



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã. CEP 38304-402, Ituiutaba / MG

**EVELYN CHRISTINE DE SOUZA ARANTES**

**COMPLEXOS DE RUTÊNIO TIPO  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bd})(\text{tpy})\text{L}](\text{PF}_6)_n$  ( $\text{L} = \text{Cl}, \text{H}_2\text{O}, \text{NO}^+, \text{NO}_2$ ) E  
MODELOS DE INTERAÇÃO COM O DNA**

**ITUIUTABA**

**2022**

**EVELYN CHRISTINE DE SOUZA ARANTES**

**COMPLEXOS DE RUTÊNIO TIPO  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bd})(\text{tpy})\text{L}](\text{PF}_6)_n$  ( $\text{L} = \text{Cl}, \text{H}_2\text{O}, \text{NO}^+, \text{NO}_2$ ) E  
MODELOS DE INTERAÇÃO COM O DNA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à  
Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso  
de Graduação em Química: Bacharelado do Instituto de  
Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade  
Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Galvão de Lima

**ITUIUTABA**

**2022**

**EVELYN CHRISTINE DE SOUZA ARANTES**

**COMPLEXOS DE RUTÊNIO TIPO  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bd})(\text{tpy})\text{L}](\text{PF}_6)_n$  (L = Cl, H<sub>2</sub>O, NO<sup>+</sup>, NO<sub>2</sub>) E  
MODELOS DE INTERAÇÃO COM O DNA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

**DATA DA APROVAÇÃO: 16/08/2022**

**COMISSÃO AVALIADORA:**

---

Profa. Dra. Tayana Mazin Tsubone

---

Dra. Laísa Bonafim Negri

---

Profa. Dra. Renata Galvão de Lima

**ITUIUTABA**

**2022**

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Ellen e Vanderlei. Aos meus avós, Dario e Maria Aparecida. Aos meus irmãos, Eder e Maiara. À minha sobrinha, Maria Clara. Obrigada pelo apoio, cuidado e compreensão durante toda a minha trajetória! Vocês são meu alicerce e também meu maior incentivo. Amo vocês!*

*Dedico também à minha orientadora, Profa. Dra. Renata Galvão de Lima, que foi essencial na minha trajetória acadêmica e que suscitou no meu coração o amor e a admiração pela ciência. Você é uma grande inspiração, Renata!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Autor e Sentido da minha vida, de tudo o que tenho e de tudo o que sou. “*Sois o meu Senhor, fora de Vós não há felicidade para mim.*” (Salmos 15,2). Aquele que constantemente renova meu fôlego de vida, me sonda e me concede todos os meus dons e faculdades. Cada virgula desse trabalho, e de toda a minha vida, é graça divina!

À minha amiga do coração, quase uma irmã, Naiara, que foi essencial na minha pesquisa e na minha trajetória acadêmica. Obrigada por toda a ajuda, o cuidado, a paciência e o aprendizado pessoal e científico que você me transmitiu. Partilhar a vida com você foi um verdadeiro presente, esse trabalho é nosso!

Aos meus amigos de graduação Ana Laura, Ana Maria, Ellen, Giovanne, Larissa, Leonardo, Maycon, Mirela, João Victor, Roberta e Vinicius. Obrigada pelo companheirismo de vocês nos estudos e na vida, obrigada por marcarem minha trajetória com nossa amizade tão rica! A presença de vocês no meu dia-a-dia foi essencial pra chegar até aqui! Em especial, minha gratidão ao João, que foi um fiel companheiro e se tornou um verdadeiro irmão!

Aos meus amigos do laboratório, Allysson, Mayara, Laís, Marcos, Vitória, Poliana, Cynthia e Leticia por todo o auxílio prestado durante a pesquisa. Dos gestos mais simples aos maiores, cada um de vocês fizeram a diferença, minha sincera gratidão!

Aos integrantes e ex-integrantes do grupo de pesquisa do qual tenho a honra de fazer parte, LABBIO, pela ajuda, o apoio e o companheirismo. Em especial à Mayara, que diante de todas as idas e vindas, permaneceu comigo e me concedeu um grande apoio!

Ao Grupo de Oração Universitário São Gabriel que foi casa e repouso nos dias de inconstância e um incentivo pra trilhar os passos da minha vocação. Obrigada a cada integrante por trazer a luz de Cristo à minha vida!

Às minhas amigas, que são na verdade uma família, Amanda, Ana Luiza, Andrielly, Emilly, Lorraine, Mariana, Thamires e Valéria. Obrigada pelo apoio e incentivo que vocês sempre me prestam. Tudo se torna mais leve com vocês e isso foi essencial nessa etapa da minha formação!

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, do ensino básico até o superior. Em especial aos meus professores do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, no curso técnico em química e meus professores da graduação do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do

Pontal. Minha gratidão por todo ensinamento, aprendizado e inspiração! A contribuição de cada um de vocês me fez chegar até aqui e despertou no meu coração a paixão pela química, obrigada!

À Prof. Dra. Tayana Mazin Tsubone e a Dra. Laísa Bonafim Negri por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora desse TCC. É uma honra tê-las nesse momento tão especial da minha trajetória acadêmica!

Ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira e ao técnico André pelos estudos de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.

Aos servidores da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Pontal.

À CNPq pela bolsa concedida durante a pesquisa.

*“Realize as coisas com perfeição, coloque amor nas pequenas atividades da jornada. Descubra esse algo divino que nos detalhes se encerra.”*

São Josemaria Escrivá

## RESUMO

Considerando-se o perfil epidemiológico que o câncer e todos os problemas por ele acarretados apresentam, diversos estudos são desenvolvidos e aprimorados a fim de sintetizar fármacos com potencial antitumoral. Os primeiros estudos ocorreram em 1960, quando constataram a atividade antitumoral da *cis*-diaminodicloridoplatina (II), mais comumente denominada cisplatina. Porém, os metalofármacos de Pt (II) apresentam resistência celular e, ainda, uma série de efeitos colaterais, como náuseas, vômitos e até neurotoxicidade. Além disso, deve-se levar em consideração que células tumorais possuem características próprias e, conseqüentemente, tumores são únicos, sendo praticamente impossível o desenvolvimento de algum quimioterápico que seja eficiente frente a todos os tipos de cânceres. Diante disso, novos e diferentes compostos de coordenação são desenvolvidos como potenciais fármacos na ação antitumoral. Alguns compostos de coordenação com centro metálico de rutênio (II) com ligantes polipiridínicos têm se mostrado promissores em se tratando de complexos potenciais antitumorais, apresentando atividades em tumores os quais desenvolveram resistência à cisplatina ou, ainda, em que a cisplatina é inativa. Dessa maneira, propôs-se a síntese e caracterização de complexos de rutênio do tipo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ ,  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  e  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  – em que tpy=2,2':6',2''-terpiridina; bd= *o*-fenilenodiamina – e, posteriormente, a avaliação da interação desses complexos com a molécula de DNA extraída do esperma de salmão. Os estudos foram realizados através de técnicas espectroscópicas na região Ultravioleta-Visível, dicroísmo circular e desnaturação térmica da molécula de DNA e demonstraram interação fraca à moderada entre os complexos e a biomolécula, com constante de interação ( $K_b$ ) na ordem de  $10^{-4} \text{ M}^{-1}$  para todos os casos. Nessa série de complexos em estudo, identificou-se complexos intercaladores e complexos que interagem por interação eletrostática.

Palavras-chaves: Complexos de rutênio, DNA, potencial antitumoral, espectroscopia, interações químicas.

## ABSTRACT

Considering the epidemiological profile that cancer and all the problems it causes, several studies are developed and improved to synthesize drugs with antitumor potential. The first studies occurred in 1960 when they found the antitumor activity of cis-diamminedichloridoplatinum (II), more commonly called cisplatin. However, Pt (II) metallopharmaceuticals present cellular resistance and also several side effects, such as nausea, vomiting, and even neurotoxicity. In addition, it should be taken into account that tumor cells have their own characteristics and, consequently, tumors are unique, making the development of some efficient chemotherapy in view of all types of cancers impossible. Therefore, new and different coordination compounds are developed as potential drugs in antitumor action. Some compounds of coordination with ruthenium metal center (II) with polypyridine ligands have shown promise in the case of potential antitumor complexes, presenting activities in tumors that have developed resistance to cisplatin or, even, in which cisplatin is inactive. Thus, the synthesis and characterization of ruthenium complexes of type  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ ,  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  and  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  – in which tpy=2,2':6',2''-terpyridine; bd= o-phenylenediamine – and, subsequently, the evaluation of the interaction of these complexes with the DNA molecule extracted from salmon sperm. The studies were conducted using spectroscopic techniques in the Ultraviolet-Visible region, circular dichroism, and thermal denaturation of the DNA molecule and demonstrated weak to moderate interaction between the complexes and the biomolecule, with interaction constant ( $K_b$ ) in the order of  $10^{-4} \text{ M}^{-1}$  for all cases. In this series of complexes under study, intercalating complexes and complexes that interact by electrostatic interaction were identified.

Keywords: Ruthenium complexes, DNA, antitumor potential, spectroscopy technique, chemical interactions.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estruturas dos complexos de platina utilizados mundialmente no tratamento anticâncer.....	20
<b>Figura 2.</b> Estrutura do complexo do RAPTA-C .....	21
<b>Figura 3.</b> Estrutura dos complexos TLD1433 (a), NAMI-A (b) e KP1019 (c) .....	22
<b>Figura 4.</b> Estrutura dupla hélice da molécula de ácido desoxirribonúcleico (DNA) e suas ligações.....	23
<b>Figura 5.</b> Formas tridimensionais A, B e Z da molécula de DNA.....	24
<b>Figura 6.</b> Tipos de interações existentes entre complexos metálicos e a molécula de DNA. .	25
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ .....	26
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_3(\text{terpy})]$ .....	27
<b>Figura 9.</b> Estrutura química do complexo $[\text{Ru}(\text{biphtpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ (a) e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{phbi})]^{2+}$ (b)	27
<b>Figura 10.</b> Representação da estrutura química do complexo de rutênio do tipo $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (a), $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b), $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (c) $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (d).....	28
<b>Figura 11.</b> Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (-) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (-) em ATR.....	39
<b>Figura 12.</b> Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ em ATR.....	40
<b>Figura 13.</b> Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em ATR.....	41
<b>Figura 14.</b> Espectros vibracionais na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em PBS (pH = 7,4). .....	42
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (-) e 2h (---). T = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível. Referente aos picos 1 (b) e 2 (c).....	43
<b>Figura 16.</b> Espectro eletrônico qualitativo para o complexo $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....	44
<b>Figura 17.</b> Cromatograma para o complexo $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do	

complexo: 0 h (–) e 2 h (---). T = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível referente aos picos 1 (b) e 2 (c).....	45
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> . Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0h(–) e 2h (---). T=37 °C.....	46
<b>Figura 19.</b> Cromatograma para o complexo [Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). T=37 °C. Espectro de absorção na região do UV/Visível. para o complexo [Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> referente ao pico em tr=5,99 min. (b). ....	46
<b>Figura 20.</b> Espectro eletrônico para o complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> (–) e [Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (–) a 50 μmol L <sup>-1</sup> em tampão Tris (pH = 7,4).....	48
<b>Figura 21.</b> Espectro eletrônico para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> a 35,8 μmol L <sup>-1</sup> em tampão Tris (pH = 7,4).....	49
<b>Figura 22.</b> Espectro eletrônico para o complexo [Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> a 31,7 μmol L <sup>-1</sup> em tampão Tris (pH = 7,4).....	50
<b>Figura 23.</b> Representação da estrutura da molécula de tris(hidroximetil)aminometano .....	53
<b>Figura 24.</b> Espectro eletrônico referente ao estudo da interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> após 0 (–) e 60 minutos (–) de dissolução.....	53
<b>Figura 25.</b> Espectro eletrônico referente ao estudo da interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo [Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> após 0 (–) e 60 minutos (–) de dissolução.....	54
<b>Figura 26.</b> Espectro eletrônico referente ao estudo da interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> após 0 (–) e 60 minutos (–).....	54
<b>Figura 27.</b> Espectro eletrônico referente ao estudo de interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo [Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> após 0 (–) e 60 minutos (–) de dissolução.....	55
<b>Figura 28.</b> Espectro de dicroísmo circular para o ss-DNA (250 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (–) e presença de 25 (–), 62,5 (–) e 87,5 (–) μmol L <sup>-1</sup> de [RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> . ....	57
<b>Figura 29.</b> Espectro de dicroísmo circular para o ss-DNA (250 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (–) e presença de 25(–), 62,5(–) e 87,5(–) μmol L <sup>-1</sup> de [Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	57
<b>Figura 30.</b> Espectro de dicroísmo circular para o DNA (250 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (–) e presença de 25 (–), 62,5 (–) e 87,5 (–) μmol L <sup>-1</sup> de [Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> . ....	58

<b>Figura 31.</b> Espectro de dicroísmo circular para o DNA (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (--) e presença de 25 (---), 62,5 (---) e 87,5 (---) $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ . .....	59
<b>Figura 32.</b> Efeito da desnaturação térmica em uma solução de ss-DNA (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) .....	61
<b>Figura 33.</b> Efeito da desnaturação térmica em uma solução de ss-DNA (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença dos complexos (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Ru:DNA = 1:10) após 5 min (a) e 1h (b) de incubação .....	62
<b>Figura 34.</b> Espectro eletrônico para o DNA a 3,06 $\text{mmol L}^{-1}$ em tampão Tris. ....	64
<b>Figura 35.</b> Espectro eletrônico do complexo $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de ss-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. Insert: banda TCML do complexo em 500 nm evidenciando o efeito hipocrômico. ....	65
<b>Figura 36.</b> Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de ss-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. Insert: banda TCML do complexo em 500 nm evidenciando o efeito hipocrômico....	66
<b>Figura 37.</b> Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de ss-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. Insert: banda TCML do complexo em 328 nm evidenciando o efeito hiper-crômico...	67
<b>Figura 38.</b> Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de ss-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. .	68
<b>Figura 39.</b> Obtenção da constante de interação ( $K_b$ ) entre o DNA e o complexo $\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})\text{PF}_6$ (a), $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (c). ....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados durante a síntese, caracterização e posteriores estudos acerca dos complexos, sua pureza percentual e procedência.....	29
<b>Tabela 2.</b> Valores de condutividade molar ( $\Lambda_m$ ) em acetonitrila (ACN) para os complexos terpiridina de rutênio (II) (T=28 °C).....	37
<b>Tabela 3.</b> Dados espectroscópicos e suas atribuições para os complexos polipiridínicos de rutênio (II) em tampão Tris (pH = 7,4). ....	51
<b>Tabela 4.</b> Valores de coeficiente de partição (log P) para os complexos.....	52
<b>Tabela 5.</b> Valores de temperatura de desnaturação (T <sub>m</sub> ) e de diferença de temperatura ( $\Delta T_m$ ) para o DNA na ausência e presença dos complexos polipiridínicos de rutênio.....	63
<b>Tabela 6.</b> Porcentagem de hiper/hipocromismo dos espectros eletrônicos e constante de interação (K <sub>b</sub> ) dos complexos terpiripina de rutênio com o DNA.....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bd	<i>o</i> -fenilenodiamina
bpy	2,2'-bipiridina
CD	Dicroísmo Circular
CL	Campo ligante
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dppz	dipiridofenazina
IL	Intraligante
IV	Infravermelho
PBS	Tampão fosfato salino
phbi	2-(2-benzimidazol)-1,10-fenantrolina
ss-DNA	Ácido desoxirribonucleico de esperma de salmão
TCML	Transferência de carga metal-ligante
terpy/tpy	2,2':6',2'-terpiridina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV/Vis	Ultravioleta e visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta$	Delta
$\approx$	Aproximadamente
$K_b$	Constante de ligação
$T_m$	Temperatura média de fusão
$t_r$	Tempo de retenção
$\lambda$	Comprimento de onda
$\Lambda_m$	Condutividade molar

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1. Complexos de rutênio como fármacos anticancerígenos.....	20
1.2. O alvo farmacológico de compostos antitumorais .....	22
1.2.1. A estrutura do DNA .....	23
1.2.2. Modos de interação entre complexos metálicos e o DNA.....	24
1.3. Complexos polipiridínicos de rutênio e suas interações com o DNA .....	26
2. OBJETIVOS .....	28
3. EXPERIMENTAL.....	29
3.1. Reagentes .....	29
3.2. Procedimento experimental.....	30
3.2.1. Síntese dos Complexos Terpiridina de Rutênio (II).....	30
3.2.1.1. Síntese do complexo [RuCl <sub>3</sub> (tpy)].....	30
3.2.1.2. Síntese do Complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> .....	30
3.2.1.3. Síntese do complexo [Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub> .....	31
3.2.1.4. Síntese do Complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> .....	31
3.2.1.5. Síntese do complexo [Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	31
3.2.2. Preparo de soluções.....	32
3.2.2.1. Preparo da solução tampão Tris (50 mmol L <sup>-1</sup> ) NaCl (5 mmol L <sup>-1</sup> ) (pH=7,40)...	32
3.2.2.2. Preparo da solução de ácido desoxirribonucleico de esperma de salmão (ss-DNA) .....	32
3.2.2.3. Preparo da solução estoque dos complexos terpiridina de rutênio (II) (1 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	32
3.2.3. Caracterização físico-química dos complexos terpiridina de rutênio (II) .....	33
3.2.3.1. Análises condutimétricas .....	33
3.2.3.2. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV) .....	33

3.2.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	33
3.2.3.4. Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível (UV/Visível).....	34
3.2.3.5. Determinação da lipofilicidade.....	34
3.2.4. Estudo da estabilidade dos Complexos Terpiridina de Rutênio (II) em tampão Tris . .....	35
3.2.5. Estudo das interações entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II)..... .....	35
3.2.5.1. Estudo das interações entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	35
3.2.5.2. Estudo das interações entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia na região do UV/Visível.....	35
3.2.5.3. Obtenção da constante de interação entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II)	36
3.2.5.4. Estudo de desnaturação térmica do <i>ss</i> -DNA na presença dos complexos terpiridina de rutênio (II) .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Caracterização dos complexos terpiridina de rutênio (II).....	37
4.1.1. Análise Condutimétrica.....	37
4.1.2. Espectroscopia da região do Infravermelho (IV).....	38
4.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
4.1.4. Espectroscopia na região Ultravioleta/Visível.....	47
4.1.5. Determinações da lipofilicidade .....	51
4.2. Estudo da estabilidade dos complexos terpiridina de rutênio (II) em tampão Tris (pH=7,4) .....	52
4.3. Estudo das interações entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) .....	56
4.3.1. Estudo das interações entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia de dicroísmo circular (CD) .....	56
4.3.2. Estudo de desnaturação térmica do <i>ss</i> -DNA na presença dos complexos terpiridina de rutênio (II).....	60

4.3.3. Estudo das interações entre <i>ss</i> -DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia na região do UV/Visível.....	63
5. CONCLUSÃO .....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

## 1. INTRODUÇÃO

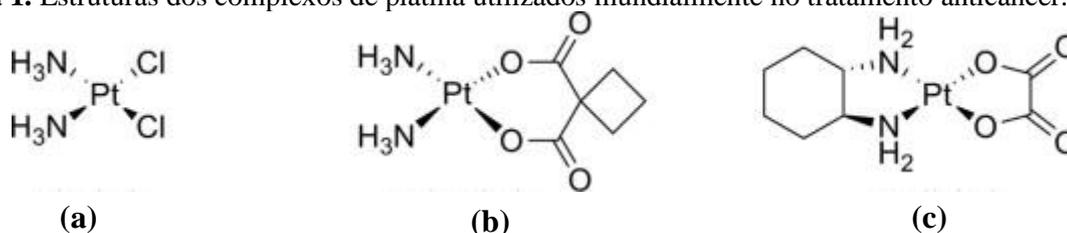
Naturalmente, as células no organismo humano crescem e se multiplicam através do processo de divisão celular, no qual, à medida em que as células envelhecem ou se danificam novas células são formadas de maneira ordenada. Quando, porém, esse crescimento ocorre de forma descontrolada, ou ainda, quando células anormais passam a se multiplicar, surge a formação de tumores, podendo ser benignos ou malignos. Essa última classe de tumores caracteriza uma das principais doenças que mais ocasiona mortes no mundo: o câncer (NCI. National Cancer Institute, 2021).

As alterações genéticas que desencadeiam esse crescimento de células anormais podem ser ocasionadas por fatores particulares e externos, como por exemplo, hereditariedade, erros referentes à própria divisão celular, ou ainda exposição aos raios UV e às substâncias químicas nocivas presentes no tabaco. Em todos os casos, o câncer surge devido a uma alteração no DNA da célula, podendo se desencadear em qualquer parte do corpo (INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2021).

Em 2020 foram registrados um total de 626.030 novos casos de câncer no Brasil, tendo, em 2019, registros de 232.030 óbitos por câncer (INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2021). As estimativas consideram um aumento gradual da doença e, paralelo a esse aumento, cresce também o interesse na investigação sobre o câncer, sua ação no organismo humano, como preveni-lo, e, principalmente, como tratá-lo.

Historicamente a investigação acerca de medicamentos para extinção de células tumorais foi marcada dentro da área da inorgânica pela descoberta acidental da *cis*-diaminodichloridoplatina (II) (Figura 1a) – também conhecida como cisplatina – como um agente anticancerígeno. Em meados de 1960, estudos em modelos celulares demonstraram o potencial antitumoral desse fármaco, o que proporcionou um crescente desenvolvimento de pesquisas na área da química medicinal. Desde então, a cisplatina e seus complexos semelhantes, como a carboplatina e a oxaliplatina (Figura 1b e 1c), passaram a ser utilizados mundialmente no tratamento de câncer de testículos, sendo hoje também utilizados para tratar neoplasias na cabeça, bexiga, ovário, pescoço e próstata (ROSEMBERG, 1969; WEXSELBLATT, YAVIN & GIBSON, 2012).

**Figura 1.** Estruturas dos complexos de platina utilizados mundialmente no tratamento anticancer.



Fonte: Adaptado de Wexselblatt, Yavin & Gibson (2012)

Apesar do grande avanço proporcionado pela descoberta da ação anticancerígena dos complexos de platina e de sua ampla aplicação no tratamento do câncer, tais complexos apresentaram desvantagens como: baixa atividade contra demais tipos de cânceres, ocorrência de efeitos colaterais e resistência imunológica após determinado tempo de uso do paciente (BARRA & NETTO, 2015).

Essas desvantagens tornaram-se um incentivo para a investigação de novos fármacos antitumorais que tenham alta citotoxicidade às células cancerígenas, mas que apresentem seletividade pelas células saudáveis e que ainda atuem para os tipos de cânceres que a cisplatina não corresponda. Por isso, compostos inorgânicos com e “sem platina” são investigados como potenciais fármacos anticancerígenos. Nessa investigação, é fundamental a compreensão das duas principais espécies envolvidas na atividade antitumoral: o potencial fármaco e o seu alvo farmacológico.

### 1.1. Complexos de rutênio como potenciais fármacos anticancerígenos

A atividade antitumoral dos compostos de platina está diretamente relacionada com suas características enquanto complexo metálico. Isso significa que características como números de coordenação e geometrias, estados redox acessíveis, características termodinâmicas e cinéticas, bem como as propriedades intrínsecas do íon metálico e do próprio ligante oferecem um amplo espectro de reatividades que podem ser exploradas nos mecanismos de sua ação biológica (BRABEC, RABINA & KASPARKOVA, 2017).

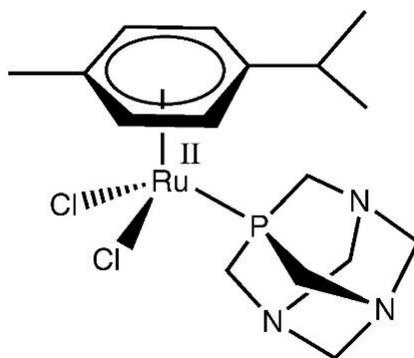
Tais características não são inerentes exclusivamente à complexos de platina, mas a grande parte dos complexos metálicos. Assim, a investigação acerca de compostos anticancerígenos se amplia a complexos que possuam demais centros metálicos. Por exemplo, complexos em que o ácido de Lewis selecionado foram cátions de rutênio demonstraram ser menos tóxicos e/ou possuir atividades antitumorais. (LOKICH & ANDRESON, 1998;

RONCONI & SADLER, 2007; FREZZA, et al., 2010). Isso porque, a mudança do centro metálico permite não só sítios de coordenação adicionais, como também alterações na afinidade do ligante e na cinética de substituição, mudanças no estado de oxidação e ainda possíveis abordagens fotodinâmicas à terapia (BRABEC & KASPARKOVA, 2018).

A ampla diversidade de coordenação dos complexos de rutênio permite uma exploração cada vez mais vasta desses compostos na química medicinal, especialmente enquanto potenciais fármacos antitumorais. Após a descoberta da ação anticancerígena da cisplatina, complexos clorido-amina Ru (II) e Ru (III), bastante semelhantes ao fármaco de platina, foram desenvolvidos por Clarke e colaboradores na década de 1980. Desde então, complexos de rutênio com diversos ligantes são explorados para esse fim, inclusive compostos com ligantes quelantes (LEVINA, MITRA & LEY, 2009).

Dois grupos ganharam destaque quanto à capacidade citotóxica: os complexos de rutênio com ligante areno e ligante polipiridil. Embora nenhum dos compostos de Ru(II) areno tenha ainda entrado em ensaios clínicos, complexos como o RAPTA-C (Figura 2) apresentaram alta citotoxicidade e, além disso, apresentou um mecanismo de atuação semelhante ao da cisplatina, devido ao processo de aquação do complexo (MITAL & ZIORA, 2018).

**Figura 2.** Estrutura do complexo do RAPTA-C

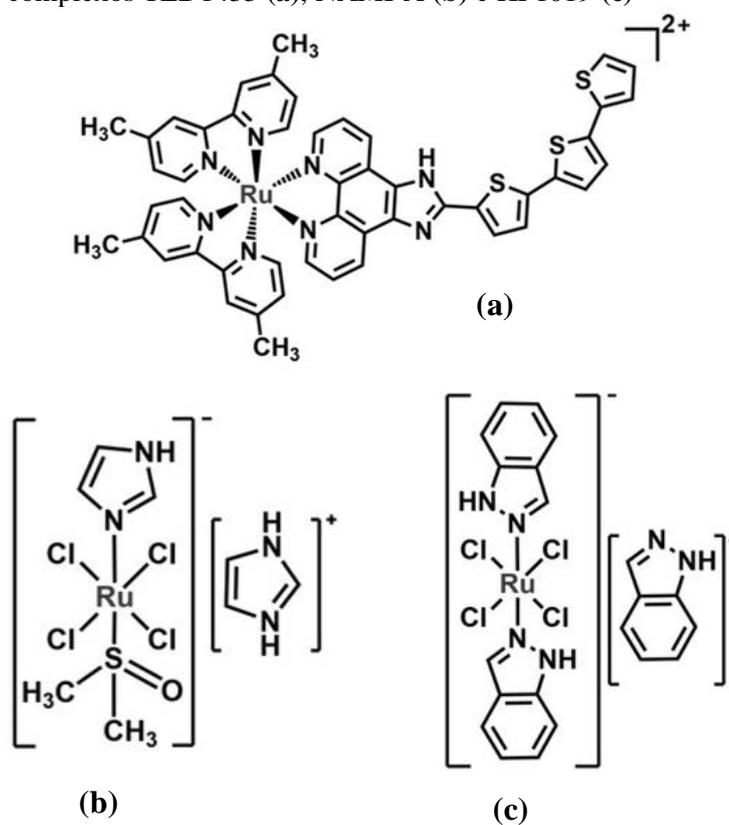


Fonte: Levina, Mitra e Ley (2009)

Além disso, um complexo polipiridínico de Ru (II) (TLD1433 – Figura 3a) e dois complexos de Ru (III) (NAMI-A – Figura 3b e KP1019 – Figura 3c) evoluíram para ensaios clínicos (POYTON, et al., 2017). Tais compostos mostraram apresentar propriedades antitumorais inovadoras em comparação com os complexos de platina. Em alguns casos, os complexos de rutênio se mostraram promissores até mesmo em tumores os quais

desenvolveram resistência à cisplatina ou, ainda, em que a cisplatina é inativa (MOTSWAINYANA & AJIBADE, 2015; ČANOVIĆ, et al, 2017).

**Figura 3.** Estrutura dos complexos TLD1433 (a), NAMI-A (b) e KP1019 (c)



Fonte: Adaptado de Swaminathan, et al. (2021)

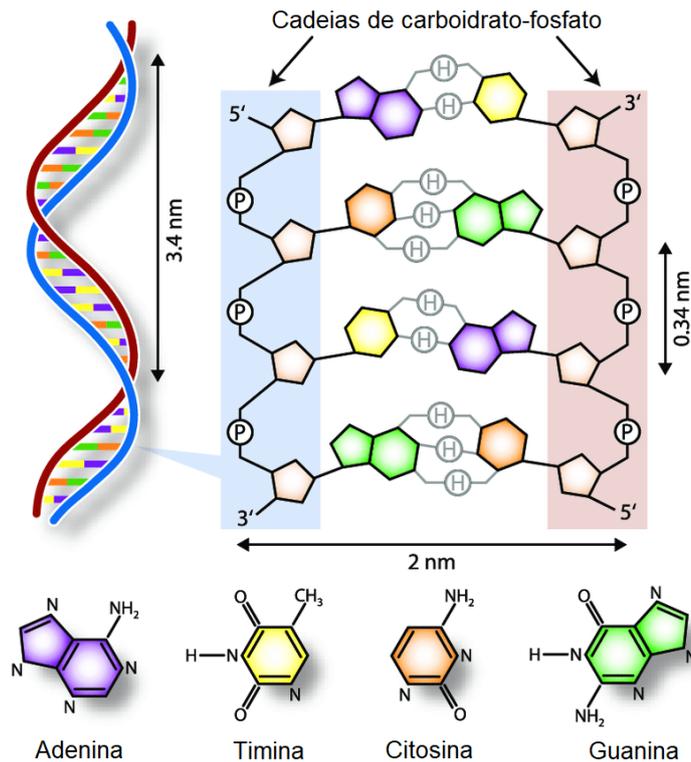
## 1.2. O alvo farmacológico de compostos antitumorais

Para a exploração de novos potenciais fármacos anticancerígenos é indispensável a compreensão do mecanismo bioquímico de atuação desses fármacos no organismo, seu alvo farmacológico e os efeitos biológicos que o fármaco proporciona. Todavia, os efeitos antitumorais envolvem processos complexos e individuais, a depender do tipo de câncer. De forma geral, um dos mecanismos principais da ação antitumoral desses potenciais fármacos é interagir seletivamente com moléculas essenciais para a sobrevivência da célula cancerosa (DNA, proteínas ou enzimas). Para os complexos de platina, por exemplo, a ação antitumoral ocorre a partir de um mecanismo de interação entre a droga e a molécula de DNA, interrompendo assim o processo de replicação das células cancerosas (BRABEC, RABINA & KASPARKOVA, 2017).

### 1.2.1. A estrutura do DNA

O DNA é uma macromolécula constituída por duas fitas formadas por uma sequência de nucleotídeos ligados entre si de maneira covalente por ligação fosfodiéster. Cada nucleotídeo é uma combinação de um açúcar (pentose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada, seja ela púrica (guanina ou adenina) ou pirimídica (citosina ou timina). Essas fitas estão unidas entre si através de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas complementares (adenina com timina e citosina com guanina), formando a estrutura de dupla hélice descrita por Watson e Crick, como mostra a Figura 4. A dupla hélice é também estabilizada por interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre os anéis aromáticos das bases adjacentes. De fora da dupla hélice encontram-se os grupos açúcar-fosfato, sendo, portanto, uma área aniônica (WATSON & CRICK, 1953; ANDREZÁLOVÁ & ORSZÁGHOVÁ, 2021).

**Figura 4.** Estrutura dupla hélice da molécula de ácido desoxirribonúcleico (DNA) e suas ligações

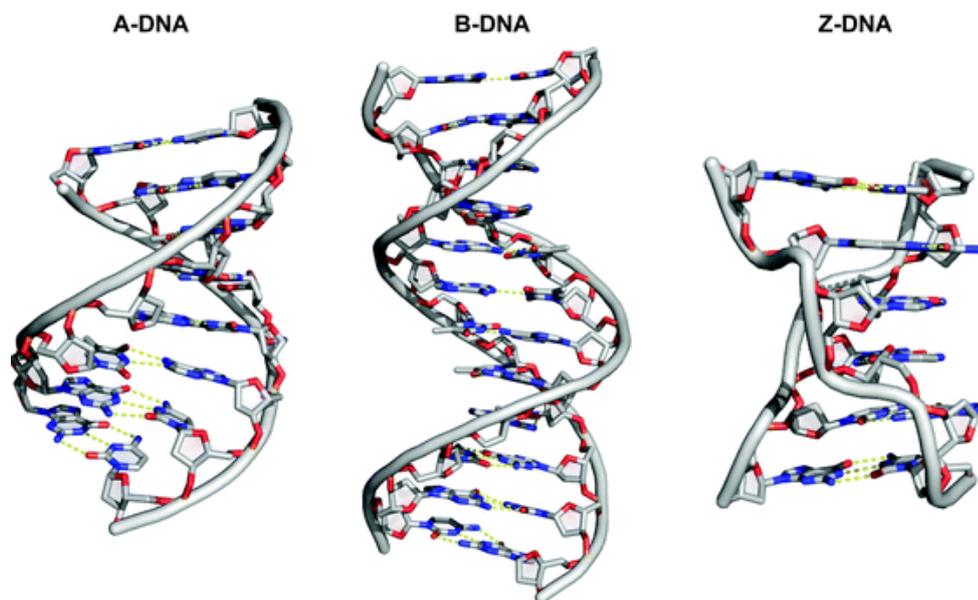


Fonte: Adaptado de Gauthier (2007)

O pareamento perfeito das duas fitas cria um sulco maior e um sulco menor na superfície do duplex. Vale notar que podem ser formadas três ligações de hidrogênio entre Guanina (G) e Citosina (C), simbolizadas por  $G \equiv C$ , mas apenas duas são formadas entre Adesina (A) e Timina (T), simbolizadas por  $A = T$ . Essa é uma razão para a descoberta de que a separação das fitas

pareadas do DNA é mais difícil quanto maior for a razão do pareamento de bases G≡C em comparação com A=T. Sendo esse pareamento mantido, a estrutura tridimensional do DNA pode variar. A estrutura de Watson e Crick é conhecida como forma B do DNA, porém já foram constatados DNA de forma A e Z, podendo haver mudança na dimensão dos sulcos, na orientação e torção da hélice e na quantidade de pares de base por volta helicoidal (NELSON & COX, 2014).

**Figura 5.** Formas tridimensionais A, B e Z da molécula de DNA.



Fonte: Adaptado de Kellet, et al. (2019)

### 1.2.2. Modos de interação entre complexos metálicos e o DNA

A molécula de DNA possui um polimorfismo químico e estrutural que possibilita diferentes tipos de interação com os complexos metálicos. De maneira geral, complexos podem interagir com o polinucleotídeo covalente ou não covalentemente. Na ligação covalente, o complexo se liga diretamente a um átomo da molécula de DNA, o que pode ocorrer tanto com os átomos de nitrogênio das bases nitrogenadas quanto com os grupos fosfatos da biomolécula. A ligação covalente é considerada irreversível, mas a interação complexo-DNA pode ainda ocorrer de forma reversível por interações eletrostáticas, interação com o sulco e intercalação. Para os complexos metálicos que apresentam diferentes grupos ligantes, a interação com DNA pode se dar de maneira a incluir um ou mais dos modos de interação citados. (REHMAN, et al., 2015; BRABEC & KASPARKOVA, 2018).

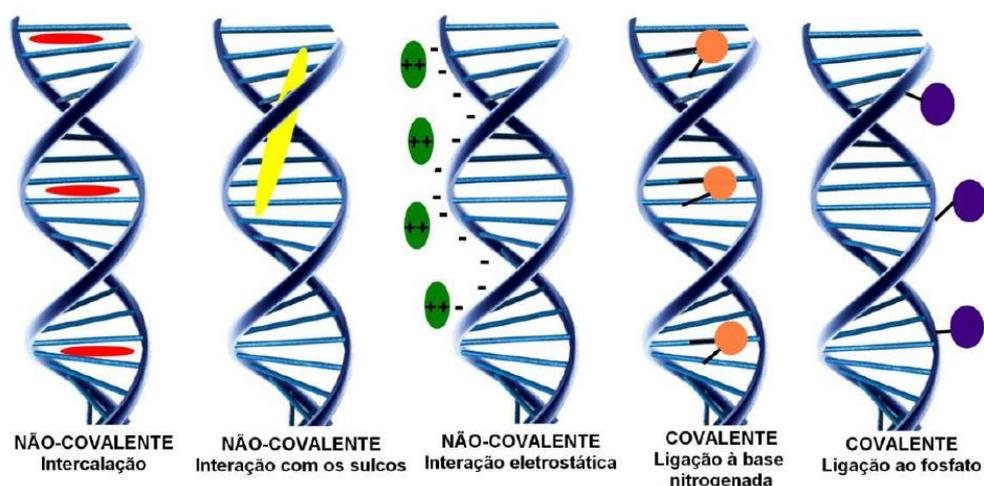
A interação eletrostática ocorre entre a carga negativa presente nos grupos fosfatos do DNA e os complexos de carga positiva. Para que esse tipo de interação aconteça, cátions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) que estabilizam a repulsão entre as cargas negativas dos fosfatos, são liberados em solução. Assim, as interações eletrostáticas entre a biomolécula e os complexos metálicos são intensificadas quando há diminuição da concentração de sal no meio (STREKOWSKI & WILSON, 2007).

A interação com o sulco refere-se a ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals com as bases nitrogenadas da biomolécula. As regiões de sulco maior e sulco menor no DNA diferem-se não só pelo tamanho, como também pela sequência das bases. No geral, os compostos de coordenação interagem com o sulco menor do DNA, pois este fornece melhor contato entre ambos, o que promove tanto as ligações de hidrogênio quanto as interações de Van der Waals. Esse tipo de interação pode ocasionar perturbações na estrutura helicoidal do DNA (ANDREZÁLOVÁ & ORSZÁGHOVÁ, 2021).

Por fim, a intercalação ocorre quando o composto metálico possui um grupo aromático planar e se insere entre dois pares de bases adjacentes do ácido nucleico. Esta inserção é estabilizada pelo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre os pares de bases e o sistema de anéis aromáticos e não interfere nas ligações de hidrogênio entre as bases. Os intercaladores têm sido alvo de investigação enquanto fármacos, pois esse tipo de interação resulta no desenrolamento da hélice do DNA, o que pode levar a alterações funcionais da biomolécula, impedindo a proliferação celular (ANDREZÁLOVÁ & ORSZÁGHOVÁ, 2021).

A Figura 6 apresenta uma ilustração dos tipos de interação citados.

**Figura 6.** Tipos de interações existentes entre complexos metálicos e a molécula de DNA.



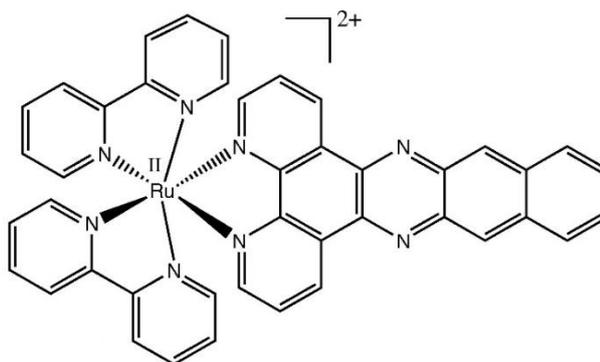
Fonte: Barra e Netto (2015)

### 1.3. Complexos polipiridínicos de rutênio e suas interações com o DNA

Quanto ao alvo farmacológico dos complexos de rutênio, ainda não foi estabelecido um mecanismo detalhado, mas, no geral, a citotoxicidade observada nesses compostos está também relacionada à sua capacidade de se ligar ao DNA, já que vários desses compostos demonstraram inibir a replicação dessa biomolécula. Porém, os complexos de rutênio, diferentemente da cisplatina, possuem geometria octaédrica e por isso devem apresentar um mecanismo diferente (BRABEC & NOVAKOVA, 2006). Isso porque, complexos octaédricos podem ser modificados e funcionalizados em três dimensões para adaptar a hélice do DNA e, portanto, fornecem ferramentas úteis e sensíveis para sondar a estrutura dessa macromolécula com especificidade de sítio (JI, ZOU & LIU, 2001). Assim sendo, os estudos das interações entre complexos de rutênio e a molécula de DNA são de grande importância e interesse.

Em específico, complexos polipiridínicos de rutênio (II) indicaram, em diversos casos, a intercalação como o principal mecanismo de interação com a molécula de DNA. O complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  (bpy = 2,2'-bipiridina, dppz = dipiridofenazina) (Figura 7), por exemplo, interage com a biomolécula somente por intercalação, pois, ao contrário da cisplatina que se liga covalentemente, esse complexo não possui nenhum grupo de saída potencial e provavelmente atua como um intercalador de DNA, devido à presença de um grande ligante policíclico aromático (BRABEC & KASPARKOVA, 2018).

**Figura 7.** Estrutura química do complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$

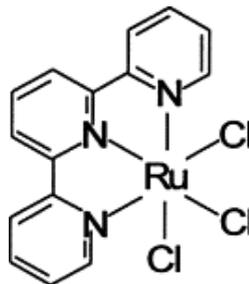


Fonte: Brabec e Kasparikova (2018)

Além disso, observou-se que um efeito profundo na afinidade e no modo de ligação ao DNA é afetado não apenas pela estrutura química do ligante polipiridil principal, mas também pelo ligante auxiliar (BRABEC & KASPARKOVA, 2018). Por exemplo, complexos de rutênio contendo – além de ligantes polipiridil – grupos aqua ou cloro, mostraram ligar-se

covalentemente ao DNA em meios livres de células. Os ligantes aqua ou cloro nestes complexos representam ligantes de saída cineticamente mais estáveis, em contraste com os grupos polipiridil. Assim, ao se ligar de maneira covalente ao DNA o complexo do tipo *mer*-[Ru(II)Cl<sub>3</sub>(terpy)] (terpy = 2,2':6',2'-terpiridina) (Figura 8) apresentou elevada citotoxicidade em linhas celulares de tumor murino e humano. (BRABEC & NOVAKOVA, 2006).

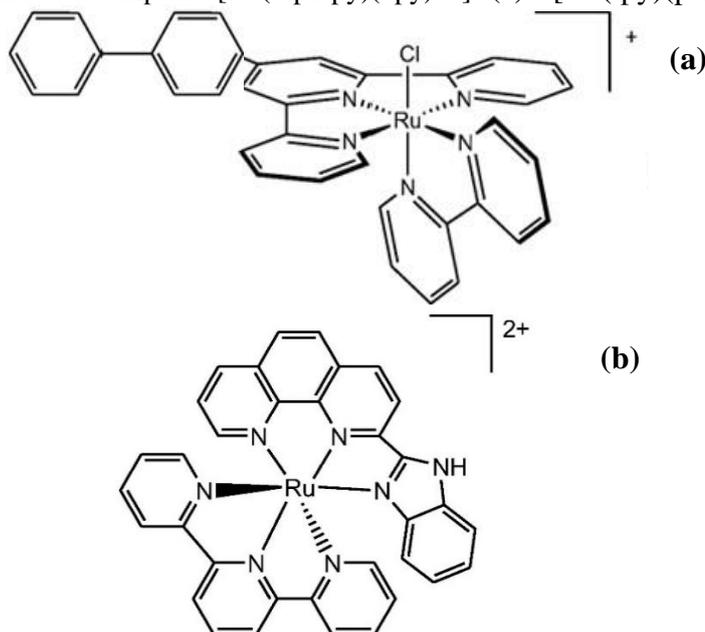
**Figura 8.** Estrutura química do complexo [Ru<sup>II</sup>Cl<sub>3</sub>(terpy)]



Fonte: Brabec e Novakova (2006)

Além disso, Chao e colaboradores relataram a ocorrência de complexos polipiridínicos de rutênio (II), do tipo [Ru(biphtpy)(bpy)Cl]<sup>+</sup> (Figura 9a) capazes de interagir com DNA com ambas as formas, covalente e não covalente (intercalação). Os autores descreveram ainda interação eletrostática de um complexo do tipo [Ru(tpy)(phbi)]<sup>2+</sup> (phbi = 2-(2-benzimidazol)-1,10-fenantrolina) (Figura 9b) com o ácido nucleico (SIMOVIC, *et al.*, 2019).

**Figura 9.** Estrutura química do complexo [Ru(biphtpy)(bpy)Cl]<sup>+</sup> (a) e [Ru(tpy)(phbi)]<sup>2+</sup> (b)

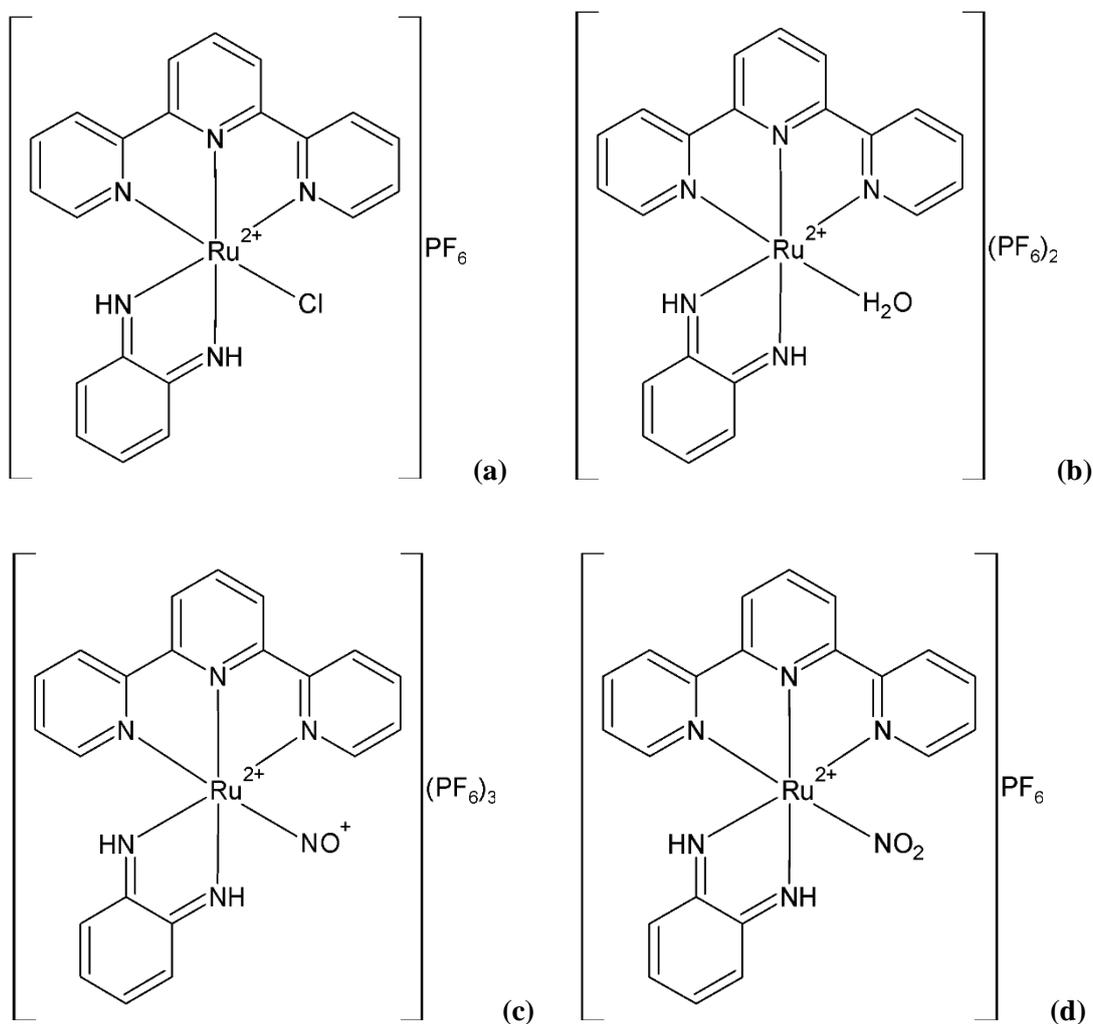


Fonte: Simovic, *et al.* (2019)

## 2. OBJETIVOS

Avaliar as interações entre a molécula de ácido desoxirribonucleico de esperma de salmão (*ss*-DNA) e os complexos polipiridínicos de rutênio (II) do tipo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (Figura 10a),  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  (Figura 10b),  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  (Figura 10c) e  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (Figura 10d) – onde tpy=2,2':6',2''-terpiridina; bd= *o*-fenilenodiamina – a partir de técnicas espectroscópicas.

**Figura 10.** Representação da estrutura química do complexo de rutênio do tipo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (a),  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  (b),  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  (c)  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (d).



Fonte: Autora

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes

A Tabela 1 apresenta todos os reagentes utilizados durante a pesquisa, sua pureza sua e procedência.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados durante a síntese, caracterização e posteriores estudos acerca dos complexos, sua pureza percentual e procedência.

Reagentes	Pureza (%)	Procedência
Acetonitrila	99,9	Tedia
Ácido desoxirribonucleico de esperma de salmão ( <i>ss</i> -DNA)	-	Sigma Aldrich
Ácido clorídrico	-	-
Ácido hexafluorofosfórico	98	Aldrich Chemicals
Ácido trifluoracético	-	Merck
Cloreto de lítio	99	Aldrich Chemicals
Cloreto de rutênio (III)	99,9	Aldrich Chemicals
Cloreto de sódio	98	Synth
Dihidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Dimetilsulfóxido	98	Neon
Etanol	95	Qhemis
<i>o</i> -fenilenodiamina	98	Aldrich Chemicals
Hexafluorofosfato de amônio	95	Aldrich Chemicals
Hidróxido de sódio	97	Synth
Monohidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Metanol	99,5	Merck
Nitrito de sódio	99	Merck
Octanol	-	-
2,2':6',2''-terpiridina	98	Aldrich Chemicals
Trietilamina	85	Synth
Tris(hidroximetil)aminometano	-	LS Chemicals

Fonte: Autora

## 3.2. Procedimento experimental

### 3.2.1. Síntese dos Complexos Terpiridina de Rutênio (II)

#### 3.2.1.1. Síntese do complexo [RuCl<sub>3</sub>(tpy)]

O complexo [RuCl<sub>3</sub>(tpy)] foi sintetizado conforme descrito por SULLIVAN e colaboradores (1980).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3244 g de cloreto de rutênio (RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O) (1,57 mmol) e 0,2912 g do ligante 2,2'-6',2''-terpiridina (tpy) (1,25 mmol). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em 30 mL de metanol. A solução foi mantida sob refluxo ( $T \cong 65$  °C) durante 3 h. Após esse tempo, a fim de promover a precipitação do sólido, a solução permaneceu em repouso por 1 h em temperatura ambiente ( $\approx 30$  °C). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

**MM** = 440,6 g mol<sup>-1</sup>. **Rendimento** = 0,4216 g (61,18%)

#### 3.2.1.2. Síntese do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub>

O complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> foi sintetizado conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foi adicionada uma mistura de 40 mL de etanol e água (75% de etanol e 25% de água). Em seguida, foram adicionados 0,1783 g do complexo precursor [RuCl<sub>3</sub>(tpy)] (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (0,72 mmol). A solução foi mantida sob agitação durante 30 min. para a redução do íon metálico, de Ru<sup>III</sup> para Ru<sup>II</sup>. O processo de redução do íon metálico foi acompanhado pela mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. Posterior à essa observação, foram adicionados 0,0432 g do ligante *o*-fenilenodiamina (bd) (0,40 mmol) e 20 mg de cloreto de lítio (LiCl) (0,47 mmol). A solução foi mantida sob refluxo ( $T \approx 80$  °C) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração ( $T \approx 5$  °C). O volume da solução foi reduzido via rotaevaporação, a fim de facilitar o processo de precipitação. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

**MM** = 619,6 g mol<sup>-1</sup> **Rendimento** = 0,2016 g (80,41%).

### 3.2.1.3. Síntese do complexo [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub>

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mL de água. Em seguida, foram adicionados 0,1284 g do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> (0,21 mmol) e 0,0720 g de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (1,04 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de roxa para vermelha. A solução foi mantida sob e refluxo (T ≈ 85 °C) durante 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>), para o fornecimento do contra-íon. Observou-se a formação de um precipitado vermelho. Posteriormente, a solução permaneceu 48 h sob refrigeração (T ≈ 5 °C). O precipitado vermelho obtido foi filtrado e seco à vácuo.

**MM**=631,1 g mol<sup>-1</sup>. **Rendimento**: 0,0739 g (56,56%).

### 3.2.1.4. Síntese do complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>

O complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> foi sintetizado conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mL de água. Em seguida, foram adicionados 0,0826 g do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> (0,13 mmol) e 0,0444g de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (0,64 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de roxa para vermelha. A solução foi mantida sob refluxo (T ≈ 85 °C) durante 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de ácido hexafluorofosfórico (HPF<sub>6</sub>), para o fornecimento do contra-íon e acidificação da solução. Observou-se a formação de um precipitado marrom. Posteriormente, a solução permaneceu 48 h sob refrigeração (T ≈ 5 °C). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

**MM** = 905,1 g mol<sup>-1</sup>. **Rendimento**: 0,0640 g (53,00%).

### 3.2.1.5. Síntese do complexo [Ru(H<sub>2</sub>O)(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

Em um balão de 50 mL adicionou-se uma mistura de 40 mL de etanol e água (75% de etanol e 25% de água). Em seguida, foram adicionados 0,1783 g do complexo precursor [RuCl<sub>3</sub>(tpy)] (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (0,72 mmol). A solução foi mantida sob agitação durante 30 min., para a redução do íon metálico, de Ru<sup>III</sup> para Ru<sup>II</sup>. O processo de redução do íon metálico foi acompanhado pela mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. Posterior à redução do íon metálico, foram adicionados 0,0432 g do ligante *o*-fenilenodiamina (bd) (0,40 mmol). A solução foi mantida sob refluxo (T ≈ 80 °C) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>), para o

fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração ( $T \approx 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O volume da solução foi reduzido via rotaevaporação, a fim de facilitar o processo de precipitação. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

$\text{MM} = 742,1\text{ g mol}^{-1}$  **Rendimento** = 0,0767 g (50,94%).

### 3.2.2. Preparo de soluções

#### 3.2.2.1. Preparo da solução tampão Tris (50 mmol L<sup>-1</sup>) NaCl (5 mmol L<sup>-1</sup>) (pH=7,40)

Para a preparação do tampão pesou-se 0,6057 g de tris(hidroximetil)aminometano ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) e 0,02925 g de cloreto de sódio (NaCl), sendo ambos dissolvidos em 100 mL de água ultrapura. Obtendo uma solução com  $\text{pH} \approx 10,40$ , foram adicionadas gotas de solução HCl ( $6\text{ mol L}^{-1}$ ) até atingir  $\text{pH} = 7,40$ .

#### 3.2.2.2. Preparo da solução de ácido desoxirribonucleico de esperma de salmão (ss-DNA)

Para a preparação da solução estoque de DNA pesou-se 5 mg de ácido desoxirribonucleico de esperma de salmão (ss-DNA) e dissolveu-se em 5 mL de tampão Tris (50 mmol L<sup>-1</sup>) NaCl (5 mmol L<sup>-1</sup>) (pH=7,40). A concentração da biomolécula foi determinada considerando sua absorvância em 260 nm ( $\epsilon = 6600\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , FIGUEIROA-DEPAZ, *et al.*, 2022), utilizando uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico. A solução foi mantida refrigerada entre 2-10 °C em banho de gelo.

#### 3.2.2.3. Preparo da solução estoque dos complexos terpiridina de rutênio (II) (1 mmol L<sup>-1</sup>)

Para a preparação da solução estoque de complexo pesou-se 3,10 mg de  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  e dissolveu-se em 5 mL de tampão Tris (50 mmol L<sup>-1</sup>) NaCl (5 mmol L<sup>-1</sup>) (pH = 7,4). A solução foi mantida protegida da luz.

O mesmo foi realizado para os demais complexos, considerando de 3,71 mg  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ , 4,53 mg  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  e 3,16 mg de  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ .

### **3.2.3. Caracterização físico-química dos complexos terpiridina de rutênio (II)**

#### **3.2.3.1. Análises condutimétricas**

Os valores de condutividade molar para os complexos foram obtidos utilizando-se um condutivímetro da marca Tecnopon®, de modelo mCA-150, equipado com uma cela de platina, de constante igual a 1. Para as análises, preparam-se soluções dos complexos a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, em acetonitrila (ACN).

#### **3.2.3.2. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)**

As amostras foram analisadas em estado sólido e em solução, utilizando-se um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, sendo submetidas à varredura espectrofotométrica de 4000 à 220 cm<sup>-1</sup>. Para as análises em solução, o PBS foi considerado na linha de base (branco).

Os espectros vibracionais na região do IV em estado sólido foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer®, de modelo FT-IR Frontier Single Range. O equipamento utilizado está lotado no Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), do Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM), do Instituto de Química (IQ), da UFU. Para os espectros obtidos em solução utilizou-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo FTIR Cary 630. Tal equipamento está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

#### **3.2.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Os cromatogramas foram obtidos utilizando-se um equipamento da marca Waters, de modelo e2695; com detector de arranjo de diodos, de modelo 2998 PDA. Utilizou-se uma coluna da marca Aligent®, de modelo Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm d.i.), constituída por partículas de 5 µm. Esse equipamento encontra-se na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Como fase móvel utilizou-se uma mistura de uma solução tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (pH = 7,40) com metanol (MeOH). A eluição da fase móvel foi isocrática e o fluxo foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>.

Para a preparação da solução tampão fosfato a 0,1% de TFA (pH = 7,40), pesou-se 0,6076 g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,8580 g de monohidrogenofosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); foram adicionados, ainda, 0,5 mL de Ácido trifluoroacético (TFA). Os sólidos foram então dissolvidos em água ultrapura, totalizando 500 mL de solução. Para o ajuste do pH = 7,40, foram adicionadas gotas de uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>.

Para as análises, prepararam-se soluções dos complexos a 1 mmol L<sup>-1</sup>, em tampão fosfato a 0,1% de TFA, sendo injetados volumes de 20 µL das soluções dos complexos.

#### 3.2.3.4. Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível (UV/Visível)

Os espectros de absorção na região do UV/Visível foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro e um sistema termostático da marca Agilent Technologies®, Cary Series, sendo o espectrofotômetro de modelo UV-Vis.-NIR. Esse equipamento encontra-se na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU. As amostras foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

#### 3.2.3.5. Determinação da lipofilicidade

A determinação da lipofilicidade dos complexos de rutênio (II) foi obtida a partir dos valores de log P, utilizando-se o Método Shake-Flask. Para as análises, inicialmente, em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 6,5 mL de água e 6,5 mL de octanol. Em seguida, foram adicionados 1,2 mg\* do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub>. A mistura foi mantida sob agitação em um misturador de rolos (50 rpm) durante 24 h, protegida da luz. Após esse tempo, a mistura foi mantida sob repouso durante 1 h. Observou-se a separação das fases aquosa e orgânica.

Posteriormente, em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, foram adicionados 2,5 mL de água. Foi adicionada uma alíquota de 500 µL da fase aquosa. A amostra foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm. Os valores de log P foram determinados como mostra a Equação 1:

$$\log P = \frac{[\text{complexo}]_{\text{octanol}}}{[\text{complexo}]_{\text{água}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (≈30 °C).

\*Para os complexos [Ru(H<sub>2</sub>O)(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> e [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> lê-se 1,5, 1,4 e 1,0 mg, respectivamente.

### **3.2.4. Estudo da estabilidade dos Complexos Terpiridina de Rutênio (II) em tampão Tris**

Os estudos de estabilidade para os complexos de rutênio em tampão Tris (pH=7,4) foram realizados submetendo as soluções dos complexos preparadas neste tampão à varredura espectroscópica na região do UV/Visível no momento do preparo e após 60 minutos de dissolução. A varredura foi realizada utilizando uma cubeta com 1,0 cm de caminho óptico. As soluções foram mantidas protegidas da luz e na temperatura de 37 °C.

### **3.2.5. Estudo das interações entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II)**

#### **3.2.5.1. Estudo das interações entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia de dicroísmo circular (CD)**

Os espectros de dicroísmo circular de *ss*-DNA puro e *ss*-DNA na presença dos complexos foram registrados em uma faixa de 230 a 350 nm, com resolução de 0,5 nm, usando velocidade de varredura de 100 nm min<sup>-1</sup> e tempo de resposta de 0,5 s, em um espectropolarímetro Jasco J-810. Os espectros apresentados foram uma média de quatro varreduras sucessivas. O equipamento utilizado está lotado na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, no Laboratório de pesquisa do Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira.

As soluções foram preparadas em tampão Tris (50 mmol L<sup>-1</sup>) NaCl (5 mmol L<sup>-1</sup>) (pH = 7,40) à temperatura ambiente, usando uma cubeta de quartzo de comprimento óptico de 10 mm. A solução de *ss*-DNA foi fixada na concentração de 250 µmol L<sup>-1</sup> em todas as varreduras. As concentrações de complexo variaram em 25, 62,5 e 87,5 µmol L<sup>-1</sup> em cada varredura. Todas as misturas de *ss*-DNA e complexo foram subtraídas usando um branco contendo solução tampão e complexo nas mesmas condições. Todas as soluções de complexo na presença de *ss*-DNA foram incubadas por 1 h antes das medições.

#### **3.2.5.2. Estudo das interações entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia na região do UV/Visível**

Em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, foram adicionados 100 µL de complexo (1,0 mmol L<sup>-1</sup>), e 1900 µL do tampão Tris (50 mmol L<sup>-1</sup>) NaCl (5 mmol L<sup>-1</sup>) (pH =

7,40). A amostra foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm após 5 minutos de incubação a 37 °C.

Para as demais análises, a concentração de complexo manteve-se fixa, enquanto foram adicionados 9 µL da solução de *ss*-DNA ( $\approx 3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a cada varredura espectrofotométrica, totalizando 9 adições e obtendo assim soluções com 9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72 e 81 µL da biomolécula. As varreduras foram feitas considerando 5 minutos de incubação e temperatura de 37 °C a cada adição de *ss*-DNA. As análises foram realizadas em duplicata.

### 3.2.5.3. Obtenção da constante de interação entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II)

Para a determinação da constante de interação ( $K_b$ ) utilizou-se a Equação 2, proposta por Benesi-Hildebrand (1949).

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{HG} - \varepsilon_G} * \frac{1}{K_b [DNA]} \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual  $A_0$  é a absorvância referente ao complexo no comprimento de onda estudado sem DNA,  $A$  é a absorvância referente ao complexo no comprimento de onda estudado após adições em série de alíquotas de DNA,  $\varepsilon_G$  é a absorvância molar do complexo no comprimento de onda estudado,  $\varepsilon_{HG}$  é a absorvância molar no comprimento de onda estudado para o aduto complexo e DNA,  $K_b$  é a constante de ligação e  $[DNA]$  é a concentração de DNA. A razão entre o coeficiente linear e o angular em um gráfico de  $A_0/A-A_0$  em função de  $1/[DNA]$  fornece o valor de  $K_b$ .

### 3.2.5.4. Estudo de desnaturação térmica do *ss*-DNA na presença dos complexos terpiridina de rutênio (II)

Uma solução contendo  $100 \text{ µmol L}^{-1}$  de *ss*-DNA foi comportada em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, sendo mantida à temperatura de 10 °C por 5 minutos. Após esse tempo, a solução foi submetida a varredura espectrofotométrica na região UV/Vísivel de 200 a 800 nm. A mesma solução foi então submetida às temperaturas de 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90 °C, sendo realizado uma varredura a cada mudança de temperatura, considerando 5 minutos de incubação.

O mesmo procedimento foi realizado para misturas de *ss*-DNA com complexo, nas quais encontravam-se  $100 \text{ µmol L}^{-1}$  de *ss*-DNA e  $10 \text{ µmol L}^{-1}$  de complexo em solução.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físico-químicas de cada um dos complexos foram obtidas a partir das técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia na região do Infravermelho (IV), Espectroscopia na Região Ultravioleta-Visível (UV/Vis), análise condutimétrica e determinação da lipofilicidade (Log P).

### 4.1. Caracterização dos complexos terpiridina de rutênio (II)

#### 4.1.1. Análise Condutimétrica

Com a aplicação de um campo eletrostático, o movimento de partículas com cargas positivas e negativas geram condução de eletricidade. Partindo desse princípio, a condutometria é a técnica capaz de medir a condutividade elétrica de soluções iônicas, isto é, soluções que possuem cátions e ânions, e assim quantificar as cargas presentes em solução. Considerando que complexos metálicos podem ser catiônicos ou aniônicos, essa técnica é aplicada para caracterização dessa classe de compostos desde os primeiros estudos realizados por Werner (VELHO, 2006).

Sendo a água um solvente com moléculas capazes de se coordenar a um centro metálico e considerando ainda que em muitos casos complexos metálicos não são solúveis em água, as medidas de condutância são, geralmente, realizadas em solventes orgânicos. No trabalho atual, os resultados foram obtidos em acetonitrila (ACN) (GEARY, 1971). A Tabela 2 apresenta os valores de condutividade molar referentes a cada um dos complexos.

**Tabela 2.** Valores de condutividade molar ( $\Lambda_m$ ) em acetonitrila (ACN) para os complexos terpiridina de rutênio (II) (T=28 °C).

Complexo	Condutividade molar ( $S\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ )
[RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	131,98
[Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	201,40
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	508,20
[Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	130,80

Fonte: Autora

De acordo com os valores de condutividade molar para complexos metálicos estabelecida por Velho (2006), os valores obtidos em acetonitrila para essa série de complexos

permitem identificar que o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  é um eletrólito do tipo 1:1, assim como o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ . O complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  é do tipo 2:1, enquanto  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  é um eletrólito do tipo 3:1 (VELHO, 2006; GEARY, 1971).

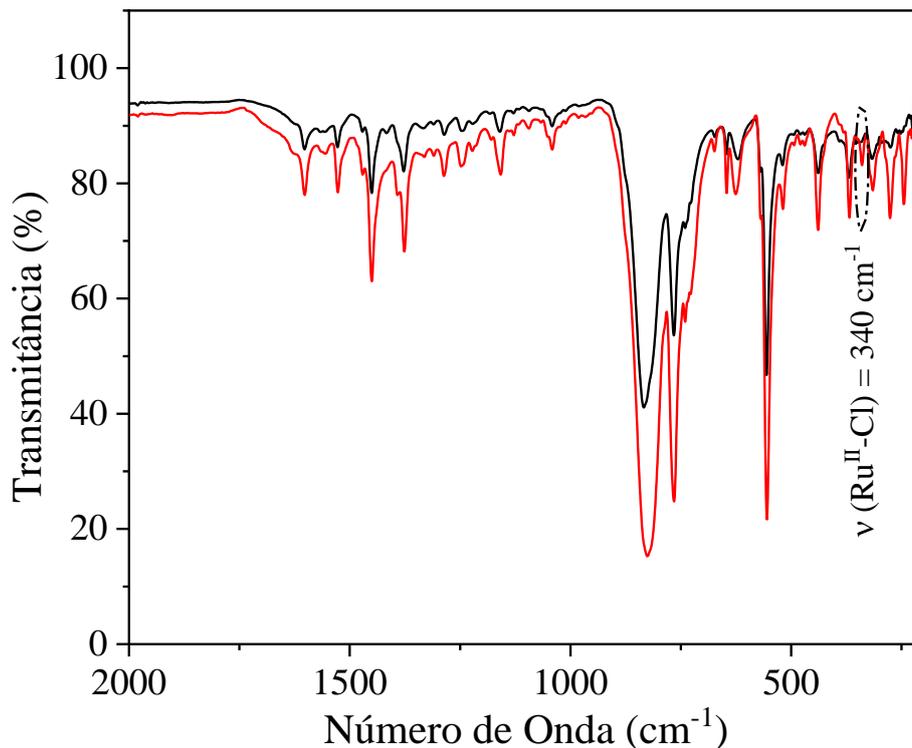
#### 4.1.2. Espectroscopia da região do Infravermelho (IV)

A grande maioria dos compostos que possuem ligações covalentes, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, são passíveis de absorver na região do Infravermelho (IV). Ao absorver a radiação IV a molécula apresenta uma variação no momento de dipolo durante os movimentos rotacional ou vibracional. Essa variação é causada quando o campo elétrico da radiação IV interage com a molécula. Isso significa que, se a frequência de radiação é exatamente igual a frequência de vibração ou rotação natural da molécula, ocorre absorção da radiação e, conseqüentemente, ocorre variação na amplitude do movimento (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

A absorção da radiação IV é um processo quantizado e, como cada tipo de ligação tem sua própria frequência de vibração ou rotação, uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação. Assim, a espectroscopia na região do Infravermelho permite a identificação dos tipos de ligações presentes na estrutura de um composto. Essa identificação é fundamental para complexos metálicos que possuem ligantes ambidentados, pois esclarece qual átomo do ligante está coordenado ao centro metálico. Os ligantes nitro ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrosil ( $\text{NO}^+$ ), por exemplo, podem se coordenar tanto pelo átomo de nitrogênio quanto pelo átomo de oxigênio presentes em sua estrutura química. (PAVIA, *et al.*, 2015; SHRIVER & ATKINS, 2008)

A Figura 11 apresenta o espectro vibracional referente aos complexos  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ .

**Figura 11.** Espectro vibracional na região do IV para o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (-) e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  (-) em ATR.

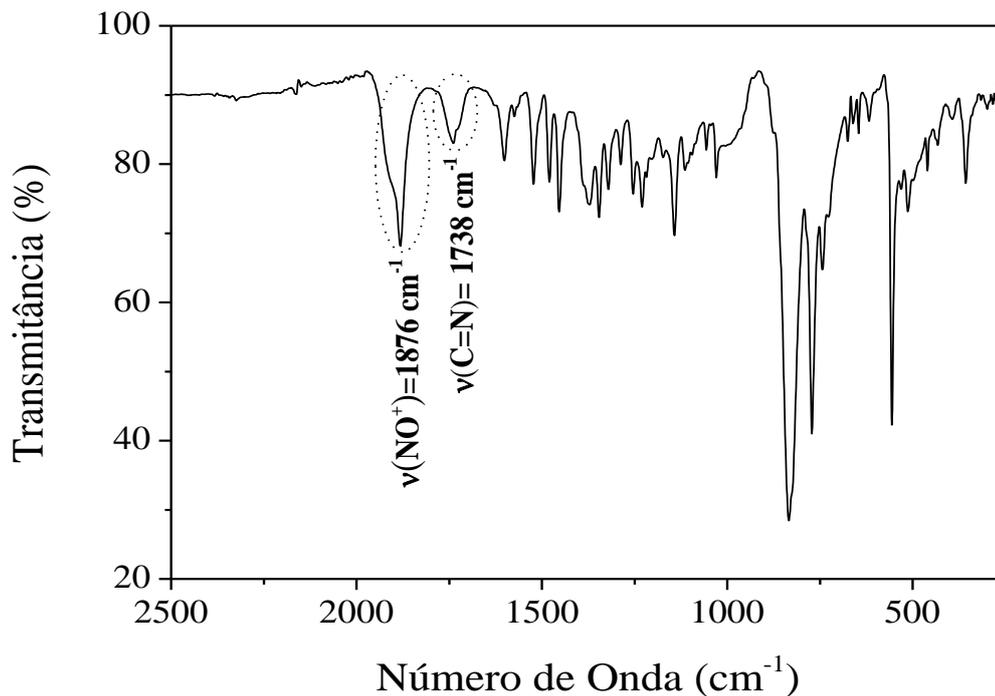


Fonte: Autora

Atribui-se, para ambos os complexos, os estiramentos entre  $1600$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  às ligações  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}=\text{N}$  presentes no ligante tpy. Os espectros exibem ainda, estiramento em  $829\text{ cm}^{-1}$  referente às ligações  $\text{P}-\text{F}$  do contra-íon  $\text{PF}_6^-$  e estiramento em  $557\text{ cm}^{-1}$  atribuído às ligações  $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{N}$ . No espectro vibracional do complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  o estiramento observado em  $340\text{ cm}^{-1}$  é referente à ligação  $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{Cl}$ , como sugere Vriends e colaboradores (1978). Os estiramentos referentes à ligação  $\text{O}-\text{H}$  na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  não foram observados no espectro do aqua complexo, devido a sobreposição dos estiramentos referentes às ligações  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}=\text{N}$  presentes no ligante tpy nessa mesma região.

O espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  é apresentado na Figura 12.

**Figura 12.** Espectro vibracional na região do IV para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  em ATR.

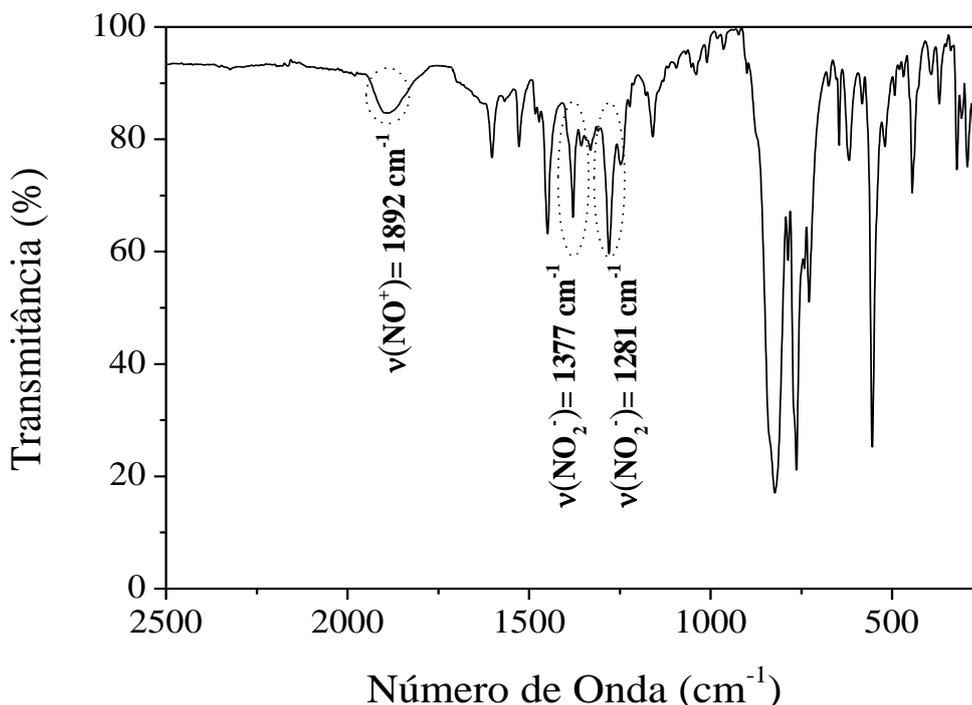


Fonte: Autora

No espectro vibracional para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  observa-se estiramentos referentes às ligações C=C e C=N presentes no ligante tpy, localizados entre 1600 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ . O estiramento em 1738  $\text{cm}^{-1}$  faz referência à ligação C=N, em 833  $\text{cm}^{-1}$  é referente às ligações P-F do contra-íon  $\text{PF}_6^-$  e em 557  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído às ligações  $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{N}$ . Além disso, o estiramento intenso observado em 1876  $\text{cm}^{-1}$  é característico da ligação  $\text{N}\equiv\text{O}^+$ , quando há a coordenação do íon  $\text{NO}^+$  através do átomo de nitrogênio.

Por fim, a Figura 13 apresenta o espectro vibracional referente ao complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ .

**Figura 13.** Espectro vibracional na região do IV para o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  em ATR.

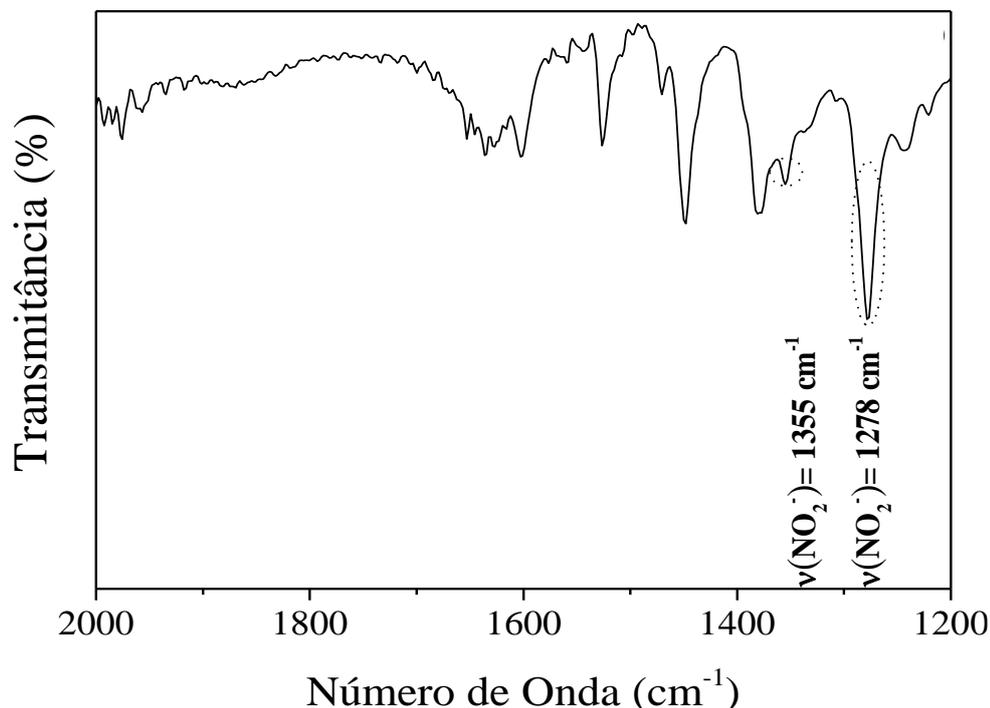


Fonte: Autora

Nesse espectro, os estiramentos observados entre 1600 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos às ligações C=C e C=N do ligante tpy. O estiramento em 825  $\text{cm}^{-1}$  é caracterizado pelas ligações P-F do contra-íon  $\text{PF}_6^-$  e o estiramento em 554  $\text{cm}^{-1}$  é referente às ligações  $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{N}$ . Além disso, o estiramento assimétrico em 1377  $\text{cm}^{-1}$  e o simétrico em 1281  $\text{cm}^{-1}$  são inerentes ao ligante  $\text{NO}_2^-$ , quando há a coordenação do íon  $\text{NO}_2^-$  por meio do átomo de nitrogênio.

Entretanto, observa-se também, em 1892  $\text{cm}^{-1}$ , um estiramento atribuído à ligação  $\text{N}\equiv\text{O}^+$ . A presença desse tipo de ligação no complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  pode ser justificada pelo fato de que os íons amônio, proveniente do sal  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  utilizado durante a síntese, passam pelo processo de hidrólise, liberando  $\text{H}_3\text{O}^+$  e, conseqüentemente, tornando o meio ácido, levando assim à conversão do nitro complexo a nitrosil complexo. Desse modo, acredita-se que o complexo em questão consiste em uma mistura entre as formas  $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$  e  $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$  quando no estado sólido, mas em solução tampão permanece unicamente como nitro complexo, como mostram os resultados das análises cromatográficas que serão apresentados adiante. Além disso, o espectro na região IV para esse complexo em solução tampão fosfato salino (PBS) não apresentou estiramentos referentes à ligação  $\text{N}\equiv\text{O}^+$  (Figura 14).

**Figura 14.** Espectros vibracionais na região do IV para o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  em PBS (pH = 7,4).



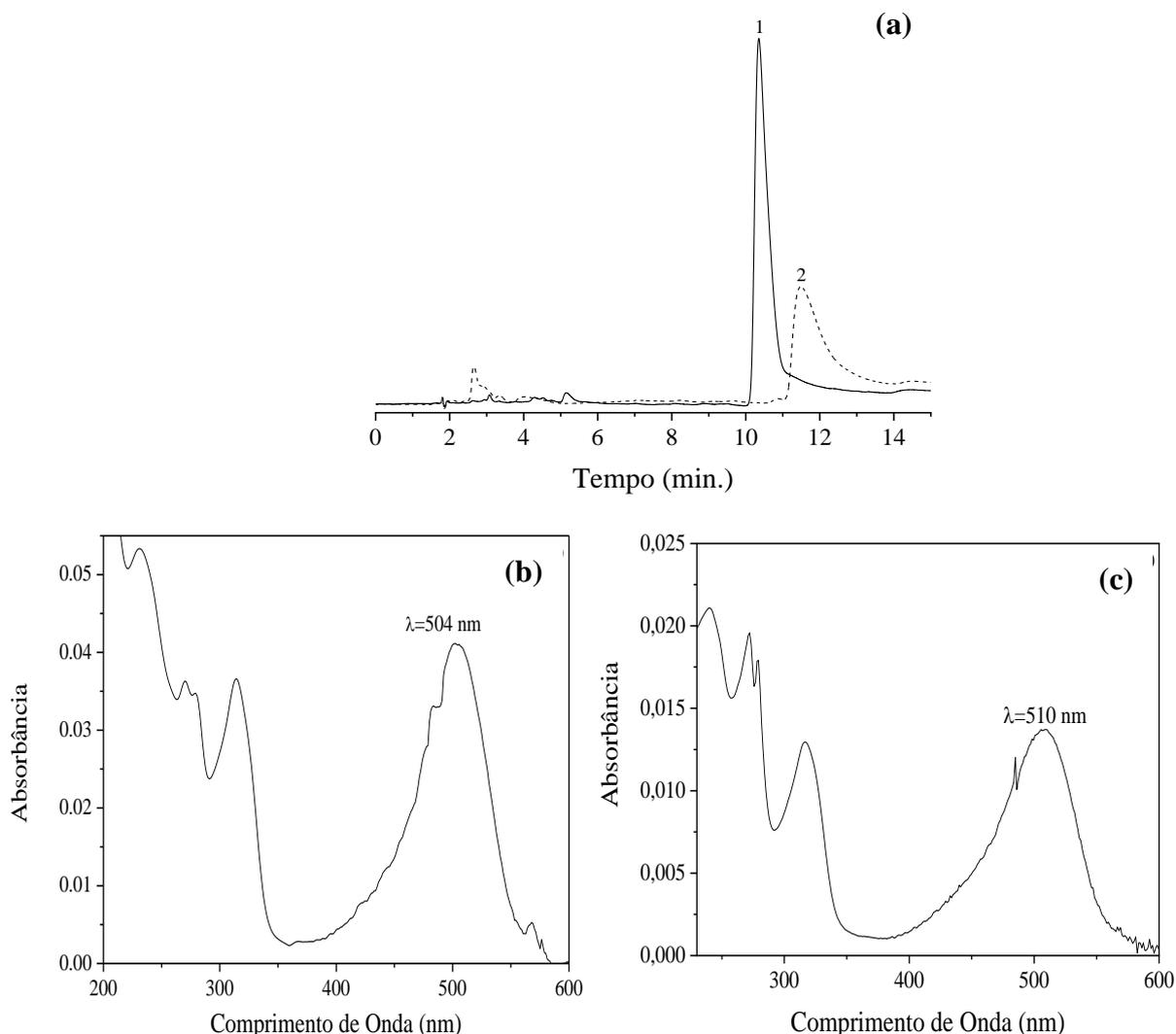
Fonte: Autora

#### 4.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Complexos de  $\text{Ru}^{\text{II}}$  que possuem ligantes polipiridínicos e também possíveis ligantes de saída podem apresentar mudanças significativas quando em solução. Sendo o ligante clorido ( $\text{Cl}^-$ ) um ligante lábil, em presença do ligante aquo pode ocorrer o processo de aquação, formando aqua complexos (SHRIVER & ATKINS, 2008). Os aqua complexos ( $\text{Ru}^{\text{II}} - \text{H}_2\text{O}$ ), por sua vez, podem se apresentar também como compostos com hidroxila ( $\text{Ru}^{\text{II}} - \text{OH}$ ) a depender o pKa do complexo (HUANG, *et al.*, 2015; CHRZA NOWSKA *et al.*, 2017). Os nitrosilos complexos ( $\text{Ru}^{\text{II}} - \text{NO}^+$ ) podem também se encontrar na forma de nitro complexos ( $\text{Ru}^{\text{II}} - \text{NO}_2^-$ ) a depender do pH da solução (SAUAIA & da SILVA, 2003). Sabendo disso, é fundamental a realização do estudo de estabilidade dessa série de compostos em solução.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permite a separação e identificação de misturas que contenham compostos estruturalmente similares e, por isso, pode ser aplicada no estudo da estabilidade dos complexos em solução. Para isso, as análises via CLAE foram realizadas no instante e após 2h de dissolução dos complexos. A Figura 15 apresenta o cromatograma referente ao complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  em ambos os tempos.

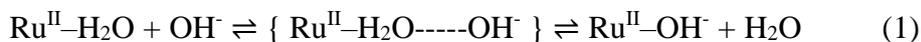
**Figura 15.** Cromatogramas para o complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (—) e 2h (---). T = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível. Referente aos picos 1 (b) e 2 (c).



Fonte: Autora

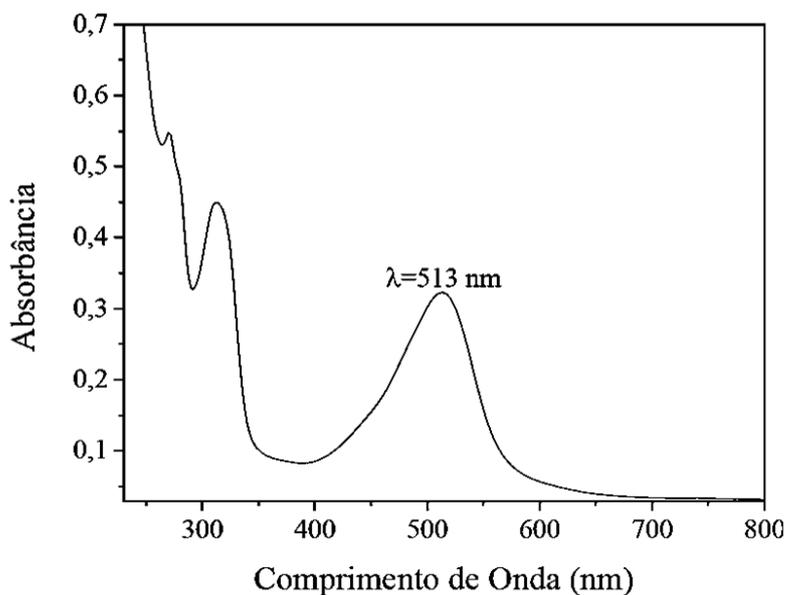
A Figura 15 demonstra que no instante da dissolução do complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ , o cromatograma exibe um pico com  $t_r = 10,35$  min (pico 1) e, após 2h de dissolução, apresenta um pico com  $t_r = 11,48$  min (pico 2). Considera-se que o pico 1, possivelmente, faz referência ao complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ , e que o pico 2 faz referência à conversão do aqua complexo em  $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ , como mostra o Esquema 1. Isso porque, o espectro eletrônico referente ao pico 1 apresenta uma banda TCML em 504 nm, característico de complexos aquo. O espectro eletrônico referente ao pico 2, porém, apresenta a banda TCML em uma região de menor energia, o que indica a presença de um ligante campo fraco, como é o  $\text{OH}^-$  em relação ao aqua.

**Esquema 1.** Esquema reacional simplificado para a conversão do ligante aqua (H<sub>2</sub>O) a hidróxido (OH<sup>-</sup>) em complexos de rutênio(II).



Essa afirmação é sustentada ao observar o espectro eletrônico qualitativo do complexo [Ru(H<sub>2</sub>O)(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em meio básico (pH = 13,0). Como mostra a Figura 16, o hidróxido complexo apresenta a banda TCML na região de λ=513 nm, semelhante a banda na região do visível referente ao pico 2 do cromatograma na Figura 15.

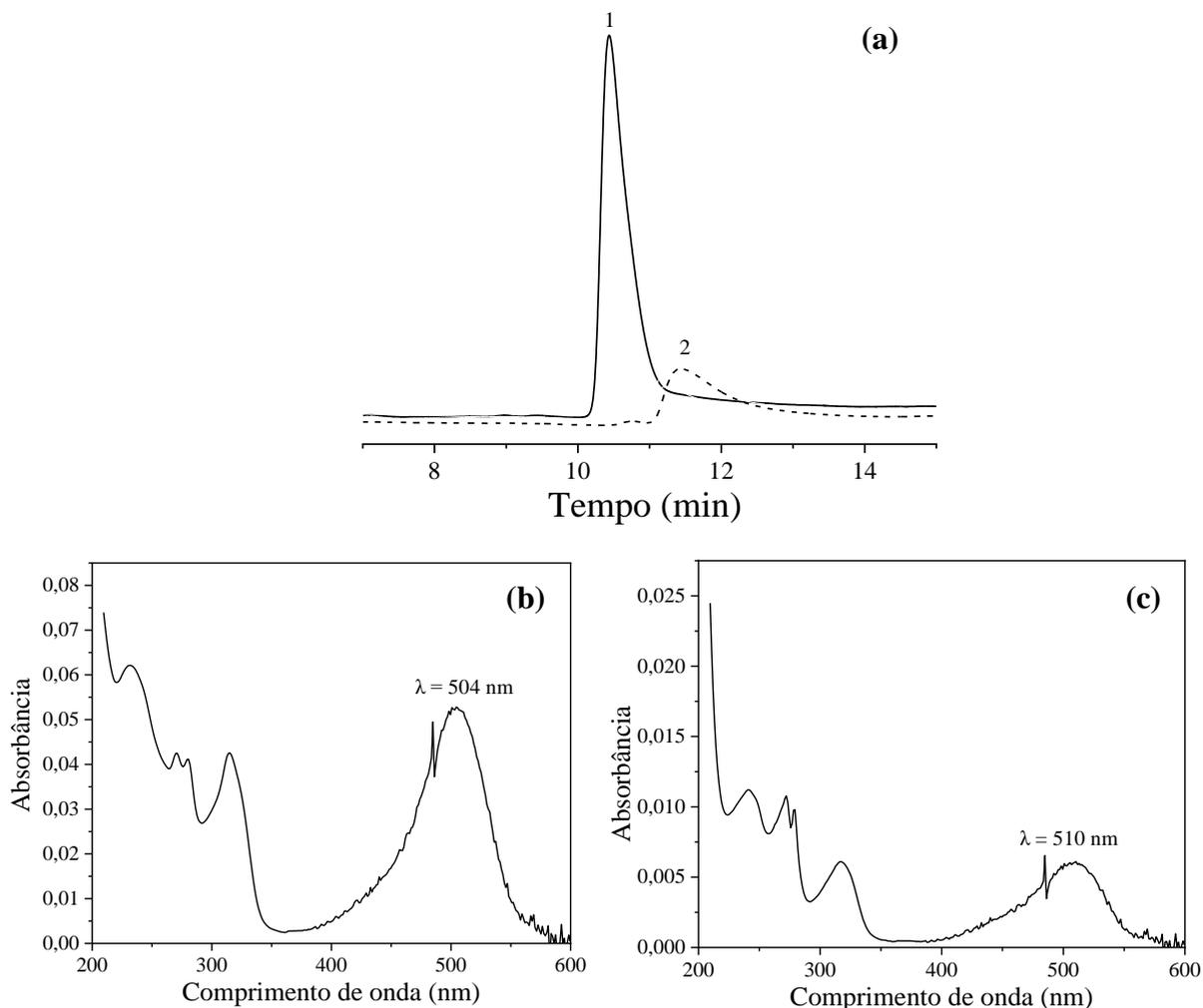
**Figura 16.** Espectro eletrônico qualitativo para o complexo [Ru(OH)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: Bessas (2022)

O cromatograma obtido para o complexo [RuCl(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>) também afirma uma conversão de espécies, quando o complexo se encontra em solução. A Figura 17 apresenta o cromatograma no instante e após 2h de dissolução do composto.

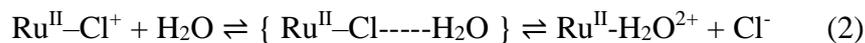
**Figura 17.** Cromatograma para o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$  (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (—) e 2 h (---). T = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível referente aos picos 1 (b) e 2 (c).



Fonte: Autora

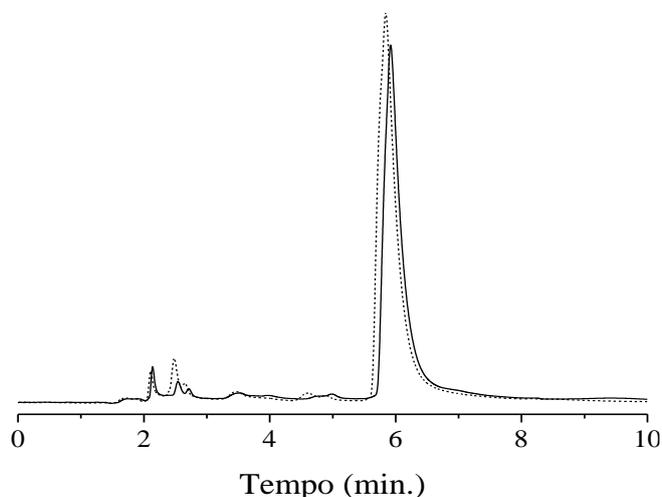
O espectro referente ao pico 1, com  $t_r = 10,45$  min, apresenta uma banda TCLM na região UV-Vis em 504 nm, enquanto o espectro do pico 2, com  $t_r = 11,41$  min, apresenta a banda TCLM em 510 nm. Sendo o ligante clorido lábil, o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$  em solução aquosa pode passar pelo processo de aquação, no qual o ligante clorido é substituído pelo ligante água, formando a espécie  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ . Nota-se, porém, no espectro referente ao pico 2, que a banda se encontra na região de 510 nm, que, como observado para o cromatograma do aqua complexo, faz referência ao complexo com hidroxila. Assim, na solução contendo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$  ocorrem os processos de aquação (simplificado no Esquema 2) e de conversão de aquo a hidroxido complexo.

**Esquema 2.** Esquema reacional simplificado para o processo de aquação do complexo [RuCl(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>).



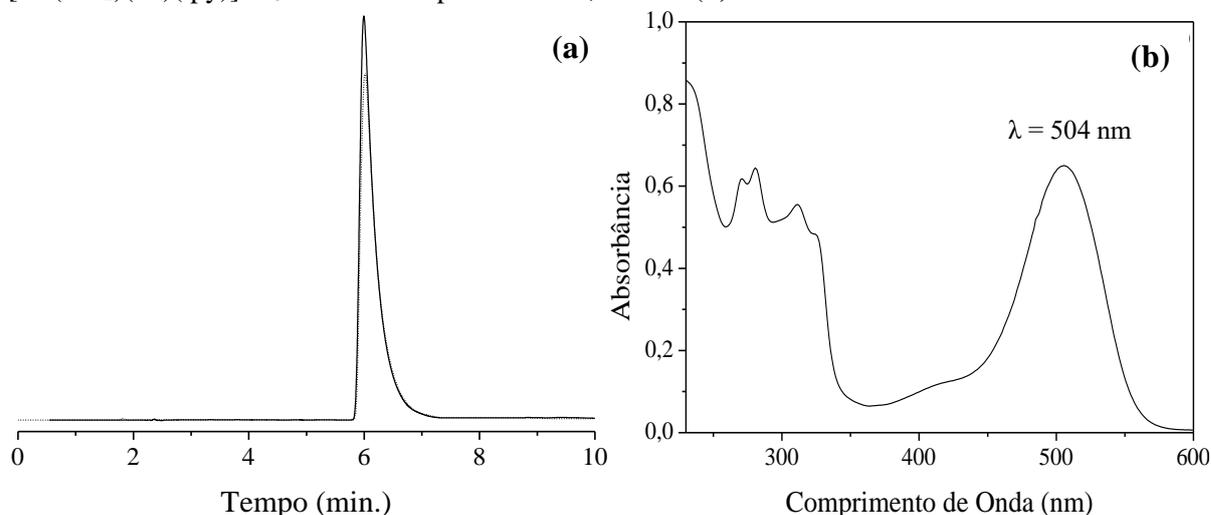
Por fim, as Figuras 18 e 19 apresentam o cromatograma referente aos complexos [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> e [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub>, respectivamente.

**Figura 18.** Cromatogramas para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0h(-) e 2h(---). T=37 °C.



Fonte: Autora

**Figura 19.** Cromatograma para o complexo [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (-) e 2 h (---). T=37 °C. Espectro de absorção na região do UV/Visível. para o com complexo [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> referente ao pico em tr=5,99 min. (b).



Fonte: Autora

Em ambos os casos, os cromatogramas apresentam um único pico e não há diferença no tempo de retenção entre o pico referente ao instante da dissolução e o pico referente a 2 hs após a dissolução. O tempo de retenção para o nitrosil complexo foi de 5,92 min, enquanto para o nitro complexo, foi de 5,99 min. Assim, tanto  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ , quanto  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  são estáveis em solução e não apresentam conversão de  $\text{NO}^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ .

#### 4.1.4. Espectroscopia na região Ultravioleta/Visível

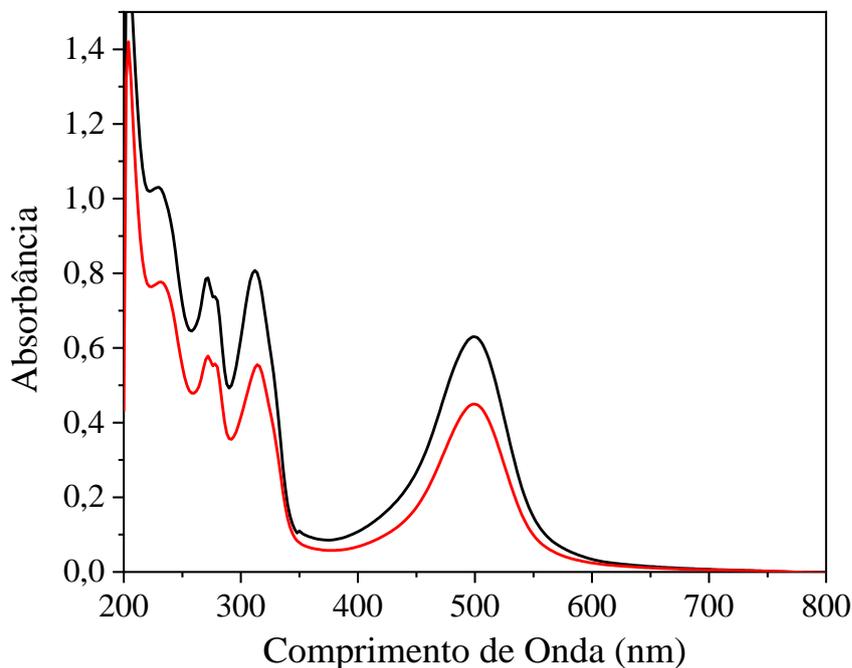
Quando uma molécula absorve energia eletromagnética, os elétrons são promovidos de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia. Na região Ultravioleta-Visível do espectro eletromagnético (200-800 nm), os processos de absorção ocorrem por mudança do estado energético dos elétrons constituintes da molécula, os quais podem ser: (i) elétrons não ligados e pertencentes a um átomo em específico; (ii) elétrons envolvidos em uma ligação química e assim pertencentes a mais de um átomo. (PAVIA, *et al.*, 2015)

Tendo em vista a estrutura dos complexos polipiridínicos de rutênio, essas transições podem ocorrer na região do visível, devido a transições de Campo Ligante (CL) e de Transferência de Carga Metal-Ligante (TCML) e na região ultravioleta, relativo às transições Intraligante (IL).

As transições de Campo Ligante são do tipo  $d \rightarrow d$ , pois ocorrem entre níveis energéticos do metal, sendo originadas do desdobramento do orbital  $d$  do centro metálico. As transições do tipo TCML, por sua vez, ocorrem devido aos orbitais do metal e dos ligantes apresentarem energia próximas e simetrias apropriadas. Nesse caso, quando os elétrons do íon metálico estão em orbitais de simetria  $\pi$  e os orbitais desocupados de menor energia (LUMO) dos ligantes também são de simetria  $\pi$ , ocorrem transições do tipo  $d\pi(\text{M}) \rightarrow p\pi^*(\text{L})$ . Por fim, as transições classificadas como IL são equivalentes às transições dos ligantes quando não estão coordenados, podendo ser devido à elétrons livres ( $n$ ) ou elétrons  $\pi$ , sendo então do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  (de FARIAS, 2005).

A Figura 20 corresponde ao espectro eletrônico dos complexos  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  na região do UV-Vis.

**Figura 20.** Espectro eletrônico para o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (-) e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  (-) a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão Tris (pH = 7,4).

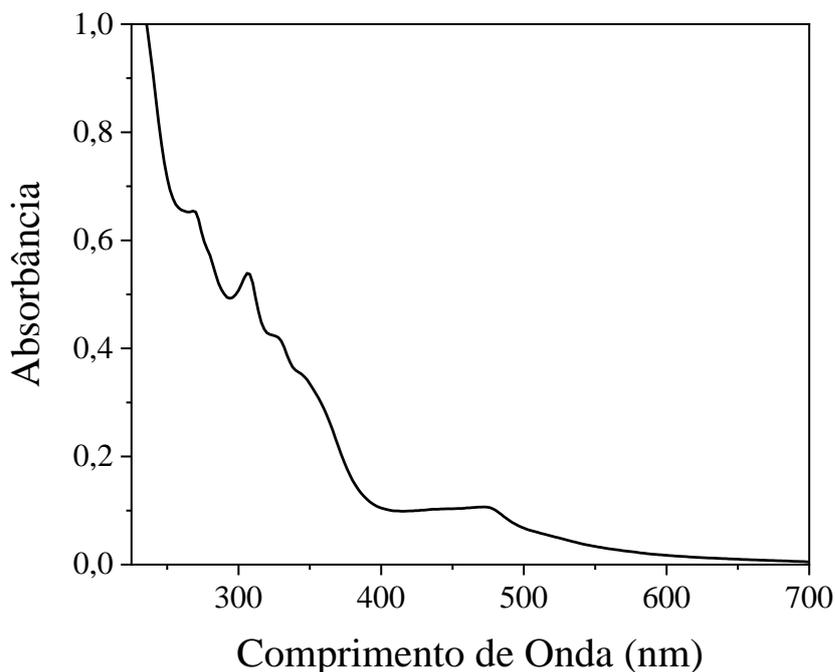


Fonte: Autora

Na Figura 20 observa-se que as bandas eletrônicas em 272, 278, 314 e 500 nm são semelhantes para os complexos  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ , confirmando a reação de conversão da espécie clorido em aqua complexo (vide posteriormente Fig. 24, pág.54). Nesse caso, atribui-se as absorções observadas na região UV (200-400 nm), à transição eletrônica do tipo Intraligante (IL), mais especificamente do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  (bd) e do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  (tpy) para ambos os complexos. Na banda observada em 500 nm a transição eletrônica é caracterizada como Transferência de Carga Metal-Ligante (TCML), sendo referente às transições  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ ,  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$ .

A Figura 21 apresenta o espectro eletrônico referente ao nitrosil complexo.

**Figura 21.** Espectro eletrônico para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  a  $35,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão Tris (pH = 7,4).

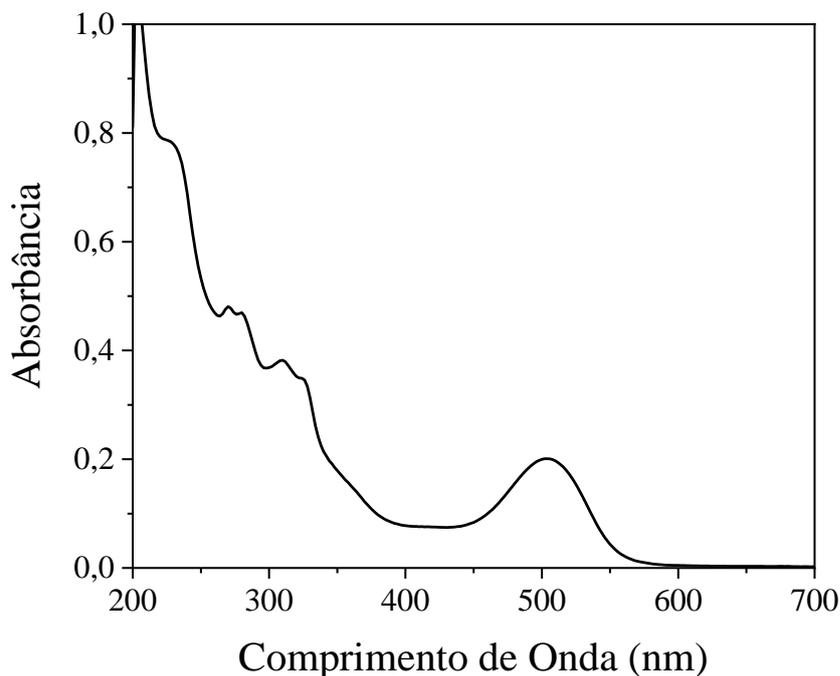


Fonte: Autora

Para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ , o espectro eletrônico exibe absorções em 270, 306, 328 e 472 nm. As bandas observadas em 270 e 306 nm são atribuídas às transições IL, referentes às transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos ligantes bd e tpy. O ombro em 328 nm é caracterizado como uma transição de TCML, do tipo  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$ . A banda de baixa absorção em 472 nm também é descrita como transições de TCML, sendo do tipo  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd e tpy})$ .

Por fim, a Figura 22 apresenta o espectro eletrônico do complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ .

**Figura 22.** Espectro eletrônico para o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  a  $31,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão Tris (pH = 7,4).



Fonte: Autora

O espectro eletrônico do complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  na região do UV-Vis exibe absorções em 270, 280, 310, 326 e 504 nm. As absorções em 270, 280 e 310 nm são atribuídas a transições eletrônicas do tipo intraligante (IL), sendo transições  $\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$ . Em 326 e em 504 nm, tais bandas são caracterizadas como transições do tipo TCML, sendo em 326 nm referente as transições  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$  e  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$  e em 504 nm referente a  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$  e  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$ . A banda em 326 tem ainda contribuição de transição IL, do tipo  $n \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$ .

Comparando as atribuições referente ao nitro e ao nitrosil complexo, há uma diferença considerável entre os valores de energia das bandas de TCML do tipo  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$  e  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$ . Isso porque, o ligante  $\text{NO}^+$  apresenta um maior caráter  $\pi$ -receptor, se comparado ao ligante  $\text{NO}_2^-$ . Consequentemente, a retrodoação para os nitrosilos complexos é maior, e portanto, a energia da transição  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$  é maior que para a transição  $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$  (de LIMA, *et al.*, 2014).

A Tabela 3 apresenta todos os dados espectroscópicos citados e suas respectivas atribuições.

**Tabela 3.** Dados espectroscópicos e suas atribuições para os complexos polipiridínicos de rutênio (II) em tampão Tris (pH = 7,4).

Complexo	$\lambda$ (nm)	Atribuições
[RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	272	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	278	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	314	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	500	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bd)$ e $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(tpy)$
[Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	270	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	278	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	312	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	500	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bd)$ e $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(tpy)$
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	270	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	306	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	328	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bd)$ e $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO^+)$
	472	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bd)$ e $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(tpy)$
[Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	270	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	280	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	310	$\pi \rightarrow \pi^*(bd)$ e $\pi \rightarrow \pi^*(tpy)$
	326	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bd)$ e $n \rightarrow \pi^*(NO_2^-)$
	504	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bd)$ , $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(tpy)$ e $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO_2^-)$

Fonte: Autora

#### 4.1.5. Determinações da lipofilicidade

Considerando que as interações entre os complexos metálicos e a molécula de DNA são realizadas em condições fisiológicas, tornam-se fundamentais a determinação dos coeficientes de partição (log P) para entender o comportamento dos compostos em meio aquoso e apolar. Isso porque, os fármacos devem ser suficientemente lipofílicos para penetrar nos núcleos lipídicos das membranas celulares, mas não tão lipofílicos a ponto de ficarem presos nas mesmas. O log P é o parâmetro numérico que mede o nível de lipofilicidade de um composto, sendo a razão entre a concentração do composto na fase aquosa e a concentração na fase apolar (nesse caso, octanol), após ser aplicado em um sistema contendo ambas as fases (ANDRÉS, *et al.*, 2015). A Tabela 4 apresenta os dados obtidos para essas análises referentes a cada complexo.

**Tabela 4.** Valores de coeficiente de partição (log P) para os complexos.

<b>Complexo</b>	<b>Log P</b>
[RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	-0,31
[Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	-0,57
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	-0,11
[Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	-0,29

Fonte: Autora

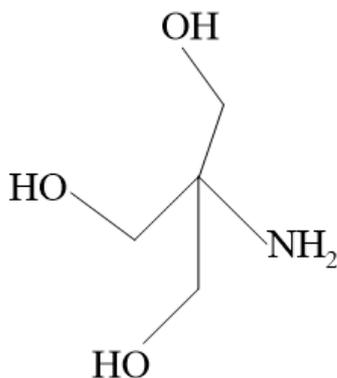
A Equação 1 enuncia que valores negativos de log P indicam maior afinidade do complexo pela água, enquanto valores positivos apontam a maior preferência pela fase orgânica, neste caso, o solvente octanol (ANDRÉS, *et al.*, 2015). Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram uma tendência para maior interação de todos os complexos pela fase aquosa, de maneira que  $\log P$  [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> < [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> ≈ [RuCl(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> < [Ru(H<sub>2</sub>O)(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. Sendo assim, toda a série de complexos desse trabalho é hidrofílica.

#### **4.2. Estudo da estabilidade dos complexos terpiridina de rutênio (II) em tampão Tris (pH=7,4)**

Tendo a função de estabilizar o pH do meio, o tampão é uma solução indispensável em análises com caráter biológico já que, nesses casos, é necessária uma fiel simulação das condições fisiológicas (pH = 7,4 e temperatura 37 °C). Os tampões utilizados em estudos bioquímicos não devem interagir com as biomoléculas e nem afetar as interações biomoleculares em estudo. Apesar de o tampão tris(hidroximetil)aminometano ser amplamente utilizado em análises bioquímicas, devido a sua faixa tamponante na região do pH fisiológico, esse tampão pode interagir com espécies biológicas e ainda com compostos inorgânicos. (JUNGOVÁ, JURGOVÁ & HEMMEROVÁ, 2021; FERREIRA, *et al.*, 2015).

Sendo assim, o estudo de estabilidade dos complexos de rutênio em tampão Tris (pH=7,4) foi realizado a fim de investigar a existência de interações entre os complexos e a molécula do tampão. A molécula de tris(hidroximetil)aminometano (Figura 23) apresenta grupos substituintes, OH e NH<sub>2</sub>, que se comportam como base Lewis devido aos pares de elétrons nos átomos doadores de oxigênio e nitrogênio. Essas bases podem se coordenar ao centro metálico de complexos e, por isso, nos estudos biológicos que se utilizam o tampão Tris é fundamental a avaliação da estabilidade dos complexos metálicos.

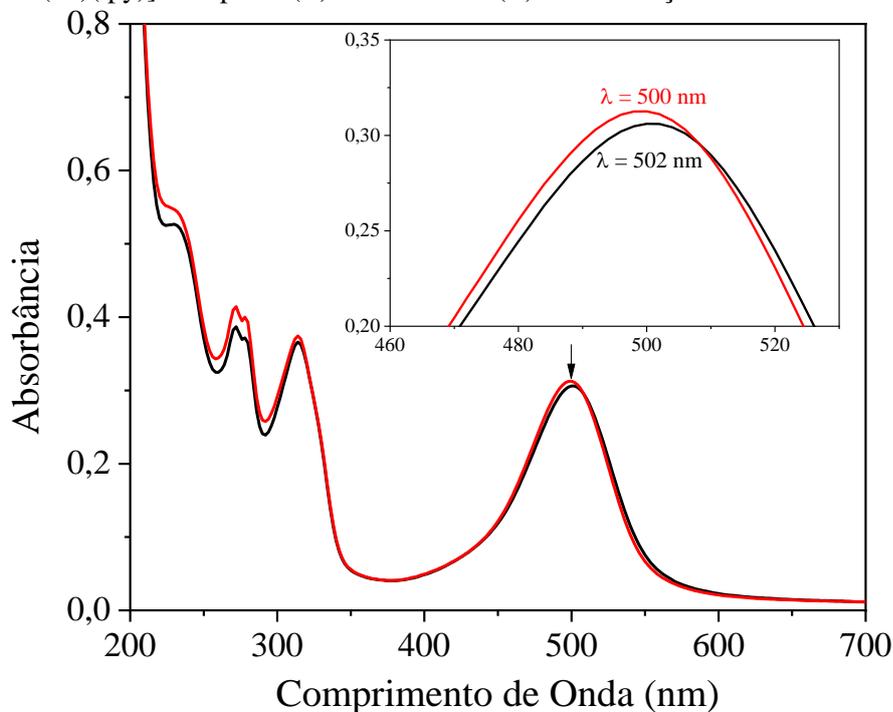
**Figura 23.** Representação da estrutura da molécula de tris(hidroximetil)aminometano



Fonte: Autora

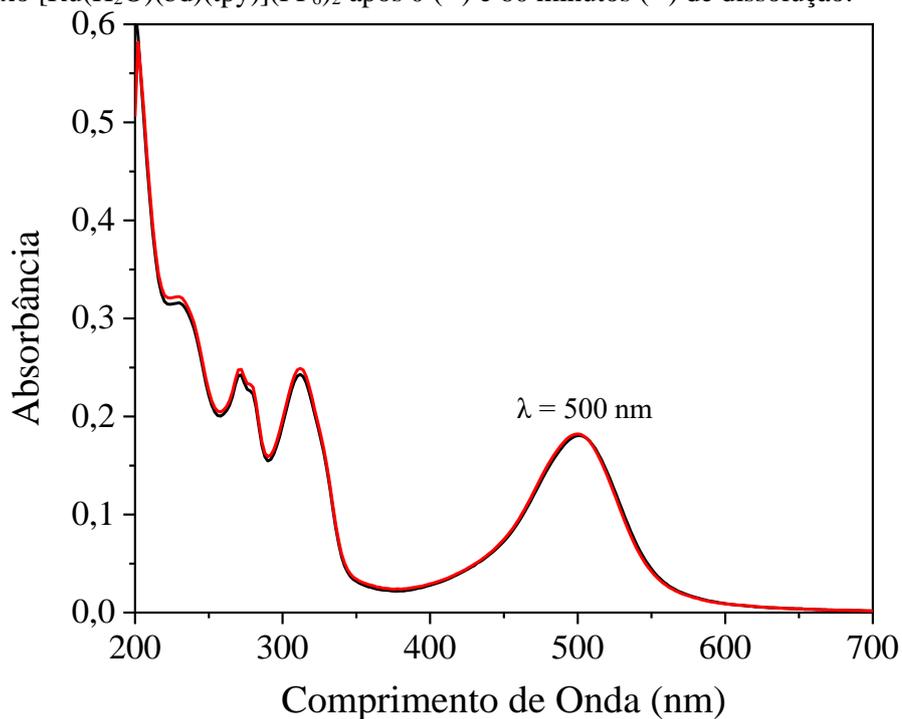
As Figura 24, 25, 26 e 27 apresentam os espectros eletrônicos dos complexos  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ ,  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  e  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ , respectivamente, em presença do tampão Tris (pH=7,4) logo após sua dissolução (em preto) e após 1h de incubação (em vermelho) na temperatura de 37 °C.

**Figura 24.** Espectro eletrônico referente ao estudo da interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  após 0 (--) e 60 minutos (--) de dissolução.



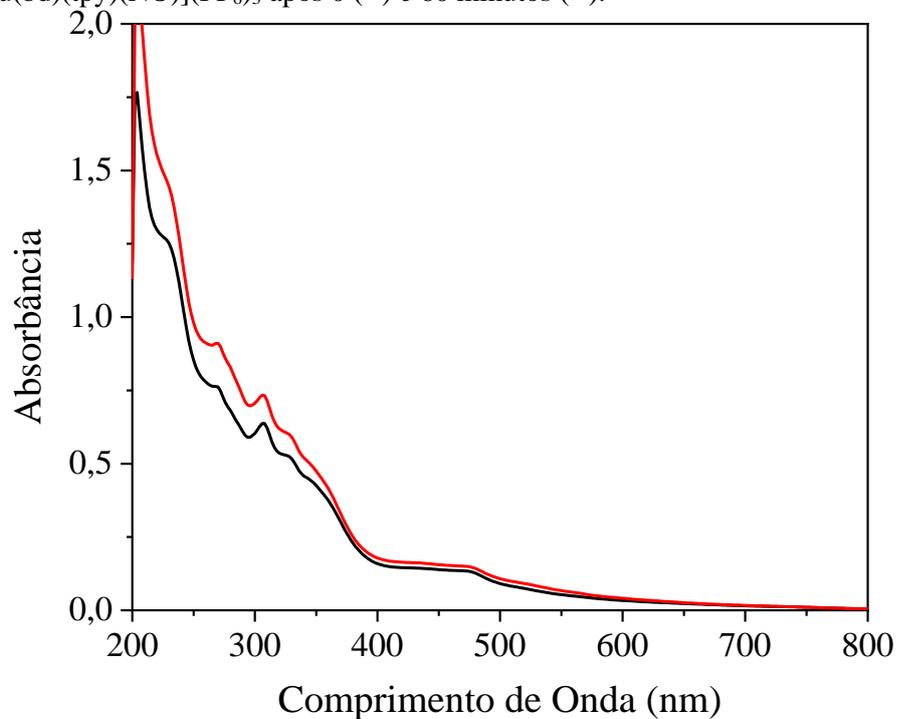
Fonte: Autora

**Figura 25.** Espectro eletrônico referente ao estudo da interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  após 0 (--) e 60 minutos (--) de dissolução.



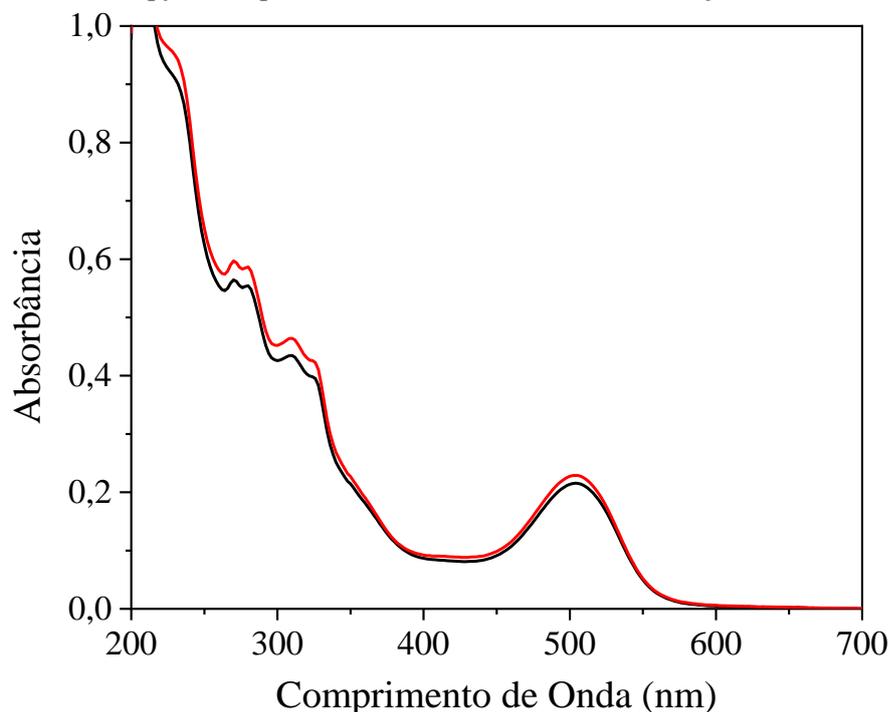
Fonte: Autora

**Figura 26.** Espectro eletrônico referente ao estudo da interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  após 0 (--) e 60 minutos (--).



Fonte: Autora

**Figura 27.** Espectro eletrônico referente ao estudo de interação entre tampão Tris (pH = 7,4) e o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  após 0 (--) e 60 minutos (--) de dissolução.



Fonte: Autora

No espectro referente ao complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (Figura 24) nota-se que a varredura feita após 1 hora apresenta um leve aumento da absorvância e um desvio hipsocrômico de 2 nm na banda TCML. Essa alteração espectral indica a conversão do complexo clorido em aqua. Na Figura 25, após 1 hora de incubação, não ocorreram mudanças espectrais significativas para o complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  indicando estabilidade no tampão Tris.

Os espectros eletrônicos dos complexos  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  e  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  (Figuras 26 e 27, respectivamente) demonstram que após 1 hora de incubação dos complexos no tampão, os valores de absorvância foram consideravelmente maiores que os valores apresentados no primeiro instante da dissolução. Esse efeito é denominado hipercromismo e pode ser justificado pelo aumento progressivo da solubilidade dos complexos na solução em função da temperatura experimental  $37^\circ\text{C}$ .

Assim, pequenas mudanças na absorvância máxima sem deslocamento considerável de comprimento de onda consolidam a estabilidade desses complexos na solução tampão, possibilitando a aplicação do Tris nos estudos de interação com o DNA.

### **4.3. Estudo das interações entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II)**

#### **4.3.1. Estudo das interações entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia de dicroísmo circular (CD)**

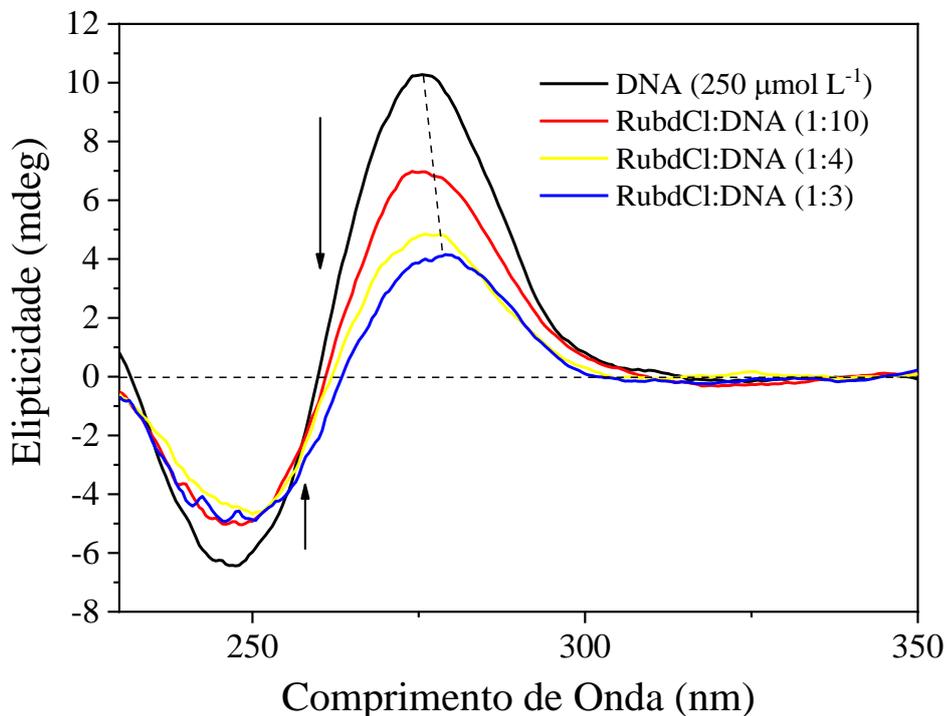
A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica biofísica que se baseia no fenômeno óptico da absorção da luz circularmente polarizada (LCP), sendo particularmente aplicada em amostras contendo compostos quirais. Assim, quando ambas as componentes da luz polarizada (direita e esquerda) interagem com o composto quiral, cada uma é absorvida com uma intensidade distinta. A diferença entre essas intensidades dá origem ao sinal de CD (SOUSA, 2021).

Apesar de as bases nitrogenadas do DNA serem aquirais, ao considerar toda a estrutura helicoidal da biomolécula, a estrutura secundária molecular se torna quiral. Assim, a técnica de dicroísmo circular é amplamente utilizada no estudo das estruturas e das interações realizadas por ácidos nucleicos.

Nos espectros CD do *ss*-DNA livre aparecem duas bandas características: uma entre 240 e 245 nm (banda negativa ou banda B) referente à helicidade do DNA e a outra entre 270 e 275 nm (banda positiva ou banda Z), relacionada ao empilhamento ( $\pi$ -stacking) dos pares das bases nitrogenadas. As variações na intensidade ou o deslocamento dessas bandas sugerem mudanças conformacionais na estrutura da biomolécula (KELLETT, et al., 2019; FIGUEROA-DEPAZ, et al., 2022).

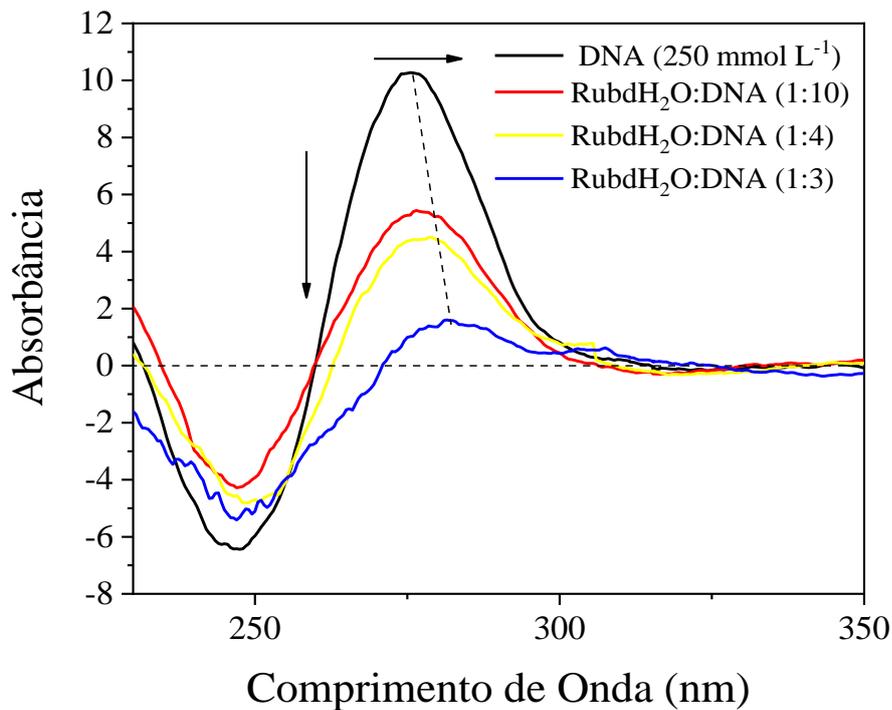
As Figura 28 e 29 apresentam o espectro CD do *ss*-DNA na presença dos complexos  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$  e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ , respectivamente.

**Figura 28.** Espectro de dicroísmo circular para o *ss*-DNA ( $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (--) e presença de 25 (---), 62,5 (---) e 87,5 (---)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ .



Fonte: Autora

**Figura 29.** Espectro de dicroísmo circular para o *ss*-DNA ( $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (--) e presença de 25(---), 62,5(---) e 87,5(---)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ .

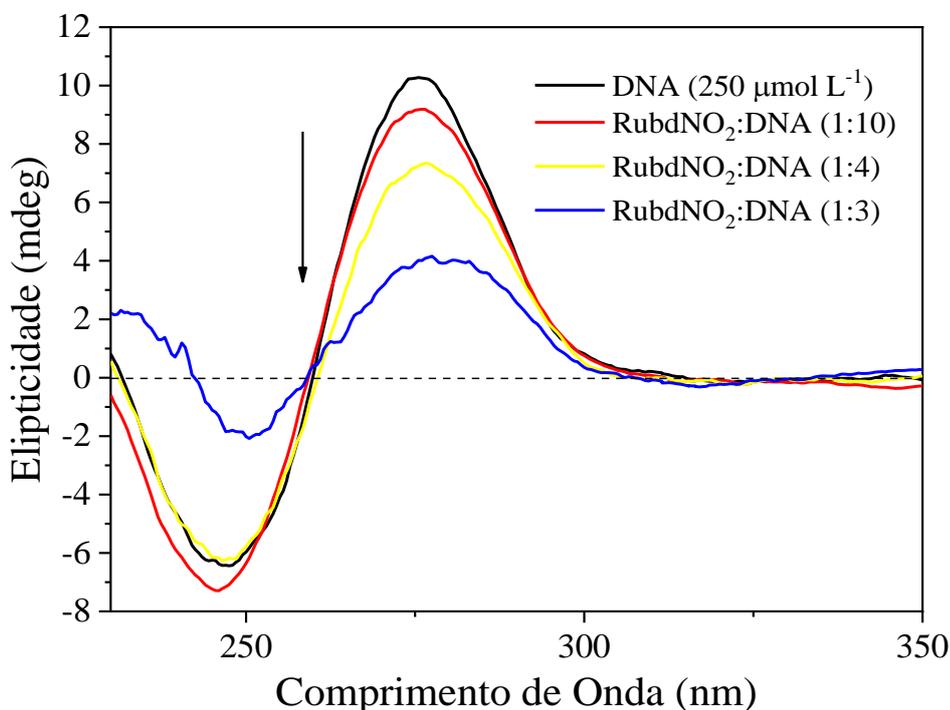


Fonte: Autora

Nota-se no espectro CD do clorido complexo (Figura 28) uma diminuição da intensidade da banda positiva de 61,6%, bem como um deslocamento batocrômico (275 nm → 278 nm) à medida em que a razão complexo:DNA diminui em solução. Na banda negativa, não se vê alteração espectral. Observa-se o mesmo comportamento no espectro CD para o complexo [Ru(H<sub>2</sub>O)(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Figura 29). Nesse caso, porém, a diminuição da intensidade da banda positiva foi de 90,1% e o deslocamento batocrômico foi de 275 nm a 280 nm ao diminuir a razão DNA:complexo. Na banda negativa também não ocorre alteração espectral. Os resultados observados em ambos os casos indicam que a adição dos complexos à solução de *ss*-DNA altera o empilhamento  $\pi$ -stacking do DNA, mas não altera a helicidade da molécula, indicando uma possível intercalação do complexo no polinucleotídeo (CHEN, et al., 2008; HE, et al., 2009).

A Figura 30 apresenta o espectro CD e os efeitos da adição do nitro complexo na solução de *ss*-DNA.

**Figura 30.** Espectro de dicroísmo circular para o DNA (250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão Tris (pH=7,4) em ausência (--) e presença de 25 (---), 62,5 (---) e 87,5 (---)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub>.



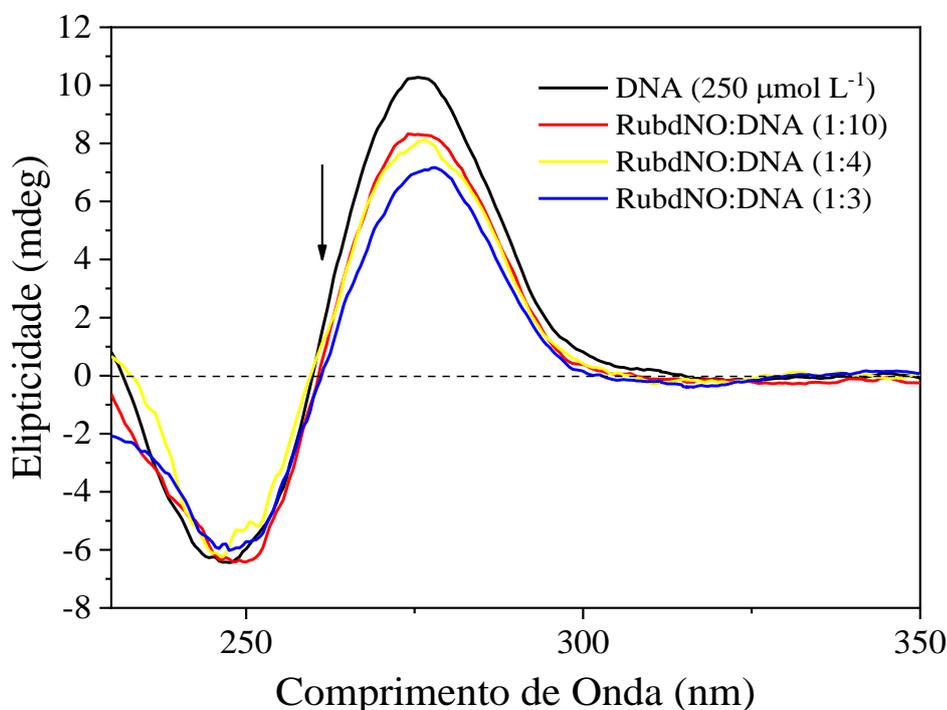
Fonte: Autora

O espectro CD do DNA com o complexo [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> (Figura 30) apresentou um comportamento semelhante ao descrito anteriormente. Nesse caso, porém, a diferença

espectral é mais pronunciada na menor razão DNA:complexo (1:3). Isso significa que a helicidade e o empilhamento  $\pi$ -stacking do DNA são alterados apenas nessa última proporção entre o complexo e a biomolécula. Acredita-se que em menores razões DNA:complexo há uma possível organização dos sistemas para interação via intercalação parcial e em maiores razões DNA:complexo uma tendência a interação eletrostática ou ao sulco menor. (KELLETT, et al., 2019; FIGUEROA-DEPAZ, et al., 2022).

Por fim, o espectro de CD do DNA na presença do complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  é apresentado na Figura 31.

**Figura 31.** Espectro de dicroísmo circular para o DNA ( $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão Tris ( $\text{pH}=7,4$ ) em ausência (--) e presença de 25 (--), 62,5 (--) e 87,5 (--)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ .



Fonte: Autora

Para o espectro CD do DNA na presença do complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  a banda negativa não apresenta nenhuma alteração espectral, enquanto a banda positiva apresentou uma diminuição de apenas 31,8% à medida em que o complexo é adicionado. Essa pequena alteração de intensidade da banda positiva, é um indicativo de que o complexo interfere ligeiramente na interação  $\pi$ -stacking do DNA. Nesse caso, a interação entre o complexo e DNA pode então ser discutida em função da interação ao sulco menor e/ou interação eletrostática (KELLETT, et al., 2019).

#### 4.3.2. Estudo de desnaturação térmica do *ss*-DNA na presença dos complexos terpiridina de rutênio (II)

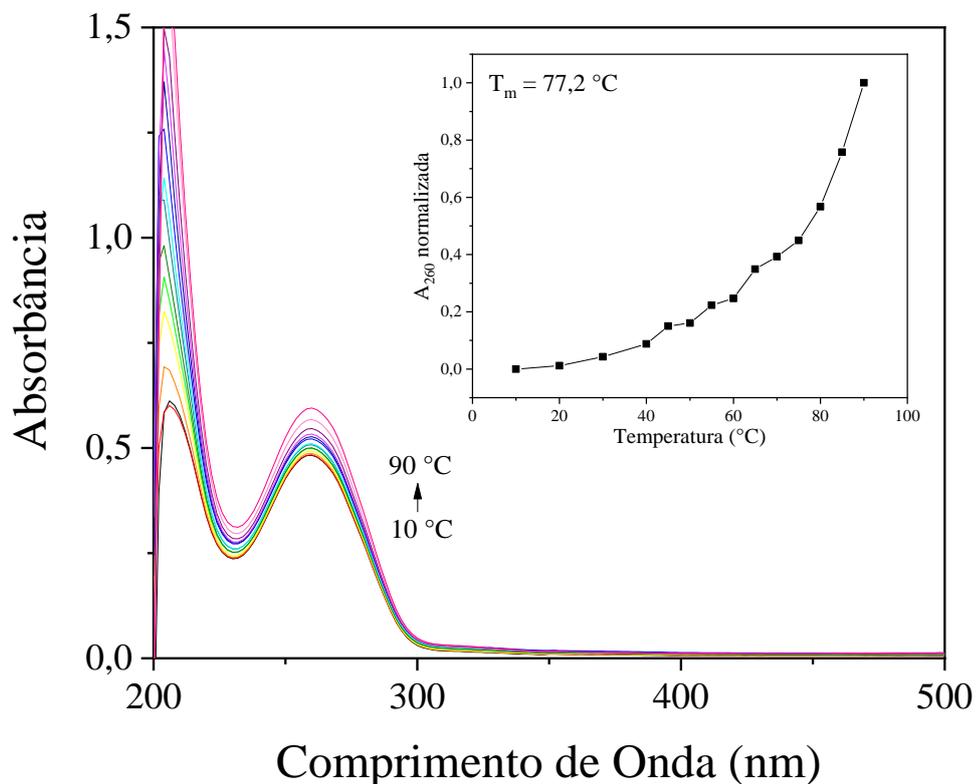
Moléculas bioquímicas, especialmente proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, sofrem mudanças estruturais quando submetidas a condições de temperatura e pH diferentes de suas condições habituais. Essa mudança estrutural é denominada desnaturação. No caso da molécula de DNA, no processo de desnaturação as ligações de hidrogênio estabelecidas entre os pares de bases nitrogenadas são rompidas, provocando o desenrolamento da dupla hélice, de maneira integral ou parcial (NELSON & COX, 2014).

Sendo assim, o aumento gradual da temperatura de uma solução com DNA ocasiona a desnaturação das biomoléculas. Cada espécie de DNA apresenta uma temperatura de desnaturação característica a depender da sequência de pares de bases de sua estrutura. Moléculas que possuem maior porcentagem de citosina-guanina são desnaturadas em temperaturas mais elevadas do que as que possuem adenina-timina em maior porcentagem, já que as interações estabelecidas por esse último par são menos intensas. Assim, a temperatura de fusão média ( $T_m$ ) – temperatura em que 50% da estrutura do DNA foi desnaturada – pode ser determinada submetendo uma solução do ácido nucleico a temperaturas extremas (NELSON & COX, 2014).

A mudança estrutural causada por uma desnaturação térmica pode ser observada através da técnica de espectroscopia UV-Vis. Isso porque, a molécula de DNA apresenta uma banda de absorção na região ultravioleta em 260 nm e, mudanças em sua estrutura ocasionam alteração na intensidade da banda. No caso da desnaturação, é possível observar um crescente aumento da absorbância à medida em que a temperatura da solução aumenta (Figura 32). Um gráfico da absorbância (260nm) em função da temperatura permite a identificação da  $T_m$  da molécula de DNA ao considerar a média entre o valor de absorbância inicial e o final. (GONZÁLEZ-RUIZ, et al., 2011).

A Figura 32 apresenta também esse gráfico para uma solução de *ss*-DNA a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para a solução de DNA de esperma de salmão utilizada nesse trabalho, a  $T_m$  equivale a  $77,2^\circ\text{C}$ .

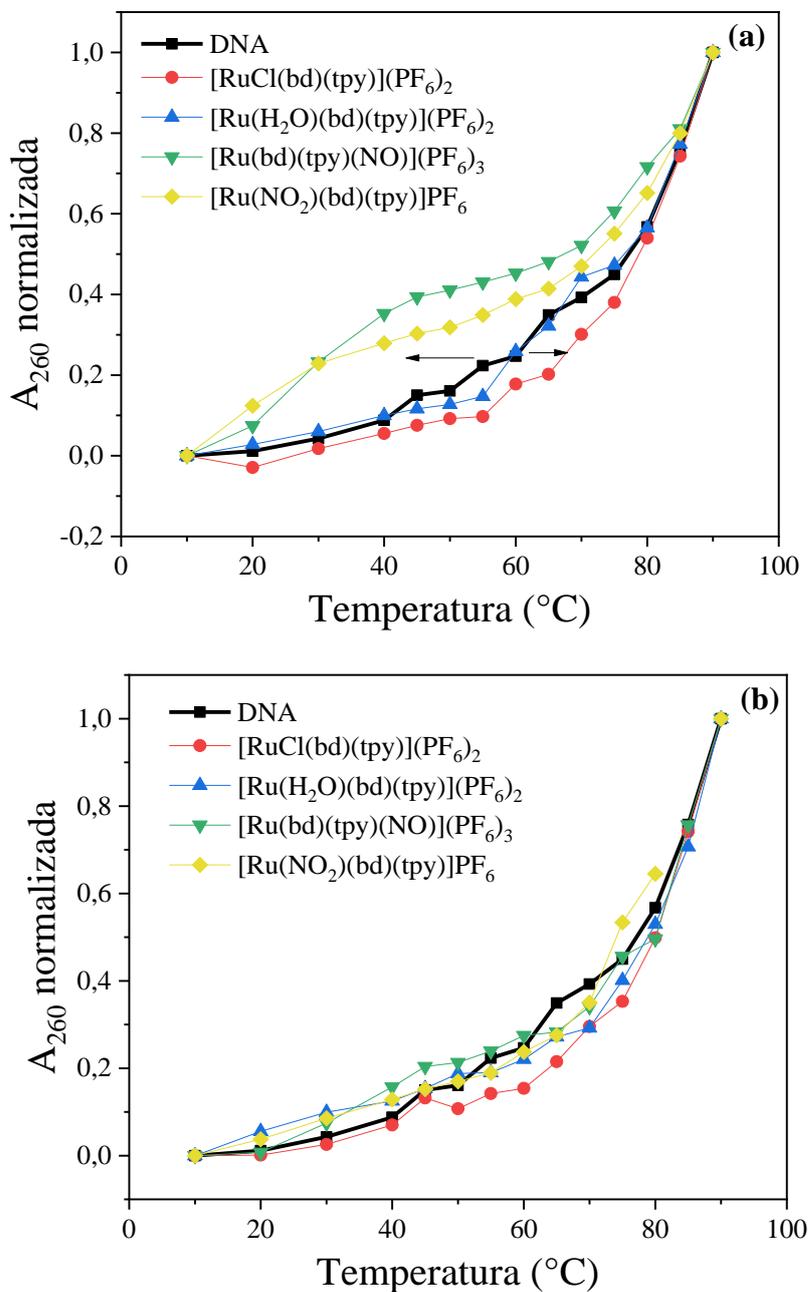
**Figura 32.** Efeito da desnaturação térmica em uma solução de ss-DNA ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )



Fonte: Autora

Diante da existência de interação entre os complexos e a molécula do polinucleotídeo, a temperatura de fusão média para o DNA na presença dos complexos será diferente da  $T_m$  encontrada para o DNA isolado. Para os agentes intercaladores, o aumento observado no valor de  $T_m$  é maior do que no caso de agentes interagindo através dos sulcos do DNA ou através de interação eletrostática. Isso porque a intercalação ocasiona maior estabilidade na estrutura da biomolécula, o que dificulta sua fusão e, portanto, aumenta a  $T_m$  (MUDASIR, et al., 2010). A Figura 33 apresenta o efeito da desnaturação do DNA na presença de cada um dos complexos de rutênio em estudo considerando 5 minutos (a) e 1 hora (b) de incubação.

**Figura 33.** Efeito da desnaturação térmica em uma solução de *ss*-DNA ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença dos complexos ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Ru:DNA = 1:10) após 5 min (a) e 1h (b) de incubação



Fonte: Autora

As diferenças observadas nas Figuras 33 (a) e (b) demonstram mudanças no tipo de interação ao estender o tempo de incubação de alguns complexos. A Tabela 5 apresenta os valores de  $T_m$  encontrados para a solução de DNA na presença de cada um dos complexos, bem como a diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) entre a  $T_m$  do DNA livre e a  $T_m$  do DNA após incubação com os complexos.

**Tabela 5.** Valores de temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) e de diferença de temperatura ( $\Delta T_m$ ) para o DNA na ausência e presença dos complexos polipiridínicos de rutênio

Complexo	60 min.			5 min.	
	DNA $T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
[RuCl(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	77,2	82,8	-5,6	78,7	-1,5
[Ru(H <sub>2</sub> O)(bd)(tpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	77,2	84,6	-7,4	76,7	0,5
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	77,2	83,4	-6,2	67,1	10,09
[Ru(NO <sub>2</sub> )(bd)(tpy)]PF <sub>6</sub>	77,2	86,1	-8,9	71,9	5,3

Fonte: Autora

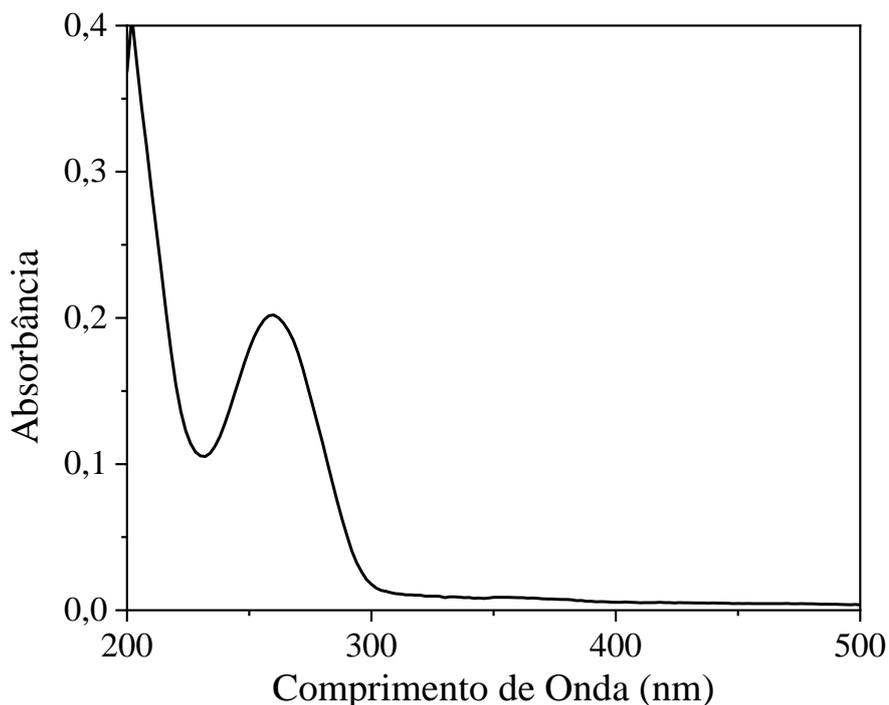
Intercaladores orgânicos comuns como etídio apresentam  $\Delta T_m = -13$  °C e alguns derivados de porfirinas ocasionam variação da  $T_m$  em cerca de  $-15$  °C (MUDASIR, *et al.*, 2010). Isso significa que a intercalação, em geral, aumenta a temperatura de fusão do DNA para cerca de 10 a 15 °C. Por outro lado, complexos como [RuCl(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>, que não podem se intercalar causa  $\Delta T_m$  de apenas  $-2$  °C (KARIDI, *et al.*, 2005).

Sendo assim, os valores de  $\Delta T_m$  observados em 5 minutos de incubação estão na fronteira entre a interação eletrostática e a intercalação. Os valores observados para [RuCl(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> e [Ru(H<sub>2</sub>O)(bd)(tpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> ao considerar 1 hora de incubação demonstram ausência de interação, enquanto os valores para [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> e [Ru(NO<sub>2</sub>)(bd)(tpy)]PF<sub>6</sub> tornam-se positivos, o que indica uma desestabilização da dupla hélice do DNA. Em todos os casos, com 1 hora de incubação, as interações entre os complexos e a biomolécula são diferentes das interações observadas com 5 minutos de incubação.

#### 4.3.3. Estudo das interações entre *ss*-DNA e os complexos terpiridina de rutênio (II) via espectroscopia na região do UV/Visível

O espectro de absorção de UV-Vis do DNA exhibe uma banda larga na região do UV com um máximo observado em 260 nm ( $\epsilon = 6600$  mol cm<sup>-1</sup>) (Figura 34). Esta banda é atribuída à transição eletrônica  $\pi$ - $\pi^*$  realizada pelos grupos cromóforos presentes nas bases nitrogenadas da estrutura do ácido desoxirribonucleico (RUIZ-GONZÁLES, 2011). Pequenas alterações no máximo de absorção, e conseqüentemente na absorvidade molar, podem ocorrer quando a biomolécula é submetida a alterações de pH, temperatura e força iônica (SIRAJUDDIN, ALI & BADSHAH, 2013).

**Figura 34.** Espectro eletrônico para o DNA a  $3,06 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão Tris.



Fonte: Autora

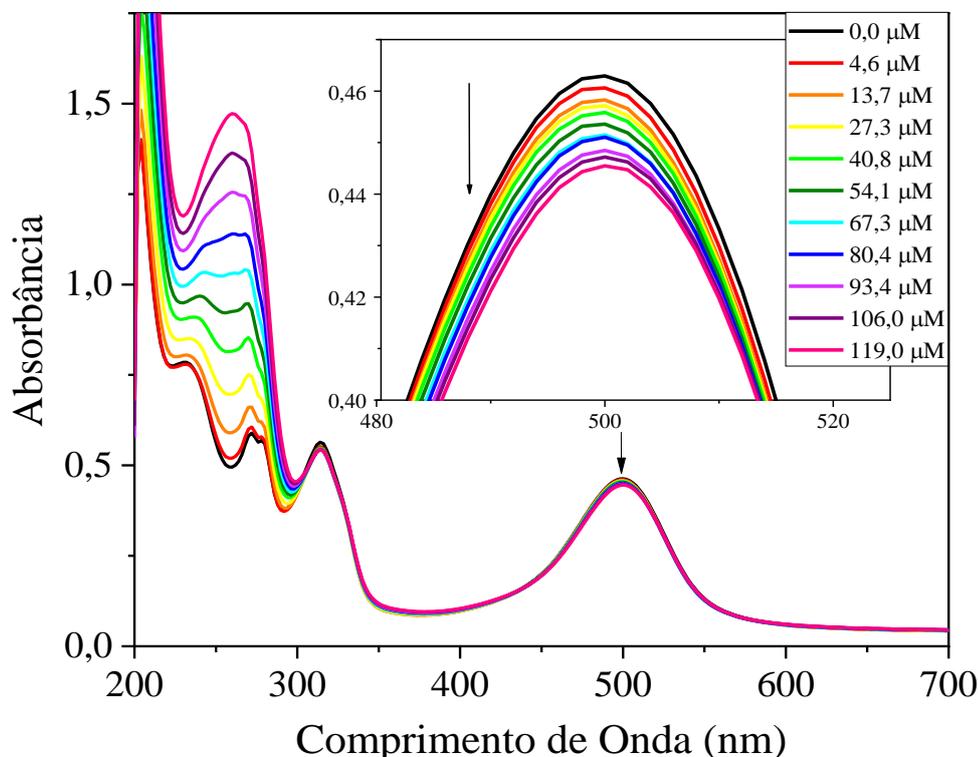
A cada análise envolvendo o ácido desoxirribonucleico é importante a realização do teste de integridade, o qual permite identificar se a biomolécula mantém sua estrutura de dupla hélice nas condições em que a solução se encontra e se a solução está livre de demais proteínas. Essa caracterização é feita a partir da razão das absorbâncias em 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), de maneira que, sendo essa razão maior que 1,8, o DNA tem sua estrutura com dupla hélice mantida e não há proteínas livres na solução (RUIZ-GONZÁLES, 2011).

Considerando-se que tanto a biomolécula quanto os complexos polipirídínicos de rutênio apresentam bandas de absorção na região UV-Vis, a interação entre complexos e DNA pode ser avaliada por espectroscopia de absorção nessa região do espectro eletromagnético.

Esse estudo é realizado monitorando as mudanças de absorção e posição do máximo das bandas do complexo quando o composto está livre em solução ( $[\text{DNA}] = 0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e quando há um aumento da concentração de DNA na solução de complexo. Tais alterações podem indicar o possível modo de interação entre o composto e a biomolécula, bem como a dimensão da força dessa interação (SIRAJUDDIN, ALI & BADSHAH, 2013).

A Figura 35 apresenta o espectro eletrônico para o complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  ( $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e presença de *ss*-DNA ( $0 - 119 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

**Figura 35.** Espectro eletrônico do complexo  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$  ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de *ss*-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. Inset: banda TCML do complexo em 500 nm evidenciando o efeito hipocromico.



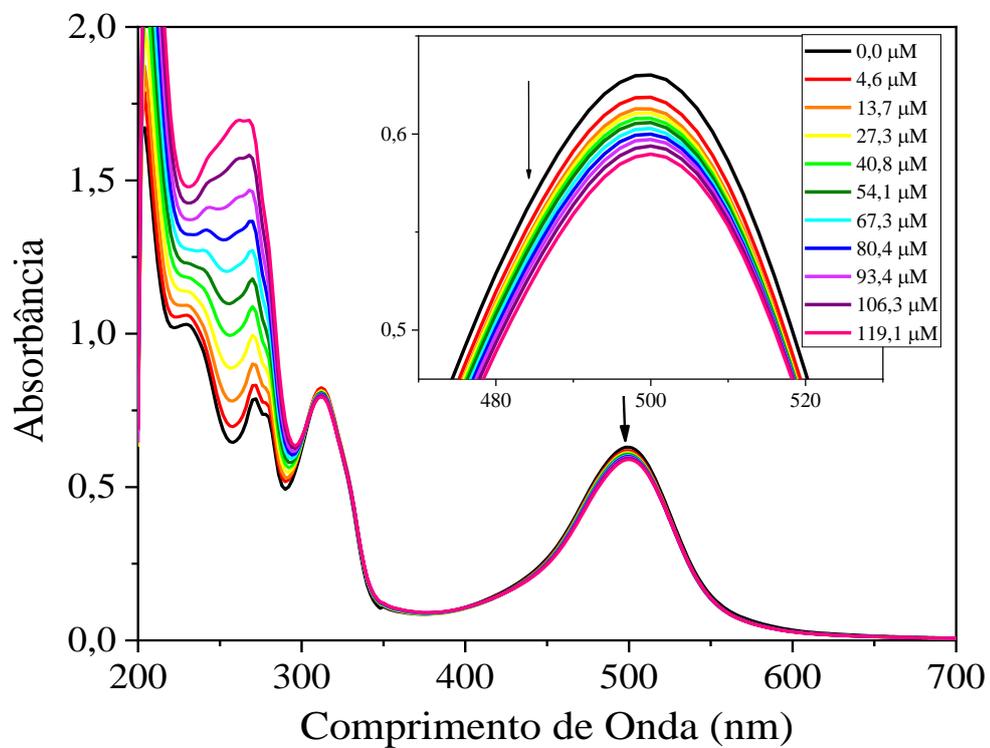
Fonte: Autora

As mudanças espectrais observadas na região entre 200 e 350 nm são efeito do aumento da concentração de DNA na solução e foram verificadas para todos os estudos realizados.

Nota-se porém, na banda em 502 nm (banda TCML) do clorido complexo, uma diminuição da absorvância à medida em que o DNA é adicionado à solução. Esse fenômeno é denominado hipocromismo e é um indicativo de interações do tipo intercalativa do complexo com a biomolécula. Nesse caso, os ligantes planares do complexo se intercalam entre as bases nitrogenadas do DNA, ocasionando um empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre ambos os grupos. Isso ocasiona uma estabilidade na estrutura helicoidal, proporcionando o efeito hipocromico (REHMAN, et al., 2015). Os resultados de CD corroboram para a possibilidade de interação por intercalação para este complexo, que apresentou um hipocromismo de 3,77%.

O mesmo comportamento foi observado para o complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ , como mostra a Figura 36. Nesse caso, o hipocromismo foi de 5,30%.

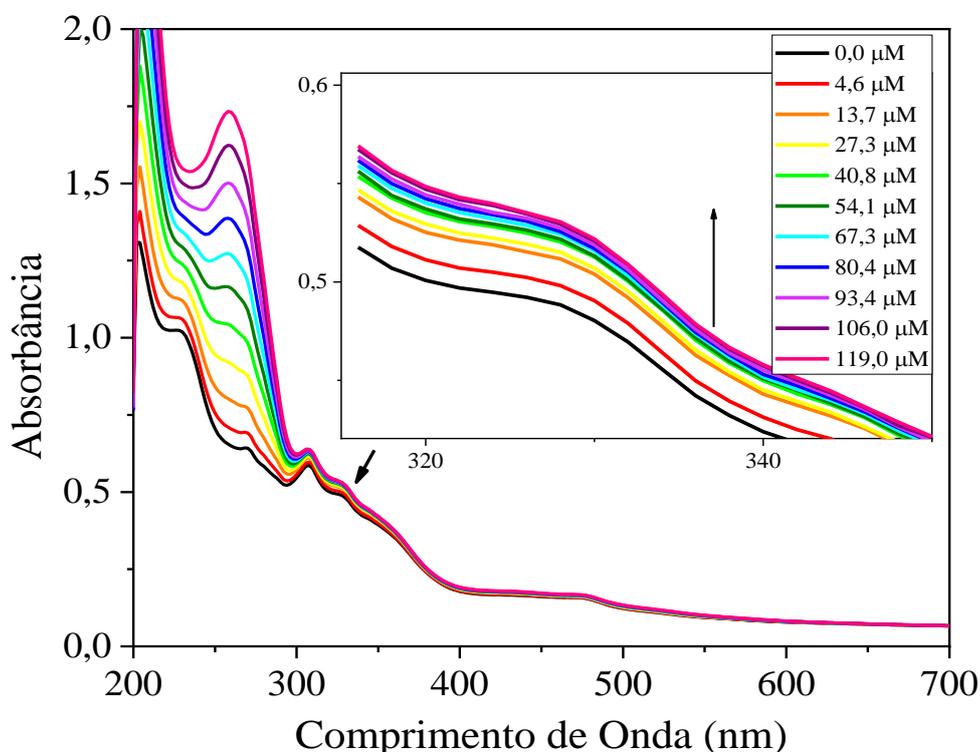
**Figura 36.** Espectro eletrônico do complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de *ss*-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. Insert: banda TCML do complexo em 500 nm evidenciando o efeito hipocrômico.



Fonte: Autora

A Figura 37 apresenta o efeito observado no espectro de  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  com adições sucessivas de *ss*-DNA.

**Figura 37.** Espectro eletrônico do complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de *ss*-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K. Insert: banda TCML do complexo em 328 nm evidenciando o efeito hipercrômico.



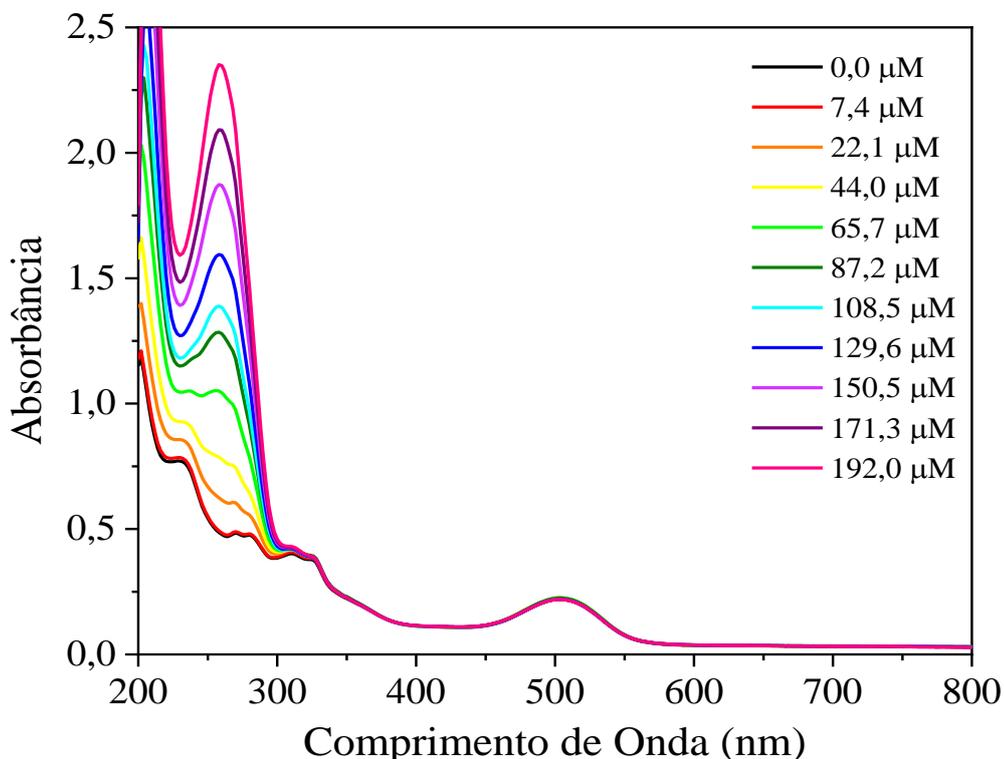
Fonte: Autora

Diferentemente dos complexos acima, o estudo da interação do DNA com o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  apresentou hiperchromismo na banda TCLM, isto é, aumento na absorvância à medida em que a concentração da biomolécula em solução aumenta. Esse efeito é um indicativo de interações eletrostáticas ou interações do complexo com o sulco do DNA, causado pela desestabilização na dupla hélice da biomolécula. No primeiro caso, o complexo interage com os grupos fosfatos da região aniônica da molécula de DNA, já a interação com o sulco pode correr por ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals entre ambas as espécies (REHMAN, et al., 2015).

Essa tendência de interação é também observada nos resultados de CD e, sabendo que o nitrosil complexo possui a maior carga positiva (3+) dessa série de compostos, há uma forte propensão de interação eletrostática entre o complexo e a biomolécula.

Por fim, a Figura 38 apresenta o espectro eletrônico obtido para o nitro complexo na ausência e presença de DNA.

**Figura 38.** Espectro eletrônico do complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em ausência (-) e presença de concentração crescente de ss-DNA com 5 minutos de incubação a 310 K.



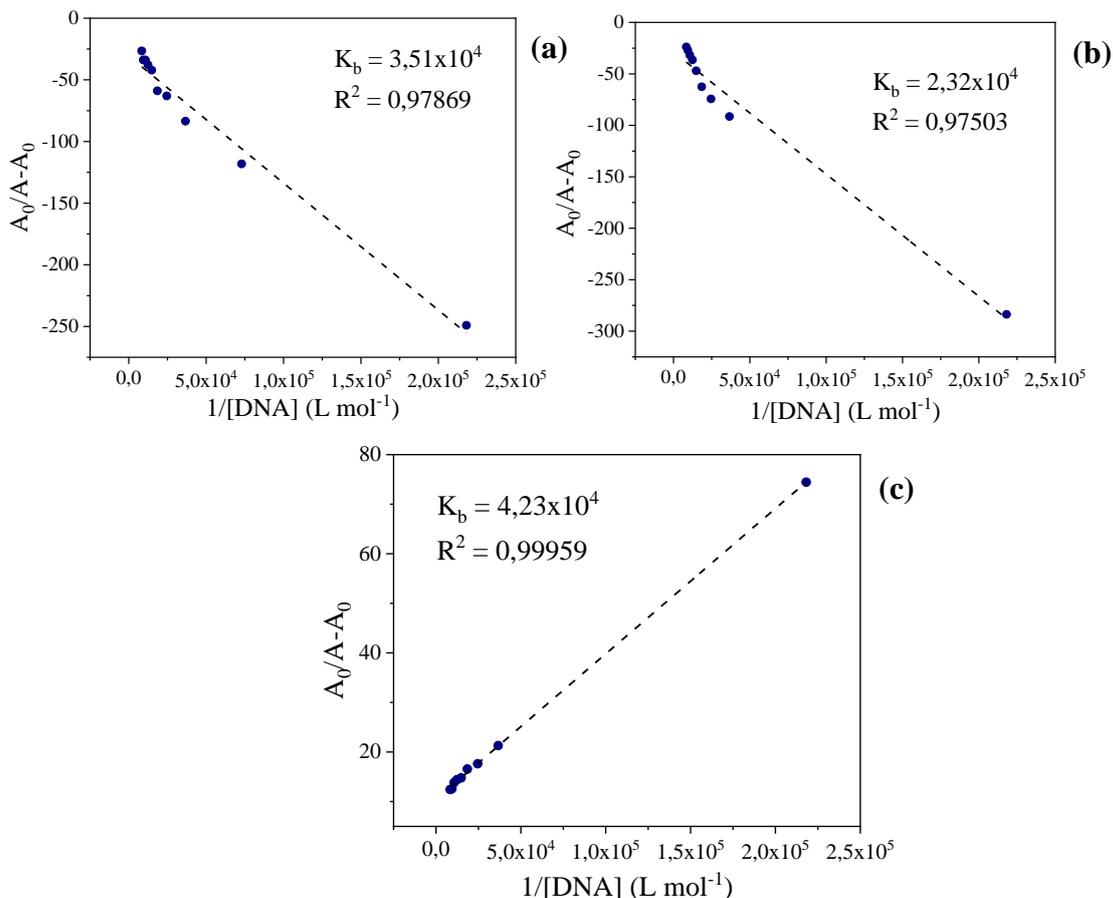
Fonte: Autora

Para o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ , não foram observadas diferenças espectrais significativas. Como a intensidade dos efeitos hipó/hipercrômico é proporcional à intensidade da ligação do complexo ao DNA, a ausência de mudanças espectrais, indica uma baixa interação entre o nitro complexo e a biomolécula. Isso não significa, porém, ausência de interações, já que os resultados observados em CD – técnica muito sensível à mudanças na estrutura do DNA – demonstram haver interação.

Para compreender a dimensão da força de interação entre o ácido nucleico e cada complexo, determinou-se a constante de interação ( $K_b$ ). Como já apresentado, a constante foi calculada a partir da Equação de Benesi-Hildebrand (1949). Para isso, foram construídos gráficos de  $A_0/A - A_0$  em função de  $1/[\text{DNA}]$ , sendo a razão entre o coeficiente linear e o angular desse gráfico a constante de interação de cada complexo.

A Figura 39 apresenta os gráficos contruídos. Em todos os casos, obteve-se curvas lineares, permitindo a identificação da constante. Como o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$  não apresentou mudanças espectrais significativas, não foi possível determinar sua constante de interação.

**Figura 39.** Obtenção da constante de interação ( $K_b$ ) entre o DNA e o complexo  $\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})\text{PF}_6$  (a),  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  (b) e  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  (c).



Fonte: Autora

A Tabela 6 apresenta as constantes de interação e as respectivas porcentagem de hiper/hipocromismo ( $\%H = A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}/A_{\text{inicial}} \times 100\%$ ) para cada complexo.

**Tabela 6.** Porcentagem de hiper/hipocromismo dos espectros eletrônicos e constante de interação ( $K_b$ ) dos complexos terpiridina de rutênio com o DNA.

Complexo	$K_b$ (L mol <sup>-1</sup> )	%H	$R^2$
$[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$	$(3,51 \pm 0,75) \times 10^4$	3,77	0,97869
$[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$	$(2,32 \pm 0,12) \times 10^4$	5,30	0,97503
$[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	$(4,23 \pm 0,93) \times 10^4$	-7,75	0,99959

Fonte: Autora

*Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.  $R^2$  é o coeficiente de correlação para os valores de  $K_b$*

Os valores das constantes de interação apresentados se encontram na ordem de  $10^4$  L mol<sup>-1</sup>, o que indica uma interação fraca entre os compostos estudados e a molécula de DNA. A

fraca interação da série de complexos  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{bd})(\text{tpy})]^{n+}$  com DNA pode justificar os ensaios de viabilidade celular em cultura de células de B16 F10 descritos por Heinrich e colaboradores. O complexo  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  com 24 horas de incubação na concentração de  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  diminui para 23% a viabilidade celular. Com 48 horas,  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  apresentou maior atividade citotóxica que  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ , diminuindo para 37% a viabilidade celular na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto que para o composto  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  é necessária uma concentração maior que  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  para se observar 50% da viabilidade (HEINRICH, 2013).

Em geral, complexos terpiridinas de rutênio(II) apresentam tendência de média a fraca interação com DNA. Por exemplo, o complexo  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})]^{2+}$  ( $K_b \sim 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ) interage na superfície do DNA através do contato com grupos fosfatos. Os planos piridínicos do ligante tpy não encontram-se no mesmo plano e são volumosos para interagir com sulco menor (JIANG, *et al.*, 2010).

Os complexos,  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{phbi})]^{2+}$  (phbi= 2-(2-benzimidazol)-1,10-fenantrolina) e  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{phni})]^{2+}$  (phni= 2-(2-naftoimidazol)-1,10-fenantrolina) (JIANG, *et al.*, 2003) apresentam valores de  $K_b$   $3,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  e  $1,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ , respectivamente. Sendo a interação do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{phbi})]^{2+}$  com DNA via eletrostática e do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{phni})]^{2+}$  por intercalação devido a extensão pelo anel naftil.

Um dos fatores preponderantes na força da interação de complexos de rutênio terpiridina, referem-se a planaridade dos co-ligantes. Os complexos do tipo  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{opda})\text{Cl}]^+$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$ , onde Cl-Ph-tpy= 4'-(4-clorofenil)-2,2':6',2''-terpiridina, opda= o-fenilenodiamina e en=etilenodiamina, apresentam  $K_b = 3,0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$  (SIMOVIC, *et al.*, 2019). O co-ligante Cl-Ph-tpy apresenta potencial comportamento de intercalação na interação com DNA e os co-ligantes quelantes opda e en mostram que a capacidade de formar ligações de hidrogênio estabilizam e fortalecem o aduto DNA-complexo.

## 5. CONCLUSÃO

A caracterização dos compostos via CLAE, espectroscopia na região do Infravermelho (IV) e espectroscopia na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis) corroboram com a estrutura química prevista para os quatro complexos. Os estudos de tempo de interação e de estabilidade do complexo no tampão (Tris pH=7,4) foram fundamentais para a realização dos posteriores experimentos de interação com *ss*-DNA, já que forneceram informações sobre o tempo de incubação ideal entre os compostos e a biomolécula, bem como do nível de estabilidade dos complexos no tampão utilizado.

A combinação dos estudos de interação entre complexo e *ss*-DNA realizados sugerem que os complexos  $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  e  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$  interagem com a biomolécula por intercalação, enquanto que as mudanças espectrais observadas para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  indicam interações eletrostáticas com o *ss*-DNA. Apesar de não ser possível identificar alterações no espectro na região UV-Vis referente ao complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ , os resultados observados no dicroísmo circular e a análise de desnaturação térmica do *ss*-DNA também induzem que o complexo se comporte como um intercalador parcial. Em todos os casos, os valores de  $K_b$  encontrados sugerem fracas interações entre os complexos e o polinucleotídeo, o que justifica a baixa citotoxicidade dos compostos em cultura de células de B16 F10.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREZÁLOVÁ, L.; ORSZÁGHOVÁ, Z. Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 225, p. 111624, 2021.
- BARRA, C.V.; NETTO, A.V.G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercalador. **Revista Virtual de Química**, 7 (6), 2015.
- BENESI, H.; HILDEBRAND, J. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. **J. Am. Chem. Soc.** 71(8): 2703-07, 1949.
- BESSAS, N. C. **Avaliação das Interações Entre a Albumina Sérica Humana (ASH), Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) e Seus Respective Aqua Complexos.** 2022. Dissertação (mestrado em química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2022.
- BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agentes. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 376, p. 75-94, 2018
- BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resistance Updates**, vol. 9, p. 111-122, 2006.
- BRABEC, V.; RABINA, O.; KASPARKOVA, J. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. **Coordination Chemistry Reviews**, Vol. 351, 2017, p. 2-31.
- ČANOVIĆ, P.; SIMOVIĆ, A. R.; RADISAVLJEVIĆ, S.; BRATSOS, I.; DEMITRI, N.; MITROVIC, M.; ZELEN, I.; BUGARČIĆ, Z. D. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. **J. Biol. Inorg. Chem.**, vol. 22, p. 1007-1028, 2017.
- CHEN, LM.; LIU, J.; CHEN, JC.; SHI, S.; TAN, CP.; ZHENG, KC.; JI, LN. Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex  $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dpq})]^{2+}$ . **Journal of Molecular Structure**, vol. 881, p. 156-166, 2008.
- CHEN, Z.; WANG, X.; LI, Y.; GUO, Z. Comparison of DNA binding and cleavage abilities between mono- and trinuclear copper(II) complexes of benzimidazole derivatives. **Inorganic Chemistry Communications**, vol. 11, n.11, p.1392-1396, 2008.
- CHRZANOWSKA, M.; KATAFIAS, A.; IMPERT, O.; KOZAKIEWICZ, A.; SURDYKOWSKI, A.; BRZOZOWSKA, P.; FRANKE, A.; ZAHL, A.; PUCHTA, R.; VAN ELDIK, R. Structure and reactivity of  $[\text{RuII}(\text{terpy})(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{Cl}$  complexes: consequences for biological applications. **Dalton Transactions**, vol. 46, p. 10264–10280, 2017.
- de FARIAS, R.F. **Química de coordenação: fundamentos e atualidades.** Campinas, SP: Editora Átomo, 2005. p. 203-245.

de LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; BANDHACK, L. M.; da SILVA, R. S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$  complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 8, p. 2543-2549, 2006.

de LIMA, R.G.; SILVA, B.R.; da SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. **Molecules**, vol. 19 (7), p. 9628-9654, 2014.

FERREIRA, C.M.H.; PINTO, I.S.S.; SOARES, E.V.; SOARES, H.M.V.M. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. **RSC Advances**, vol. 39, p. 30989-31003, 2015.

FIGUEIROA-DEPAZ, Y.; RESENDIZ-ACEVEDO, K.; DÁVILA-MANZANILLA, S.G.; GÁRCIA-RAMOS, J.C.; ORTIZ-FRADE, L. SERMENT-GUERRERO, J. RUIZ-AZUARA, L. DNA, a target of mixed chelate copper(II) compounds (Casiopeinas®) studied by electrophoresis, UV-vis and circular dichroism techniques. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 231, p. 111772, 2022.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6. p. 13-18, 2005.

FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; DOU, Q. P. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 16, 1813, 2010.

GAUTHIER, M.G. **Simulation of polymer translocation through small channels: A Molecular Dynamics study and a new Monte Carlo approach**. 2007. Thesis (doctorate in philosophy in physics) – University of Ottawa, 2007.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 7, p. 81–122, 1971.

HE, J.; SUN, J.; MAO, Z.; JI, L.; SUN, H. Phosphodiester hydrolysis and specific DNA binding and cleavage promoted by guanidinium-functionalized zinc complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 103, n.5, p.851-858, 2009.

HEINRICH, T.A. **Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagens de células tumorais**. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, p. 159, 2013.

HUANG, H.; ZHANG, P.; CHEN, Y.; JI, L.; CHAO, H. Labile ruthenium(II) complexes with extended phenyl-substituted terpyridyl ligands: synthesis, aquation and anticancer evaluation. **Dalton Transactions**, vol. 44, p. 15602–15610, 2015.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em: 18/04/2022.

JANG, Y.J.; LEE, H.M.; JANG, K.J.; LEE, J.; KIM, S.K.; CHO, T. Comparison of the Binding Modes of  $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_3]^{2+}$  and  $[\text{Ru}(2,2':6',2''\text{-terpyridine})_2]^{2+}$  to Native DNA. **Bull. Korean Chem. Soc.**, vol. 31, n.5, p. 1314-1318, 2010.

JI, LN.; ZOU, XH.; LIU, JH. Shape - and enantioselective interaction of Ru(II)/Co(III) polypyridyl complexes with DNA. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 216-217, p. 513-536, 2001.

JIANG, C.; CHAO, H.; LI, H.; JI, L. Syntheses, characterization and DNA-binding studies of ruthenium(II) terpyridine complexes:  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{PHBI})]^{2+}$  and  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{PHNI})]^{2+}$ . **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 93, n.3-4, p. 247-255, 2003.

JUNGOVÁ, H. S.; JURGOVÁ, L.; HEMMEROVÁ, E.; HOMOLA, J. Interaction of Tris with DNA molecules and carboxylic groups in self-assembled alkanethiol monolayers measured with surface plasmon resonance. **Applied Surface Science**, vol. 546, 2021.

KELLET, A.; MOLPHY, Z.; SLATOR, C.; MCKEE, V. FARREL, N. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug–DNA interactions. **Chemical Society Reviews**, vol. 48, p. 971-988, 2019.

LEE, H.K.; WANG, P. Recent applications of high-performance liquid chromatography to the analysis of metal complexes. **Journal of Chromatography A**, vol. 789, p. 437-451, 1997.

LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**. 2<sup>a</sup> ed. Nova Iorque, Elsevier, 1984.

LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P.A., Recent developments in ruthenium anticancer drug. **Metallomics**, vol. 1, 6, p. 458–470, 2009.

LIU, X.W.; LI, J.; DENG, H.; ZHENG, K.C.; MAO, Z.W.; JI, L.N. Experimental and DFT studies on the DNA-binding trend and spectral properties of complexes  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$  (L = dmdpq, dpq, and dcdpq). **Inorganica Chimica Acta**, vol. 358, p. 3311-3319, 2005.

LOKICH, J.; ANDERSON, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. **Annals of Oncology**, vol. 9, p.13-21, 1998.

MITAL, M. ZIORA, Z. Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 375, p. 434-458, 2018

MOTSWAINYANA, W. M., AJIBADE, P.A. Anticancer activities of mononuclear ruthenium(II) coordination complexes. **Advanced Chemistry**, p. 1–21, 2015.

MUDASIR; WAHYUNI, E.T.; TIAHJONO, D.H.; YOSHIOKA, N.; INOUE, H. Spectroscopic studies on the thermodynamic and thermal denaturation of the ct-DNA binding of methylene blue. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Vol, 77, p. 528-534, 2010.

NCI. **National Cancer Institute**, Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 15/04/2022

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. [recurso eletrônico] Porto Alegre: Artmed, p. 296-298, 2014.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V. GAMBINO, D.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 46, n. 10, p. 5099–5177, 2012.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**, 2 ed., São Paulo: Cengage Learning, 2015.

POYTON, F.E.; BRIGHT, S.A.; BLASCO, S.; WILLIAMS, D.C.; KELLY, J.M.; GUNNLAUGSSON, T. The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for in vitro cellular and in vivo applications. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 46, p. 7706–7756, 2017.

REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M.A.; ISHQUI, H.M.; TABISH, M. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 576, p. 49–60, 2015.

ROCHA, C.R.R.; SILVA, M.M.; QUINET, A.; CABRAL-NETO, J.B.; MENCK, C.F.M. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. **Clinics**, vol. 73, 2018.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 251, 1633, 2007.

ROSEMBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J.E.; MANSOUR, V.H. Platinum Compounds, a new class of potent antitumour agents. **Nature**, Vol. 222, p. 385–386, 1969.

RUIZ-GONZÁLEZ, V.; MARTIN, M.A.; OLIVES, A.I.; RIBELLES, P. An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug–DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors. **Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies**. p. 65–90, 2011.

SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, vol. 28, p. 254–259, 2003.

SHRIVER, D.; ATKINS, P. **Química Inorgânica**. Tradução da 4ª Edição. São Paulo: Bookman, 2008.

SIMOVIC, A.R.; MASNIKOSA, R.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 398, p. 113011, 2019.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. vol. 124, p. 1–19, 2013.

SOUSA, V. K. **Aplicações da espectroscopia de dicroísmo circular e da tensiometria em monocamadas de Langmuir no estudo de proteínas e peptídeos antimicrobianos**. 2021. Dissertação (mestrado em ciências) – Instituto de Física, Depto, de Física Aplicada, Universidade de São Paulo, 2021.

STREKOWSKI, L. WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 623, p. 3-13, 2007.

SULLIVAN, B. P.; CALVERT, J. M.; MEYER, T. J. Cis-trans isomerism in  $\text{RuCl}_2(\text{tpy})(\text{PPh}_3)$ . Comparasions between the chemical and physical properties of a cis-trans isomeric pair. *Inorganic Chemistry*, v. 19, p. 1404-1407, 1980.

SWAMINATHAN, S.; HARIBABU, J.; KALAGATUR, N.K.; NIKHIL, M.; BALAKRISHNAN, N.; BHUVANESH, N. S. P.; KADIRVELU, K.; KOLANDAIVEL, P.; KARVEMBU, R. Tunable Anticancer Activity of Furoylthiourea-Based RuII–Arene Complexes and Their Mechanism of Action. *Chem. EUR. J*, vol. 27, p. 7418, 2021.

VELHO, R. G. **Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: Um levantamento bibliográfico.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 170, 2006.

VRIENDS, R. C. J; VAN KOTEN, G.; VRIEZE, K. Characterization of soluble  $[\text{RuCl}_2\text{P}_2]_2$  ( $\text{P}=\text{PPh}_3$ ), a species which has been postulated to be presented in solutions of  $\text{RuCl}_2\text{P}_3$ ; Its synthesis from various Ru compounds via a novel catalytic process involving pyridyketones. *Inorgânica Chimica Acta*, vol. 26, p. L20-L31, 1978.

WATSON, J., CRICK, F. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, vol. 171, p. 737–738, 1953.

WEXSELBLATT, E.; YAVIN, E.; GIBSON, D. Cellular interactions of platinum drugs. *Inorgânica Chimica Acta*, vol. 393, p. 75-83, 2012.

ZHANG, G.; HU, X.; PAN, J. Spectroscopic studies of the interaction between pirimicarb and calf thymus DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 78, p. 687-694, 2011.