, n. 1, p. 101-112, 2006

<https://doi.org/10.1002/jccs.200600013>

OHSAWA, Y. et al. Electrochemistry and Spectroscopy of Ortho-Metalated Complexes of Ir(III) and Rh(III). *Journal of Physical Chemistry*, v. 91, n. 5, p. 1047-1054, 1987.

<https://doi.org/10.1021/j100289a009>

ORSELLI, E. et al. Blue-emitting iridium complexes with substituted 1,2,4-triazole ligands: Synthesis, photophysics, and devices. *Inorganic Chemistry*, v. 46, n. 26, p. 11082-11093, 2007.

<https://doi.org/10.1021/ic701110p>

ORSELLI, E. et al. 1,2,3-Triazolyl-pyridine derivatives as chelating ligands for blue iridium(III) complexes. Photophysics and electroluminescent devices. *Journal of Materials Chemistry*, v. 18, n. 38, p. 4579-4590, 2008.

<https://doi.org/10.1039/b805324c>

PABBA, C. et al. Microwave-assisted synthesis of 1-aryl-1H-indazoles via one-pot two-step Cu-catalyzed intramolecular N-arylation of arylhydrazones. *Tetrahedron Letters*, v. 46, n. 44, p. 7553-7557, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.08.143>

PAVIA, D. L. et al. *Introdução à espectroscopia: Tradução da 4a edição norte-americana*. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

POLO, A. S. *Sistemas químicos integrados via complexos de rênio(I) e rutênio(II) na conversão de energia*. 2007, Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PORCARI, A. R. et al. Design, Synthesis, and Antiviral Evaluations of 1-(Substituted benzyl)-2-substituted-5,6-dichlorobenzimidazoles as Nonnucleoside Analogues of 2,5,6-Trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 8, p. 1252-1262, 1998.

<https://doi.org/10.1021/jm970559i>

RAMOS, C. L. et al. Temperature Dependent Emission Properties of Rel Tricarbonyl Complexes with Dipyrido-Quinoxaline and Phenazine Ligands. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 33, n. 5, p. 425-436, 2022.

<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210161>

REDDY, M. L. P.; BEJOYMOHANDAS, K. S. Evolution of 2, 3'-bipyridine class of cyclometalating ligands as efficient phosphorescent iridium(III) emitters for applications in organic light emitting diodes. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* v. 29, p. 29-47, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2016.10.001>

ROTH, T. et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Nonnucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. 2-Aryl-Substituted Benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, n. 26, p. 4199-4207, 1997.

<https://doi.org/10.1021/jm970096g>

SAJOTO, T. et al. Temperature dependence of blue phosphorescent cyclometalated Ir(III) complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 28, p. 9813-9822, 2009.

<https://doi.org/10.1021/ja903317w>

SCHNECKENBURGER, H. et al. Autofluorescence Lifetime Imaging of Cultivated Cells Using a UV Picosecond Laser Diode. *Journal of Fluorescence*, v. 14, n. 5, p. 649-654, 2004.

<https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000039351.09916.cc>

SUN, H. et al. Smart responsive phosphorescent materials for data recording and security protection. *Nature Communications*, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.

<https://doi.org/10.1038/ncomms4601>

TAMAYO, A. B. et al. Synthesis and characterization of facial and meridional tris-cyclometalated Iridium(III) complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 24, p. 7377-7387, 2003.

<https://doi.org/10.1021/ja034537z>

TAMM, I.; SEHGAL, P. B. Halobenzimidazole Ribosides and RNA Synthesis of Cells and Viruses. *Advances in Virus Research*, v. 22, p. 187-258, 1978.

[https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60775-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60775-7)

TANG, K. C.; LIU, K. L.; CHEN, I. C. Rapid intersystem crossing in highly phosphorescent iridium complexes. *Chemical Physics Letters*, v. 386, n. 4-6, p. 437-441, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.01.098>

TORRES-GÓMEZ, H. et al. Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, n. 11, p. 3147-3151, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.009>

TSAI, H. R. et al. Metal-ligand bonding strength of fluoro-substituted cyclometalated iridium(III) complexes from Raman and infrared spectra. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 115, n. 34, p. 17163-17174, 2011.

<https://doi.org/10.1021/jp204130a>

TSUBOI, T.; HUANG, W. Recent advances in multicolor emission and color tuning of heteroleptic iridium complexes. *Israel Journal of Chemistry*. v. 54, n. 7, p. 885-896, 2014.

<https://doi.org/10.1002/ijch.201400050>

VALDEZ, J. et al. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 12, n. 16, p. 2221-2224, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00346-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00346-3)

VALORE, A. et al. Cyclometalated Ir(III) complexes with substituted 1,10-phenanthrolines: A new class of efficient cationic organometallic second-order NLO chromophores. *Chemistry - A European Journal*, v. 16, n. 16, p. 4814-4825, 2010.

<https://doi.org/10.1002/chem.200902788>

VAN HOUTEN, J.; WATTS, R. J. Temperature dependence of the photophysical and photochemical properties of the tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ion in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, v. 98, n. 16, p. 4853-4858, 1976.

<https://doi.org/10.1021/ja00432a028>

WALLACE, M. B. et al. Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, n. 7, p. 2362-2367, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.02.071>

WANG, F. X. et al. Dual Functions of Cyclometalated Iridium(III) Complexes: Anti-Metastasis and Lysosome-Damaged Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 9, n. 49, p. 42471-42481, 2017.

<https://doi.org/10.1021/acsami.7b10258>

WANG, X. Y.; DEL GUERZO, A.; SCHMEHL, R. H. Photophysical behavior of transition metal complexes having interacting ligand localized and metal-to-ligand

charge transfer states. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, v. 5, n. 1, p. 55-77, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2004.01.002>

WHANG, D. R.; SAKAI, K.; PARK, S. Y. Highly efficient photocatalytic water reduction with robust iridium(III) photosensitizers containing arylsilyl substituents. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 52, n. 44, p. 11612-11615, 2013.

<https://doi.org/10.1002/anie.201305684>

WORLD, L. A. et al. Photophysical Properties of Polypyridyl Carbonyl Complexes of Rhenium(I). *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, n. S, p. 849-858, 1991.

<https://doi.org/10.1039/dt9910000849>

YANG, C. H. et al. Heteroleptic cyclometalated iridium(III) complexes displaying blue phosphorescence in solution and solid state at room temperature. *Inorganic Chemistry*, v. 44, n. 22, p. 7770-7780, 2005.

<https://doi.org/10.1021/ic050311g>

YANG, C. H. et al. Deep-blue-emitting heteroleptic iridium(III) complexes suited for highly efficient phosphorescent OLEDs. *Chemistry of Materials*, v. 24, n. 19, p. 3684-3695, 2012.

<https://doi.org/10.1021/cm3010453>

YANG, L. et al. Syntheses and phosphorescent properties of blue emissive iridium complexes with tridentate pyrazolyl ligands. *Inorganic Chemistry*, v. 47, n. 16, p. 7154-7165, 2008.

<https://doi.org/10.1021/ic800196s>

YANG, Y. et al. Luminescent chemodosimeters for bioimaging. *Chemical Reviews*, v. 113, n. 1, p. 192-270, 2013.

<https://doi.org/10.1021/cr2004103>

YEH, Y. S. et al. A new family of homoleptic Ir(III) complexes: Tris-pyridyl azolate derivatives with dual phosphorescence. *ChemPhysChem*, v. 7, n. 11, p. 2294-2297, 2006.

<https://doi.org/10.1002/cphc.200600461>

YERSIN, H.; HUMBS, W.; STRASSER, I. Characterization of Excited Electronic and Vibronic States of Platinum Metal Compounds with Chelate Ligands by Highly Frequency-Resolved and Time-Resolved Spectra. *Electronic and Vibronic Spectra of Transition Metal Complexes II*, p. 153-249, 1997.

<https://doi.org/10.1007/BFb0119213>

ZANONI, K. P. S. et al. Blue-green iridium(III) emitter and comprehensive photophysical elucidation of heteroleptic cyclometalated iridium(III) complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 53, n. 8, p. 4089-4099, 2014.

<https://doi.org/10.1021/ic500070s>

ZANONI, K. P. S. et al. Ir(III) complexes designed for light-emitting devices: Beyond the luminescence color array. *Dalton Transactions*, v. 44, n. 33, p. 14559-14573, 2015.

<https://doi.org/10.1039/C5DT01644D>

ZARRINMAYEH, H. et al. Synthesis and Evaluation of a Series of Novel 2-[(4-Chlorophenoxy)methyl]- benzimidazoles as Selective Neuropeptide Y Y1 Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 15, p. 2709-2719, 1998.

<https://doi.org/10.1021/jm9706630>

ZHAO, Q. et al. Cationic iridium(III) complexes with tunable emission color as phosphorescent dyes for live cell imaging. *Organometallics*, v. 29, n. 5, p. 1085-1091, 2010. <https://doi.org/10.1021/om900691r>

ZHAO, Q.; HUANG, H.; LI, F. Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 5, p. 2508-2524, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0cs00114g>

ZYSMAN-COLMAN, E. Iridium (III) : in optoelectronic and photonics applications. John Wiley & Sons, 2017. <https://doi.org/10.1002/9781119007166>