



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

## **Design e desenvolvimento de um novo candidato a metalofármaco de rutênio com ligantes sinérgicos**

**RENAN RIBEIRO BERTOLONI**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: **Química.**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sofia Nikolaou

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

RENAN RIBEIRO BERTOLONI

**Design e desenvolvimento de um novo candidato a metalofármaco de rutênio com ligantes sinérgicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: **Química**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sofia Nikolaou

Versão Corrigida

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bertoloni, Renan Ribeiro

**Design e desenvolvimento de um novo candidato a metalofármaco de rutênio com ligantes sinérgicos.** Ribeirão Preto, 2023.

209 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química.

Orientadora: Nikolaou, Sofia.

1. Rutênio      2. Ligantes Polipiridínicos      3. NORMs      4. Terapia  
Fotodinâmica      5.DNA      6.HSA.

**Nome:** Renan Ribeiro Bertoloni

**Título:** Design e desenvolvimento de um novo candidato e metalofármaco de rutênio com ligantes sinérgicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Química, na área de concentração Química Inorgânica.

Aprovada em 23 de agosto de 2023 pela comissão julgadora constituída pelos professores doutores:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sofia Nikolaou (Presidente)

Instituição: FFCLRP - USP

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Instituição: FCFRP - USP

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

Instituição: UFSCar

Julgamento: APROVADO

*Dedico este trabalho à minha mãe, Alessandra, à minha avó Elizabeti e ao meu avô Divino, por investirem e acreditarem em mim todos os anos da minha vida, sendo minha base mais importante e me ensinando desde criança o que é o amor de verdade e o valor da honestidade, do carinho e da perseverança em nossas vidas.*

## **Agradecimentos**

O meu primeiro e mais especial agradecimento não poderia ser para outra pessoa além da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sofia Nikolaou. Em um momento da minha vida onde eu escolhi sair da minha zona de conforto e estender os meus limites em algo totalmente novo, foi ela que me acolheu e, dentro de sua capacidade inigualável de orientação, conseguiu extrair o melhor de mim e tornou esse trabalho e toda a minha evolução por trás dele possível. Deixo registrado aqui meu enorme respeito, carinho e admiração pela profissional e pessoa que tenho o prazer de ter tido como primeira orientadora na minha carreira acadêmica. Muito obrigado por formar não apenas químicos, mas pessoas incríveis.

Agradeço também novamente à minha família pelo suporte e pelo carinho durante toda minha vida. Mãe, vó, vô, meu maior presente e ensinamento possível foi ver como a força enorme que cada um de vocês possuem é convertida no amor mais intenso. Ao longo de todos esses anos, essa é a lição mais valiosa que eu vou levar para toda minha vida e qualquer orgulho que eu tenha de onde eu cheguei existe apenas por causa da base que vocês me deram. É por causa de vocês que vale a pena estar vivo e pelos ensinamentos de vocês que todos os outros agradecimentos dessa dissertação são possíveis.

Nada disso seria possível sem o apoio da melhor companheira que eu poderia ter, então gostaria de deixar aqui um agradecimento mais que especial também à Carol, que torna cada dia mais leve e a cada semana, mês e ano que se passa, me inspira a me tornar uma pessoa melhor e me mostra tudo aquilo que eu posso alcançar. Muito obrigado por ser essa pessoa atenciosa, carinhosa e especial que eu guardo com muito carinho em meu coração. Fico muito feliz em poder dividir cada pedacinho da minha vida com você e serei eternamente grato por tudo aquilo que você me ensinou e me fez uma pessoa da qual eu possa sentir orgulho.

Gostaria também de agradecer às pessoas mais que especiais que fizeram parte dessa caminhada ao meu lado todos os dias e companheiros de laboratório: Amanda, Bruno, Hugo, Laura, Luis (Kiwi), Nathan (Xaveco), Nicolle e Pedrinho. Eu não teria chegado até aqui sem as risadas, conversas, fofocas e, principalmente, a amizade de cada um de vocês. Vocês são pessoas incríveis e foi um enorme prazer fazer parte do LABiQSC<sup>2</sup>, obrigado por transformar o ambiente de trabalho em um lugar descontraído no qual eu me senti realmente acolhido e obrigado por serem parte de mim.

Aos amigos que fiz durante a graduação e que continuaram presentes mesmo após a formatura: Alexandre (Carneiro), Hiago (Primo), João Pedro (Doctor), Maria Eduarda (Loki) e Vitor (Vô). A presença de vocês durante todos esses anos tornou minha vida mais alegre e fazia com que a faculdade fosse um lugar para o qual eu sempre queria ir.

Um agradecimento especial também para as duas pessoas que mais me acolheram e ajudaram em um país novo, na maior loucura que já fiz na minha vida até o momento: Alexia e Camila, obrigado por tornarem a minha estadia na cidade de Columbus mais simples e por serem pessoas incríveis.

A special thanks to Dr. Claudia Turro, for accepting me in your lab and teaching me so many things in such a short time, I am still amazed by OSU. Thanks to Sipra and Luis too, for making that house in Columbus to feel like home! It was a wonderful experience to spend that three months living with you two!

Aos professores que, exercendo sua função em sala de aula, conseguiram me fazer enxergar a beleza dessa profissão e me fizeram seguir esse caminho de estudo e aprendizado: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Ramos, Prof. Dr. Antonio Eduardo Miller Crotti, Prof. Dr. Antonio Gustavo Sampaio de Oliveira Filho e novamente Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sofia Nikolaou. Vocês todos foram essenciais para eu conseguir chegar ao fim deste trabalho!

Aos colaboradores que tornaram esse trabalho possível: Dr.<sup>a</sup> Amanda B. Becceneri, Dr. André Justino, Prof. Dr. Arthur Henrique C. de Oliveira, Prof. Dr. Bernardo A. Iglesias, Dr.<sup>a</sup> Juliana C. Biazotto, Dr. Otávio Augusto Chaves e Prof. Dr. Roberto Santana da Silva. Obrigado pela disponibilidade e pela disposição que contribuíram essencialmente para a minha formação e para esse trabalho!

Um agradecimento mais que especial também aos meus amigos mais antigos e que, nas poucas vezes que conseguimos nos ver no ano, trazem de volta a leveza da vida de anos atrás e me fazem sentir orgulho do caminho que escolhi seguir: Ana Laura, Cláudio, Gabigol, Isabella, João Victor, Julia, Leo Andrade, Leo Dias, Orion, Rassi, Samuel, Tsuji e Vital. Obrigado a cada um de vocês por me fazerem quem sou hoje e por toda risada, choro, comemoração e momento especial que vivemos juntos. Obrigado por me fazerem me sentir bem nas vezes em que mais preciso!

Por fim, um agradecimento a qualquer pessoa que se disponha a ler qualquer parte, por menor que seja, deste trabalho. É uma honra poder contribuir com a rica pesquisa brasileira e estar do lado certo na batalha que, como sempre, a ciência vencerá!



**“Uma lição sem dor não tem sentido, porque não é possível obter nada sem um sacrifício. Mas ao suportar e superar a dor, você conseguirá um coração enorme e incomparável, um coração forte feito aço.”**

**- Edward Elrich, Fullmetal Alchemist Brotherhood**

BERTOLONI, Renan Ribeiro. **Design e desenvolvimento de um novo candidato a metalofármaco de rutênio com ligantes sinérgicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2023. 209 p.

## RESUMO

Esse trabalho consiste na síntese, caracterização e verificação de algumas propriedades biológicas de uma série de três complexos de coordenação de fórmula geral  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{L}]^{n+}$ , onde tpy = 2,2':6',2''-terpiridina, dppz = dipirido-[3,2-a:2',3'-c]-fenazina e L =  $\text{Cl}^-$  (n = 1),  $\text{H}_2\text{O}$  (n = 2) ou  $\text{NO}_2$  (n = 1). Inicialmente, o trabalho se propôs a sintetizar o composto inédito  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}]^{3+}$ , porém devido à baixa densidade eletrônica do centro metálico, comprovada através de experimentos e cálculos *in silico*, esse composto se apresentou instável e o trabalho foi realizado utilizando o substituto  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}_2]^+$ , também inédito. Este último apresenta os mesmos potenciais biológicos do anterior, sendo eles a capacidade de gerar  $^1\text{O}_2$ , intercalação com o DNA e fotoliberação de NO. A série foi sintetizada e caracterizada utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Vis, espectroscopia de luminescência, espectroscopia de absorção resolvida no tempo, espectroscopia vibracional e espectroscopia de RMN. Todos os compostos estudados foram capazes de gerar  $^1\text{O}_2$ , sendo que o composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}_2]^+$  apresentou o maior rendimento quântico de geração. Foi demonstrado que todos os compostos interagem de maneira relativamente intensa com a HSA e o DNA, sendo que ambas as interações foram verificadas pelo método de Stern-Volmer e, no caso da HSA, com *docking* molecular. A interação com DNA foi determinada como sendo de intercalação através da espectroscopia de dicróismo circular e medidas de temperatura de desnaturação do DNA. O composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}_2]^+$  foi capaz de liberar NO mediante irradiação, e essa liberação gerou um efeito de citoproteção de células saudáveis verificado em um estudo *in vitro* com células pulmonares tumorais e não-tumorais. Todos os compostos se mostraram levemente citotóxicos de maneira seletiva para as células tumorais. A análise de todos os resultados mostra que esse sistema é promissor para o design de novos metalofármacos, de maneira que leves alterações na estrutura dos ligantes pode gerar mudanças na estrutura eletrônica dos compostos que os tornem capazes de retornar resultados ainda mais promissores para a química inorgânica medicinal.

**Palavras-chave:** Rutênio, Ligantes Polipiridínicos, NORMs, Terapia Fotodinâmica, DNA, HSA.

BERTOLONI, Renan Ribeiro. **Design and development of a new ruthenium metallodrug candidate with synergistic ligands**. Dissertation (Master of Science). Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2023. 209 p.

### ABSTRACT

This work consists of the synthesis, characterization and verification of some biological properties of a series of three coordination complexes with the general formula  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{L}]^{n+}$ , where tpy = 2,2':6',2''-terpyridine, dppz = dipyrido-[3,2-a:2',3'-c]-phenazine and L =  $\text{Cl}^-$  (n = 1),  $\text{H}_2\text{O}$  (n = 2) or  $\text{NO}_2$  (n = 1). Initially, the work proposed to synthesize the new compound  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}]^{3+}$ , but due to the low electronic density of the metallic center, proven through experiments and *in silico* calculations, this compound was unstable and the work was carried out using the substitute  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}_2]^+$ , also new in the literature. This compound presents the same biological potentials as the previous one, namely the ability to generate  $^1\text{O}_2$ , intercalation with DNA and photorelease of NO. The series was synthesized and characterized using UV-Vis absorption spectroscopy, emission spectroscopy, time-resolved absorption spectroscopy, vibrational spectroscopy and NMR spectroscopy. All the studied compounds were able to generate  $^1\text{O}_2$  and the compound  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}_2]^+$  presented the highest quantum yield of generation. It was demonstrated that all compounds interact relatively strongly with HSA and DNA, and both interactions were verified by the Stern-Volmer method and, in the case of HSA, molecular docking calculations. The interaction with DNA was determined to be intercalation by circular dichroism spectroscopy, DNA melting temperature measurements and molecular docking. The compound  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}_2]^+$  was able to release NO upon irradiation, and this release generated a cytoprotective effect in healthy cells verified in an *in vitro* study with tumor and non-tumor lung cells. All compounds were selectively mildly cytotoxic to tumor cells. The analysis of all the results shows that this system is promising for the design of new metallopharmaceuticals, in a way that slight alterations in the structure of the ligands may generate changes in the electronic structure of the compounds that make them capable of returning even more promising results for medicinal inorganic chemistry.

**Keywords:** Ruthenium, Polypyridine Ligands, NORMs, Photodynamic Therapy, DNA, HSA.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Abundância dos elementos na crosta terrestre. ....	2
<b>Figura 2:</b> Representações esquemáticas de dois casos possíveis de posições relativas entre os estados $^3MC$ e $^3MLCT$ . ....	6
<b>Figura 3:</b> Diagrama simplificado de estados eletrônicos para um complexo do tipo $[Ru(bpy)_2XY]^{n+}$ . ....	7
<b>Figura 4:</b> Diagrama de Orbitais Moleculares da camada de valência do $^3O_2$ (esquerda) e $^1O_2$ (direita). ....	7
<b>Figura 5:</b> Esquema representado as etapas simplificadas da terapia fotodinâmica. ....	8
<b>Figura 6:</b> Diagrama simplificado da geração de $^1O_2$ por fotossensibilizadores. ....	8
<b>Figura 7:</b> Estrutura do complexo de coordenação estudado por Friedman em 1990. ....	9
<b>Figura 8:</b> Estrutura das bases nitrogenadas presentes no DNA. ....	10
<b>Figura 9:</b> Representação simplificada dos orbitais na retrodoação entre um centro metálico de Ru e o NO. ....	12
<b>Figura 10:</b> Estrutura cristalina da HSA com destaque da localização de seus principais sítios de interação. ....	15
<b>Figura 11:</b> Diagrama de Jablonski mostrando os processos que podem ocorrer entre estados eletrônicos de uma molécula com estado fundamental singleto. ....	19
<b>Figura 12:</b> Diagrama de Jablonski simplificado (esquerda) para os fenômenos radiativos que geram os espectros de absorção e emissão da molécula DCJTB (direita). ....	21
<b>Figura 13:</b> Esquema representando a posição dos detectores em um espectrômetro de absorção e de emissão. ....	22
<b>Figura 14:</b> Esquema representando o princípio por trás de um experimento de espectroscopia de absorção resolvida no tempo. ....	23
<b>Figura 15:</b> Esquema representando o desdobramento dos níveis $m_l$ de um átomo de hidrogênio quando sujeito à um campo magnético externo. ....	25
<b>Figura 16:</b> Estrutura do composto inédito $[Ru(tpy)(dppz)NO]^{3+}$ proposto neste trabalho. ....	27

<b>Figura 17:</b> Esquema ilustrando o mecanismo da reação de condensação formando como produto o ligante dppz. ....	35
<b>Figura 18:</b> Espectro eletrônico qualitativo da dppz em DMSO. ....	36
<b>Figura 19:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN da dppz em clorofórmio deuterado (10 mM, 300 MHz, 298K). .....	37
<b>Figura 20:</b> Esquema demonstrando o efeito de corrente de anel em um anel benzênico. ....	38
<b>Figura 21:</b> Espectro COSY da dppz em clorofórmio deuterado (10 mM, 300 MHz, 298K). .	39
<b>Figura 22:</b> Esquema representando o mecanismo da coordenação da 2,2';6',2"-terpiridina no complexo. ....	40
<b>Figura 23:</b> Reação de formação do complexo [Ru(tpy)Cl <sub>3</sub> ]. ....	40
<b>Figura 24:</b> Esquema representando todas as sínteses realizadas neste trabalho. Todos os cátions foram precipitados utilizando PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> como contra-íon. ....	41
<b>Figura 25:</b> Espectros de absorção eletrônica qualitativos dos compostos [Ru(tpy)Cl <sub>3</sub> ] e [Ru(tpy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> gerados na primeira síntese. ....	43
<b>Figura 26:</b> Espectro de absorção eletrônica qualitativo do complexo Ru-Cl em ACN. ....	44
<b>Figura 27:</b> Espectros de absorção eletrônica dos compostos Ru-Cl, Ru-NO <sub>2</sub> , Ru-H <sub>2</sub> O e da solução ao final da tentativa de síntese do composto Ru-NO. ....	46
<b>Figura 28:</b> Espectros de Emissão, Excitação e Absorção eletrônica para os compostos Ru-H <sub>2</sub> O (a) e Ru-NO <sub>2</sub> (b) em acetonitrila. [Ru] = 5 μM; Abertura das fendas = 6 nm; λ <sub>exc</sub> = 462 nm (Ru-H <sub>2</sub> O) e 474 nm (Ru-NO <sub>2</sub> ). ....	49
<b>Figura 29:</b> Diagrama simplificado dos níveis de energia dos compostos estudados neste trabalho. ....	51
<b>Figura 30:</b> Espectro de fs-TA de uma solução 100 μM Ru-Cl em acetonitrila (λ <sub>ex</sub> = 550 nm). .....	54
<b>Figura 31:</b> Curva cinética obtida para o experimento de fs-TA do Ru-Cl (λ <sub>max</sub> = 503 nm). ....	55
<b>Figura 32:</b> Contagem de fótons em função do tempo do experimento de TCSPC para o complexo Ru-NO <sub>2</sub> . ....	57
<b>Figura 33:</b> Espectro vibracional da pastilha do complexo Ru-Cl em KBr. ....	58

<b>Figura 34:</b> Espectros vibracionais das pastilhas do complexo Ru-NO <sub>2</sub> (esquerda) e Ru-H <sub>2</sub> O (direita) em KBr.....	59
<b>Figura 35:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto Ru-Cl em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K).....	61
<b>Figura 36:</b> Espectro COSY de uma solução do composto Ru-Cl em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K). .....	61
<b>Figura 37:</b> Representação tridimensional do composto Ru-Cl no plano de cada ligante polipiridínico. ....	62
<b>Figura 38:</b> Comparação dos sinais de <sup>1</sup> H-RMN para os hidrogênios <b>a</b> , <b>c</b> e <b>c'</b> para a série de compostos estudados nesse trabalho. ....	65
<b>Figura 39:</b> Espectro de massas obtido de uma solução de aproximadamente 10 μM do composto Ru-NO <sub>2</sub> em acetonitrila ( <b>a</b> ), com ampliação do pico base ( <b>b</b> ). ....	66
<b>Figura 40:</b> Comparação entre os picos calculados (linha verde) e obtidos (linha azul) a partir da espectrometria de massas do composto Ru-NO <sub>2</sub> . ....	67
<b>Figura 41:</b> Estrutura tridimensional do composto Ru-NO <sub>2</sub> obtida através da difração de raios-X. ....	68
<b>Figura 42:</b> Esquema representando a reação esperada do Ru-Cl com o reagente NOBF <sub>4</sub> . ....	72
<b>Figura 43:</b> Espectros eletrônicos da mistura Ru-Cl e NOBF <sub>4</sub> em acetonitrila seca após sucessivas adições de água deionizada. ....	74
<b>Figura 44:</b> Espectro vibracional do sólido obtido a partir da reação do Ru-Cl com NOBF <sub>4</sub> . .	75
<b>Figura 45:</b> Acompanhamento espectrofotométrico da reatividade do composto Ru-NO <sub>2</sub> com HPF <sub>6</sub> . ....	76
<b>Figura 46:</b> Representação do composto estudado por Scoch et al.....	77
<b>Figura 47:</b> Estrutura de alguns compostos estudados por Amthor et al. ....	78
<b>Figura 48:</b> Representação dos orbitais moleculares do eteno e do butadieno pela aproximação de Hückel.....	80
<b>Figura 49:</b> Esquema demonstrando a relação entre a densidade eletrônica do centro metálico com o pKa da H <sub>2</sub> O coordenada. ....	81

<b>Figura 50:</b> Estruturas dos compostos estudados por Wasylenko et al.....	82
<b>Figura 51:</b> Formas de ressonância mostrando o caráter doador e retirador de densidade eletrônica dos ligantes metoxila e carboxila, respectivamente.....	83
<b>Figura 52:</b> Espectros eletrônicos de uma solução do complexo Ru-H <sub>2</sub> O (10μM) com o aumento do pH. ....	83
<b>Figura 53:</b> Curva obtida após a titulação espectrofotométrica do Ru-H <sub>2</sub> O.....	84
<b>Figura 54:</b> Esquema representando as reações químicas envolvidas no teste de Griess.....	86
<b>Figura 55:</b> Mecanismo de formação do azocomposto responsável por reagir com os íons NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> no teste de Griess.....	86
<b>Figura 56:</b> Espectro eletrônico do produto formado no controle positivo do teste de Griess.	87
<b>Figura 57:</b> Espectros eletrônicos referentes ao teste de Griess realizado com o composto Ru-NO <sub>2</sub> .....	88
<b>Figura 58:</b> Esquema mostrando o equilíbrio Ru-NO <sub>2</sub> ⇌ Ru-NO cuja constante foi calculada <i>in silico</i> . ....	89
<b>Figura 59:</b> Estruturas dos compostos utilizados para o estudo do efeito solvatocrômico.....	93
<b>Figura 60:</b> Estruturas de algumas sondas utilizadas na construção das escalas dos parâmetros de solvente de Kamlet-Taft.....	96
<b>Figura 61:</b> Estruturas de algumas sondas utilizadas na construção da escala dos parâmetros de solvente de Catalán.....	97
<b>Figura 62:</b> Espectros eletrônicos registrados em diversos solventes para os compostos Ru-Cl (a), Ru-H <sub>2</sub> O (b), Ru-py (c) e para o ligante dppz livre (d).....	99
<b>Figura 63:</b> Relações lineares monoparamétricas entre a energia da transição MLCT do composto Ru-Cl e os parâmetros α, β e π* de Kamlet-Taft e o parâmetro E <sub>T</sub> (30).....	100
<b>Figura 64:</b> Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-Cl utilizando o método de Kamlet-Taft.....	102
<b>Figura 65:</b> Reação de detecção do <sup>1</sup> O <sub>2</sub> utilizando a sonda DPBF. ....	109

<b>Figura 66:</b> Espectros eletrônicos de uma mistura da sonda DPBF (30 $\mu\text{M}$ ) com o complexo Ru-NO <sub>2</sub> (3 $\mu\text{M}$ ) em DMSO com exposição à luz em diferentes períodos (a) e curva cinética de primeira ordem para a fotodegradação do DPBF (b). .....	111
<b>Figura 67:</b> Processos que podem desativar um estado excitado de uma molécula A.....	114
<b>Figura 68:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-NO <sub>2</sub> à 27°C (a) e regressão linear de Stern-Volmer para esse experimento (b).....	117
<b>Figura 69:</b> Reta de Van't Hoff para a interação do complexo Ru-NO <sub>2</sub> com a HSA. ....	118
<b>Figura 70:</b> Titulação de supressão de fluorescência do fs-DNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4 e NaCl 5 mM) com o complexo Ru-NO <sub>2</sub> . ....	122
<b>Figura 71:</b> Espectro de CD da solução de HSA pura (1 $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl (pH = 7,4) e 298K. ....	125
<b>Figura 72:</b> Espectros de CD da HSA (1 $\mu\text{M}$ , tampão Tris-HCl, 298K) na presença do complexo Ru-NO <sub>2</sub> em diferentes proporções (a) e valor da %a-hélice em cada espectro (b).....	125
<b>Figura 73:</b> Espectro de CD da solução de fs-DNA pura (200 $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl (pH = 7,4) e .....	127
<b>Figura 74:</b> Titulação de CD de uma solução de fs-DNA (200 $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl (pH = 7,4) com o composto Ru-NO <sub>2</sub> . ....	128
<b>Figura 75:</b> Esquema representado a desnaturação da dupla hélice do DNA.....	129
<b>Figura 76:</b> Determinação da T <sub>m</sub> de uma solução 50 $\mu\text{M}$ de ct-DNA em tampão PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (1 mM, pH = 7,0, NaCl 1 mM).....	131
<b>Figura 77:</b> Determinação da T <sub>m</sub> das soluções de ct-DNA puro (50 $\mu\text{M}$ ) e com adição dos compostos Ru-NO <sub>2</sub> , Ru-Cl e Ru-H <sub>2</sub> O (5 $\mu\text{M}$ )......	131
<b>Figura 78:</b> Melhor posição de ancoragem para a interação (A) HSA:Ru-NO <sub>2</sub> , (B) HSA:Ru-Cl e (C) HSA:Ru-H <sub>2</sub> O no subdomínio IB. Resíduos de aminoácidos selecionados, Ru-NO <sub>2</sub> , Ru-Cl e Ru-H <sub>2</sub> O estão representados em ciano, amarelo, laranja e marrom, respectivamente. Cores dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro e Ru(II): magenta.....	136



<b>Figura 79:</b> Cronoamperograma da fotoliberação de NO de uma solução aquosa com 2% de DMSO do composto Ru-NO <sub>2</sub> (5 μM).....	139
<b>Figura 80:</b> Comparação dos cronoamperogramas de fotoliberação de NO do composto Ru-NO <sub>2</sub> nas três condições nas quais o experimento foi realizado. ....	140
<b>Figura 81:</b> Esquema representando o mecanismo da fotoliberação do NO a partir do composto Ru-NO <sub>2</sub> . ....	140
<b>Figura 82:</b> Atividade citotóxica dos complexos Ru-Cl, Ru-H <sub>2</sub> O e Ru-NO <sub>2</sub> nas células MRC-5 e A549 após 24 h de incubação. ....	143
<b>Figura 83:</b> Estruturas propostas para dar seguimento aos estudos conduzidos neste trabalho. ....	149
<b>Figura 84:</b> Espectro de fs-TA de uma solução 100 uM do composto Ru-H <sub>2</sub> O em acetonitrila ( $\lambda_{exc} = 525$ nm). ....	170
<b>Figura 85:</b> Curva cinética obtida para o experimento de fs-TA do Ru-H <sub>2</sub> O em acetonitrila ( $\lambda_{max} = 426$ nm). ....	170
<b>Figura 86:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto Ru-NO <sub>2</sub> em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K). ....	171
<b>Figura 87:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto Ru-H <sub>2</sub> O em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K). ....	171
<b>Figura 88:</b> Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-H <sub>2</sub> O utilizando o método de Kamlet-Taft.....	173
<b>Figura 89:</b> Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-py utilizando o método de Kamlet-Taft.....	173
<b>Figura 90:</b> Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-Cl utilizando o método de Catalán. ....	174
<b>Figura 91:</b> Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-H <sub>2</sub> O utilizando o método de Catalán. ....	174
<b>Figura 92:</b> Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-py utilizando o método de Catalán. ....	175

<b>Figura 93:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-NO <sub>2</sub> à 32°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	175
<b>Figura 94:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-NO <sub>2</sub> à 42°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	176
<b>Figura 95:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-Cl à 27°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	176
<b>Figura 96:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-Cl à 32°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	177
<b>Figura 97:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-Cl à 37°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	177
<b>Figura 98:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-H <sub>2</sub> O à 27°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	178
<b>Figura 99:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-H <sub>2</sub> O à 32°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	178
<b>Figura 100:</b> Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1 $\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-H <sub>2</sub> O à 37°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	179
<b>Figura 101:</b> Reta de Van't Hoff para a interação do complexo Ru-NO <sub>2</sub> (esquerda ) e Ru-H <sub>2</sub> O (direita) com a HSA.....	179
<b>Figura 102:</b> Regressão linear de Stern-Volmer para a interação do complexo Ru-NO <sub>2</sub> com o fs-DNA. ....	180

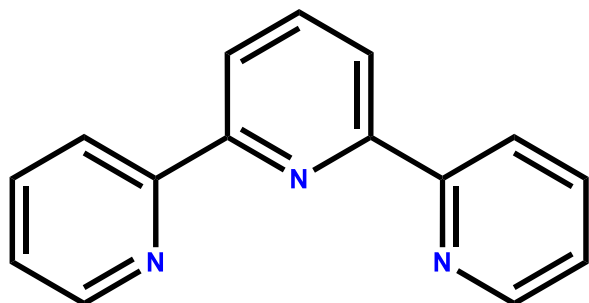
<b>Figura 103:</b> Titulação de supressão de fluorescência do fs-DNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4 e NaCl 5 mM) com o complexo Ru-Cl (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	180
<b>Figura 104:</b> Titulação de supressão de fluorescência do fs-DNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4 e NaCl 5 mM) com o complexo Ru-H <sub>2</sub> O (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita). .....	181
<b>Figura 105:</b> Espectros de CD da HSA (1 μM) na presença do complexo Ru-Cl (esquerda) e Ru-H <sub>2</sub> O (direita) em diferentes proporções. ....	181
<b>Figura 106:</b> Espectros de CD do fs-DNA (200 μM) na presença do complexo Ru-Cl (esquerda) e Ru-H <sub>2</sub> O (direita) em diferentes proporções. ....	182

## Lista de Tabelas

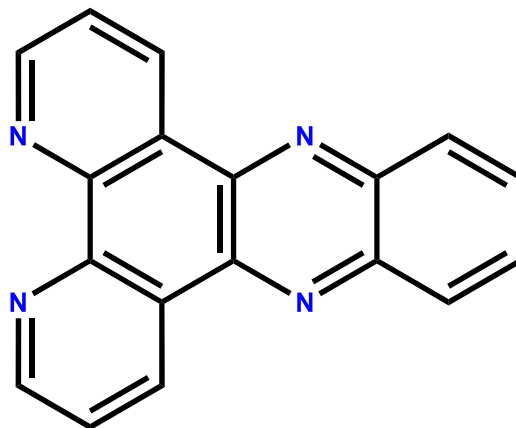
<b>Tabela 1:</b> Efeitos positivos e negativos que o NO pode exercer no organismo. ....	11
<b>Tabela 2:</b> Procedência dos solventes e reagentes utilizados ao longo deste trabalho.....	30
<b>Tabela 3:</b> Valores de absorvidade molar calculada para as transições dos compostos Ru-Cl, Ru-H <sub>2</sub> O e Ru-NO <sub>2</sub> , em acetonitrila. ....	47
<b>Tabela 4:</b> Valores do comprimento de onda do máximo de emissão e do rendimento quântico de emissão dos compostos estudados. ....	49
<b>Tabela 5:</b> Valores de rendimento quântico de emissão e tempo de vida do estado excitado para os compostos estudados neste trabalho. ....	56
<b>Tabela 6:</b> Tentativa de atribuição dos picos destacados nos espectros vibracionais dos complexos estudados. ....	60
<b>Tabela 7:</b> Tentativas de atribuição do espectro de <sup>1</sup> H-RMN para os compostos.....	64
<b>Tabela 8:</b> Valores da distância de ligação do centro metálico para cada átomo ligante no composto Ru-NO <sub>2</sub> . ....	69
<b>Tabela 9:</b> Valores do ângulo de ligação que envolvem o átomo de Ru obtidos para o composto Ru-NO <sub>2</sub> . ....	69
<b>Tabela 10:</b> Valores de pK <sub>a</sub> para os complexos estudados por Wasylenko et al. em comparação com o complexo Ru-H <sub>2</sub> O. ....	85
<b>Tabela 11:</b> Valores de ΔG e K <sub>eq</sub> calculados <i>in silico</i> para o equilíbrio Ru-NO <sub>2</sub> ⇌ Ru-NO. ...	89
<b>Tabela 12:</b> Solventes de referência para cada parâmetro do método de Kamlet-Taft. ....	96
<b>Tabela 13:</b> Solventes de referência para cada parâmetro do método de Catalán.....	98
<b>Tabela 14:</b> Valores dos parâmetros α, β e π* para os solventes utilizados neste trabalho. ...	101
<b>Tabela 15:</b> Contribuições relativas de cada parâmetro de solvente de Kamlet-Taft para a energia da transição. ....	104
<b>Tabela 16:</b> Valores dos parâmetros SA, SB, SdP e SP para todos os solventes utilizados neste trabalho. ....	104

<b>Tabela 17:</b> Contribuições relativas dos parâmetros de Catalán para as energias de transição. .....	105
<b>Tabela 18:</b> Valores calculados de constantes de fotodegradação e rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ . .....	111
<b>Tabela 19:</b> Valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) e dos parâmetros termodinâmicos calculados para a interação da HSA com os complexos Ru-NO <sub>2</sub> , Ru-Cl e Ru-H <sub>2</sub> O em todas as temperaturas.....	120
<b>Tabela 20:</b> Valores de $K_{app}$ e $K_{SV}$ calculados para a interação do fs-DNA com os complexos estudados nesse trabalho.....	122
<b>Tabela 21:</b> Valores de % $\alpha$ -hélice calculados para os pontos selecionadas das titulações de CD dos compostos com a HSA. ....	126
<b>Tabela 22:</b> Valores de $T_m$ determinados para as soluções de ct-DNA puro e contendo cada composto estudado. ....	132
<b>Tabela 23:</b> Valores de pontuação de <i>docking</i> molecular (adimensionais) para a interação entre HSA e os complexos nos sítios de ligação avaliados. ....	134
<b>Tabela 24:</b> Resultados do <i>docking</i> molecular para a interação dos compostos com HSA no subdomínio IB (sítio III). ....	135
<b>Tabela 25:</b> Parâmetros cristalográficos obtidos para o cristal do composto Ru-NO <sub>2</sub> . ....	172

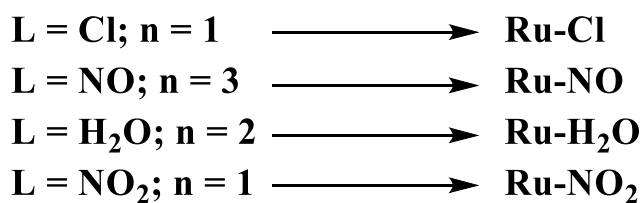
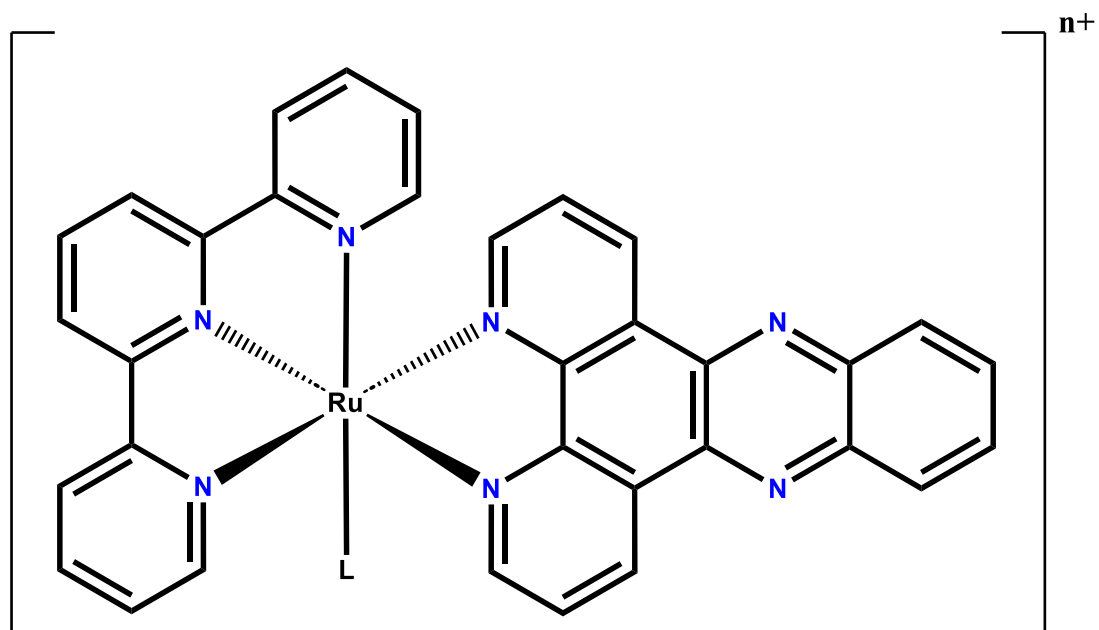
## Estruturas dos ligantes e complexos estudados neste trabalho



tpy = 2,2':6',2'-terpiridina



dppz = dipirido-[3,2-a:2',3'-c]-fenazina



## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>bpy</b>	2-2'-bipiridina
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Correlação <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
<b>ct-DNA</b>	<i>Calf Thymus DNA</i> (DNA de timo de bezerro)
<b>DCE</b>	1,2-Dicloroetano
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<b>DOM</b>	Diagrama de Orbitais Moleculares
<b>DPBF</b>	1,3-Difenilisobenzofurano
<b>dppz</b>	dipirido-[3,2-a:2',3'-c]-fenazina
<b>EtBr</b>	Brometo de Etídio
<b>EtOAc</b>	Acetato de Etila
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>fs-DNA</b>	<i>Fish sperm DNA</i> (DNA de esperma de peixe)
<b>HSA</b>	<i>Human Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Humana)
<b>HOMO</b>	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular ocupado de maior energia)
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória para 50% da população de células
<b>IL</b>	Transição Intraligante
<b>LUMO</b>	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular vazio de menor energia)
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MLCT</b>	<i>Metal-Ligand Charge Transfer</i> (Transição de Transferência de Carga Metal-Ligante)
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>T<sub>m</sub></b>	<i>Melting Temperature</i> (Temperatura de Desnaturação)
<b>tpy</b>	2,2':6',2''-terpiridina
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UV-Vis</b>	<i>Ultraviolet-Visible</i> (Ultravioleta-Visível)
<b>δ</b>	Deslocamento Químico (ppm)
<b>ε</b>	Coefficiente de absorvidade molar (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
<b>η</b>	Rendimento (%)
<b>ν</b>	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introdução Geral</b> .....	<b>2</b>
1.1 O Rutênio .....	2
1.2 Complexos de Rutênio com ligantes polipiridínicos .....	3
1.3 Complexos de Rutênio e o ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) .....	9
1.4 Nitrosilos de Rutênio .....	10
1.5 Interação com Biomoléculas .....	13
1.5.1 O ácido desoxirribonucleico (DNA) .....	13
1.5.2 A Albumina do Soro Humano (HSA) .....	14
1.6 Ferramentas para caracterização de moléculas .....	15
1.6.1 Espectroscopia de absorção .....	16
1.6.2 Espectroscopia de emissão .....	18
1.6.3 Espectroscopia de absorção resolvida no tempo .....	22
1.6.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	24
1.7 A criação de um composto sinérgico .....	26
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
2.1 Objetivos Gerais .....	27
2.2 Objetivos Específicos .....	28
<b>CAPÍTULO 2: SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES REALIZADAS</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Materiais e Metodologia</b> .....	<b>30</b>
1.1 Procedência dos solventes e reagentes .....	30
1.2 Sínteses realizadas .....	31
1.2.1 Síntese do ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) .....	31
1.2.2 Síntese do complexo [Ru(tpy)Cl <sub>3</sub> ] .....	31
1.2.3 Síntese do precursor [Ru(tpy)(dppz)Cl]PF <sub>6</sub> (Ru-Cl) .....	32
1.2.4 Síntese do complexo [Ru(tpy)(dppz)(H <sub>2</sub> O)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (Ru-H <sub>2</sub> O) .....	32



1.2.4 Síntese do complexo inédito [Ru(tpy)(dppz)NO](BF <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (Ru-NO).....	33
1.2.5 Síntese do complexo [Ru(tpy)(dppz)NO](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> por uma rota alternativa .....	33
1.2.6 Síntese do complexo alternativo [Ru(tpy)(dppz)(NO <sub>2</sub> )](PF <sub>6</sub> ) (Ru-NO <sub>2</sub> ) .....	33
<b>1.3 Equipamentos utilizados para caracterizações .....</b>	<b>34</b>
1.3.1 Espectroscopia de absorção eletrônica .....	34
1.3.2 Espectroscopia de emissão eletrônica.....	34
1.3.3 Espectroscopia de absorção resolvida no tempo .....	34
1.3.4 Espectroscopia vibracional .....	35
1.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	35
<b>2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>35</b>
2.1 A dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina.....	35
2.2 Rota sintética elaborada para os complexos estudados nesse trabalho .....	39
2.3 Espectroscopia de absorção eletrônica.....	42
2.4 Espectroscopia de emissão eletrônica.....	47
2.5 Espectroscopia de absorção resolvida no tempo .....	53
2.6 Espectroscopia vibracional .....	57
2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	60
2.8 Considerações a respeito da estrutura e composição do composto inédito Ru-NO <sub>2</sub> .....	65
2.8.1 Espectrometria de massas de alta resolução .....	66
2.8.2 Difração de Raios-X .....	67
<b>CAPÍTULO 3: A INSTABILIDADE DO COMPLEXO ALVO EM SOLUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>1. Resultados obtidos nas tentativas de síntese do Ru-NO.....</b>	<b>72</b>
1.1 A instabilidade em solução devido à presença de moléculas de H <sub>2</sub> O.....	72
1.2 Espectroscopia vibracional e a ligação Ru(II)-NO <sup>+</sup> .....	74
1.3 Uma rota alternativa para a síntese do Ru-NO .....	75
<b>2. A densidade eletrônica do centro metálico.....</b>	<b>77</b>
2.1 Informações da literatura a respeito do problema encontrado .....	77
2.2 Determinação do pKa do Ru-H <sub>2</sub> O.....	81
2.3 O teste de Griess.....	85

2.4 Modelagem Molecular.....	88
<b>3. O complexo Ru-NO<sub>2</sub> como um novo candidato à metalofármaco .....</b>	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO 4: O EFEITO SOLVATOCRÔMICO.....</b>	<b>92</b>
<b>1. O efeito solvatocrômico dentro da química de coordenação .....</b>	<b>93</b>
1.1 O solvatocromismo.....	93
1.2 Compostos de coordenação solvatocrômicos .....	94
<b>2. As vantagens da utilização de uma análise multiparamétrica .....</b>	<b>94</b>
2.1 O método de Kamlet-Taft .....	95
2.2 Método de Catalán .....	97
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>98</b>
3.1 Resultados obtidos a partir da espectroscopia eletrônica .....	98
3.2 A análise monoparamétrica e seus problemas .....	99
3.3 A análise multiparamétrica de Kamlet-Taft.....	101
3.4 A análise multiparamétrica de Catalán .....	104
3.5 A influência da estrutura de um composto em suas interações com o solvente.....	105
<b>4. Considerações finais a respeito do estudo do efeito solvatocrômico .....</b>	<b>107</b>
<b>CAPÍTULO 5: APLICAÇÕES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....</b>	<b>108</b>
<b>1. Determinação do rendimento quântico de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> .....</b>	<b>109</b>
1.1 O princípio da técnica.....	109
1.2 Metodologia.....	110
1.3 Resultados e Discussão .....	110
<b>2. Supressão de fluorescência da HSA e do DNA pelo método de Stern-Volmer .....</b>	<b>113</b>
2.1 A supressão de fluorescência bimolecular e a equação de Stern-Volmer .....	113
2.2 Metodologia.....	115
2.2.1 Preparação do tampão Tris-HCl .....	115
2.2.2 Supressão de fluorescência da HSA .....	115
2.2.3 Supressão de fluorescência do DNA .....	116
2.3. Resultados e Discussão .....	116
2.3.1 Supressão de fluorescência da HSA .....	116
2.3.2 Supressão de fluorescência do DNA por deslocamento de sonda.....	121

<b>3. Espectroscopia de dicroísmo circular .....</b>	<b>123</b>
3.1 <i>O princípio da técnica</i> .....	123
3.2 <i>Metodologia</i> .....	123
3.2.1 Espectroscopia de dicroísmo circular da HSA .....	123
3.2.2 Espectroscopia de dicroísmo circular do DNA .....	124
3.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	124
3.3.1 HSA .....	124
3.3.2 DNA .....	127
<b>4. Determinação da temperatura de desnaturação do DNA.....</b>	<b>128</b>
4.1 <i>A temperatura de desnaturação do DNA</i> .....	129
4.2 <i>Metodologia</i> .....	130
4.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	130
<b>5. Docking Molecular .....</b>	<b>133</b>
5.1 <i>Metodologia</i> .....	133
5.2 <i>Resultados e Discussão</i> .....	134
5.3 <i>A comparação dos cálculos in silico com os experimentos realizados</i> .....	136
<b>6. Fotoliberação de NO por cronoamperometria .....</b>	<b>137</b>
6.1 <i>O princípio da técnica</i> .....	138
6.2 <i>Metodologia</i> .....	138
6.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	138
<b>7. Citotoxicidade em células pulmonares .....</b>	<b>141</b>
7.1 <i>Metodologia</i> .....	141
7.1.1 <i>Diluição dos complexos</i> .....	141
7.1.2 <i>Linhagem Celular e Cultivo</i> .....	142
7.1.3 <i>Ensaio da Viabilidade Celular</i> .....	142
7.2 <i>Resultados e Discussão</i> .....	142
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>145</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>150</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>170</b>

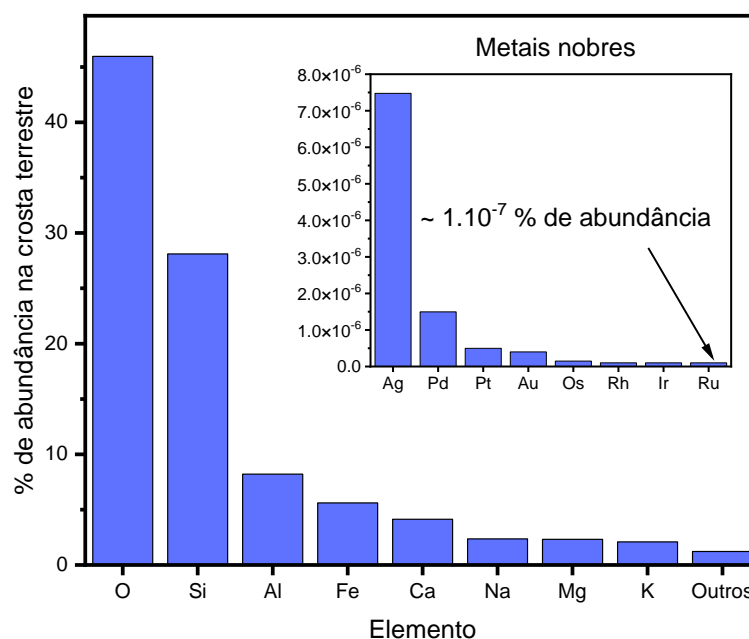
# ***CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS***

# 1. Introdução Geral

## 1.1 O Rutênio

Dentro da tabela periódica, um grupo de elementos que possui uma química de muito interesse na pesquisa são os metais de transição, que segundo a definição da IUPAC, são “*elementos cujo átomo possui um subnível d incompleto ou que possa vir a formar cátions com um subnível d incompleto*” (GOLD, 2019). Essa classe de elementos utiliza os orbitais<sup>1</sup> d para formar o que se conhece hoje por compostos ou complexos de coordenação, cuja estrutura geral foi elucidada graças à Teoria de Coordenação elaborada por Alfred Werner em sua tese de doutorado, em 1893 (TOMA, 2016). A partir dessa teoria, diversos complexos foram estudados com toda a série de metais de transição. Um desses metais é o alvo de estudo desse trabalho, de número atômico 44 e nome rutênio (Ru). A descoberta desse elemento foi realizada pelo cientista Karl Karlovich Klaus, que reportou o novo elemento para a Academia de Ciências de São Petersburgo em 1844. Seu nome tem origem na palavra em latim *Ruthenia*, referente às regiões eslavicas, terra natal de Klaus.

**Figura 1:** Abundância relativa dos elementos na crosta terrestre.



**Fonte:** O próprio autor com dados obtidos no CRC Handbook of Chemistry and Physics Online. (JOHN R. RUMBLE, [s.d.]

<sup>1</sup> Na química, os orbitais são regiões no espaço que apresentam uma alta probabilidade de se encontrar um elétron. Os orbitais atômicos são classificados de acordo com sua energia, forma e direcionalidade, sendo que as letras s, p, d e f são utilizadas para diferenciar a forma desses orbitais.

Analisando a **Figura 1**, observa-se que os metais Ru, Pd, Rh, Re, Os, Ir, Pt e Au são os elementos que apresentam a menor abundância na crosta terrestre. Esse grupo de metais é denominado de “metais nobres”, tanto devido à sua escassez quanto a seu papel importante nas tecnologias atuais (em especial componentes eletrônicos) e seu uso na fabricação de joias e preciosidades. Isso faz com que o rutênio seja um reagente de custo elevado para ser utilizado na pesquisa, porém a diversa gama de aplicações que esse metal apresenta quando combinado com diferentes ligantes torna esse investimento viável do ponto de vista científico e tecnológico.

## 1.2 Complexos de Rutênio com ligantes polipiridínicos

As propriedades químicas de um complexo de coordenação dependem tanto do centro metálico em questão quanto dos ligantes aos quais ele está coordenado.<sup>2</sup> Uma das classes mais estudadas quando se trata de complexos de coordenação contendo Ru como centro metálico é a de complexos de rutênio com ligantes polipiridínicos (comumente chamados de rutênio-polipiridinas). Esse tipo de composto ganhou notoriedade após o estudo do composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , que apresenta propriedades fotoquímicas e fotofísicas distintas (DONGARE et al., 2017; ZAYAT et al., 2013), assim como seus derivados do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}]^{n+}$ , estudados inicialmente por Pinnick e Durham (PINNICK; DURHAM, 1984). Para o entendimento das propriedades fotoquímicas desses complexos, uma breve introdução à espectroscopia<sup>3</sup> de complexos de coordenação é necessária (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014; TOMA, 2016). A compreensão de um espectro eletrônico de um complexo de coordenação baseia-se primeiramente nas regras de seleção, descritas abaixo<sup>4</sup>:

- **Regra de seleção de Laporte:** em uma molécula centrossimétrica (aquela que possui um centro de inversão), a transição é permitida apenas se houver inversão de paridade na função de onda.
- **Regra de seleção de spin:** a multiplicidade de spin dos estados inicial e final é a mesma.

Pensando na transição entre dois orbitais de uma molécula, uma maneira simplificada de enxergar essas regras é utilizando os orbitais atômicos como racionalização. Orbitais s e d

---

<sup>2</sup> Um complexo de coordenação é uma espécie química de fórmula geral  $[\text{M}(\text{L})_n]^z$ , onde M é um átomo de um elemento metálico da tabela periódica e L são as estruturas que estão coordenadas (ligadas) ao átomo central. Dependendo da natureza do metal e dos ligantes, o valor de n (número de ligantes) e de z (carga do complexo) pode variar.

<sup>3</sup> Conjunto de técnicas experimentais que utilizam da interação com a luz para estudar a estrutura e as propriedades da matéria.

<sup>4</sup> Mais informações a respeito da espectroscopia eletrônica na seção 1.6.1 desse trabalho.

são funções pares (representadas pela letra g, do termo *gerade* em alemão) enquanto orbitais p e f são funções ímpares (representados pela letra u, do termo *ungerade*). Isso significa que uma transição entre orbitais s e p é permitida, pois a paridade é invertida. No entanto, transições p → p ou d → d por exemplo, são proibidas pela regra de Laporte. Em termos da regra de spin, o entendimento é mais simples: transições onde a somatória de spin dos elétrons<sup>5</sup> é alterada são proibidas e transições onde a somatória de spin se mantém são permitidas.

Além das regras de seleção, o entendimento de todas as transições que são passíveis de ocorrer em um complexo de coordenação é fundamental para a atribuição dessas transições em um espectro eletrônico. Para complexos mononucleares<sup>6</sup>, existem apenas 3 tipos de transições possíveis de ocorrer:

- **Transições centradas no metal (MC):** casualmente denominadas de transições d-d, são transições que ocorrem entre orbitais do centro metálico. Visto que essas transições são proibidas de acordo com a regra de Laporte (se tratando de complexos octaédricos, que possuem centro de inversão), elas apresentam uma baixa intensidade.
- **Transições intraligante (IL):** ocorrem entre orbitais apenas do ligante. Apresentam uma energia mais alta, geralmente abaixo dos 300 nm, e representam transições entre orbitais  $\pi \rightarrow \pi^*$  ou  $n \rightarrow \pi^*$ , característicos de grupos cromóforos de moléculas orgânicas e muito intensas<sup>7</sup>.
- **Transições de transferência de carga (CT):** são as transições que envolvem um orbital do centro metálico e outro do ligante. Dependendo da ordem desses orbitais, o nome da transição muda, gerando dois tipos de CT. O primeiro ocorre quando a transição é de um orbital com caráter do centro metálico para um orbital com caráter do ligante, sendo denominado transição de transferência de carga ligante-metal (LMCT), e o segundo é o inverso, denominado transição de transferência de carga metal-ligante (MLCT). A identificação de um tipo ou de outro deve ser realizada ao analisar a estrutura do composto em questão. Metais que apresentam um NOX<sup>8</sup> baixo apresentam um excesso de densidade eletrônica, portanto tendem a realizar transições MLCT mais facilmente. O raciocínio contrário também é válido para transições LMCT. Já os ligantes, por sua vez, são influenciados por sua natureza quando coordenados. Ligantes  $\pi$ -

<sup>5</sup> O spin é uma propriedade intrínseca dos elétrons e pode assumir valores de  $+\frac{1}{2}$  ou  $-\frac{1}{2}$ . Para sistemas com vários elétrons, esse valor é somado para cada elétron, gerando um spin total do sistema.

<sup>6</sup> Complexos de coordenação que apresentam apenas um átomo de metal em sua estrutura.

<sup>7</sup> Para moléculas, os orbitais passam a receber o nome utilizando letras gregas ( $\sigma$ ,  $\pi$ ,  $\delta$  etc.). A letra n é utilizada para um orbital não-ligante.

<sup>8</sup> Número de oxidação, carga formal do centro metálico.

aceptores recebem bem essa densidade eletrônica, portanto favorecem transições do tipo MLCT, enquanto ligantes  $\pi$ -doadores, pela lógica reversa, favorecem transições do tipo LMCT.<sup>9</sup> Características gerais desse tipo de transições são que suas energias normalmente caem no visível, com uma intensidade relativamente alta, já que são permitidas.

É comum dentro da química de coordenação que os estados excitados acessados através de uma determinada transição obtenham o mesmo nome dessa transição (por exemplo, um estado excitado gerado a partir de uma transição MLCT é um estado excitado  $^{2S+1}$ MLCT, onde  $2S + 1$  se refere à multiplicidade de spin desse estado eletrônico).

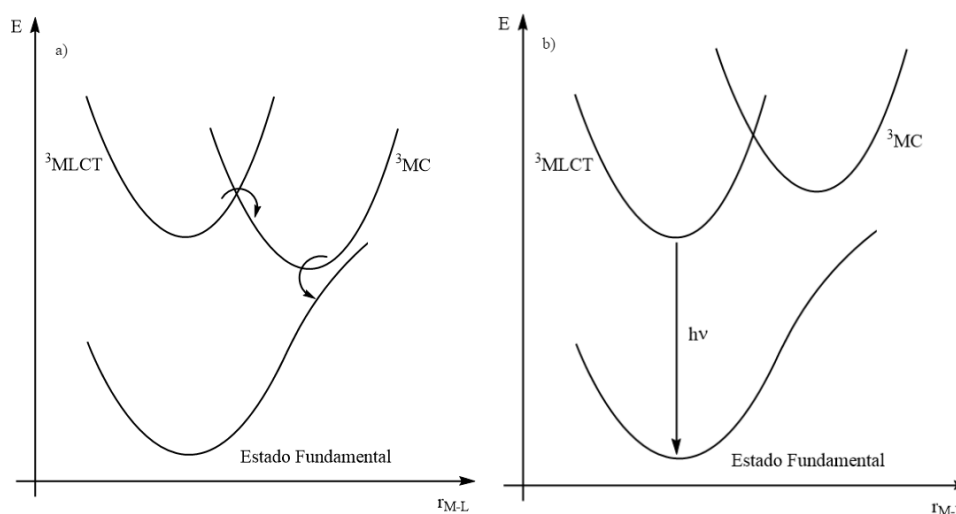
O fator determinante para explicar a fotoquímica dos rutênio-polipiridinas está na posição relativa dos níveis  $^3$ MLCT e  $^3$ MC, conforme ilustrado na **Figura 2**. No caso de uma molécula cujos estados excitados apresentam uma energia ordenada de acordo com a representação **a**), o decaimento radiativo do estado excitado  $^3$ MLCT é inibido devido à competição com a conversão interna  $^3$ MLCT  $\rightarrow$   $^3$ MC, sendo assim compostos com essa estrutura eletrônica não apresentam emissão. Porém, os rutênio-polipiridinas apresentam sua estrutura eletrônica conforme descrita na representação **b**), de maneira que a emissão é amplamente observada para essa classe de complexos, gerando seu comportamento fotoquímico (JURIS et al., 1988; ZAYAT et al., 2013). Essa posição relativa desses níveis eletrônicos pode ser alterada de acordo com os ligantes aos quais o Ru está coordenado, gerando moléculas que podem apresentar diversas aplicações na tecnologia, de maneira que moléculas da classe dos rutênio-polipiridinas são candidatos promissores na área de catálise, células solares ou até mesmo na farmácia (AKSAKAL et al., 2018; AMTHOR et al., 2021; AURAS et al., 2018; KNOLL; TURRO, 2015a; THOTA et al., 2018; ZHAO et al., 2009; ZHOU et al., 2009).

---

<sup>9</sup> Dentro da química de coordenação, a denominação  $\pi$ -aceptores e  $\pi$ -doadores é utilizada para ligantes que utilizam de seus orbitais  $\pi$  para retirar ou doar densidade eletrônica do metal (respectivamente).



**Figura 2:** Representações esquemáticas de dois casos possíveis de posições relativas entre os estados  $^3\text{MC}$  e  $^3\text{MLCT}$ .



**Fonte:** o próprio autor.

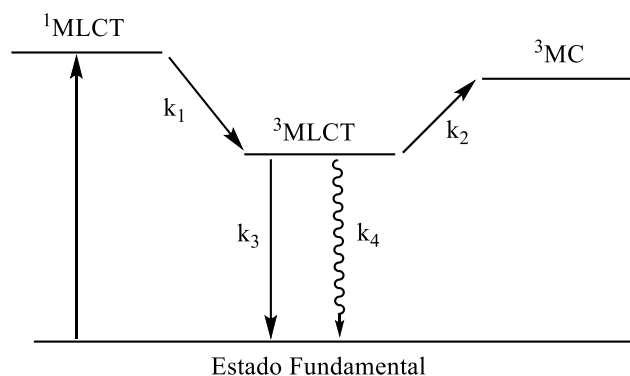
Outra propriedade importante desse tipo de composto, especialmente os do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}]^{n+}$ , é a de labilização dos ligantes monodentados X e Y a partir de uma reação mediada pela luz (PINNICK; DURHAM, 1984). A excitação luminosa de um complexo desse tipo ocorre normalmente na faixa entre 400 e 500 nm e é uma transição de transferência de carga do rutênio para a 2,2'-bipiridina ( $^1\text{MLCT}$ ), uma transição permitida por todas as regras de seleção. Seguindo o esquema apresentado na **Figura 3** o destaque para esse tipo de composto é que o cruzamento intersistema<sup>10</sup> apresenta uma alta constante cinética (representada por  $k_1$  no diagrama), de maneira que o estado  $^3\text{MLCT}$  se torna populado por esses elétrons excitados. Após esse cruzamento, os elétrons podem retornar ao estado fundamental por um decaimento radiativo<sup>11</sup> ou não-radiativo (representados por  $k_3$  e  $k_4$ , respectivamente) ou popular o estado MC (por ação da energia térmica no caso da representação acima), de caráter puramente metálico, o que aumenta a labilidade do ligante monodentado do complexo. Isso significa que um deslocamento hipsocrômico no espectro, interpretado como um estado  $^1\text{MLCT}$  de maior energia, irá refletir num estado  $^3\text{MLCT}$  também de maior energia e um estado MC mais populado. De maneira análoga, um maior potencial de redução do centro metálico irá refletir em um estado  $^1\text{MLCT}$  também de maior energia, com a mesma conclusão anterior. Desse modo,

<sup>10</sup> Para um melhor entendimento dos processos passíveis de ocorrer com um estado excitado, verificar o item 1.6.2 desse trabalho.

<sup>11</sup> Envolvendo a liberação de energia na forma de luz.

o espectro eletrônico, o potencial redox e a labilização dos ligantes monodentados estão todos relacionados e podem ser modulados pela variação dos ligantes polipiridínicos, de X e de Y.

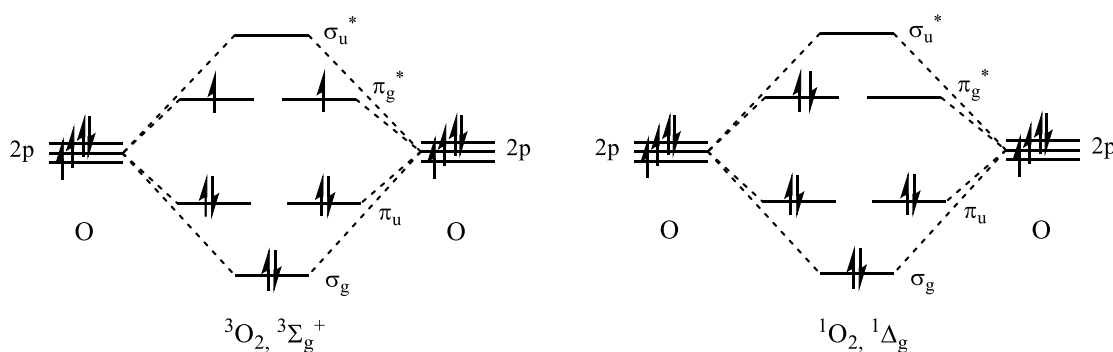
**Figura 3:** Diagrama simplificado de estados eletrônicos para um complexo do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}]^{n+}$ .



**Fonte:** o próprio autor.

Uma das aplicações mais estudadas para esse tipo de composto é sua utilização em terapia fotodinâmica (SIBATA et al., 2000), a partir da geração de  $^1\text{O}_2$ , uma molécula que faz parte do grupo das espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e que consiste em um estado excitado do oxigênio presente na atmosfera, cujo estado fundamental é o  $^3\text{O}_2$ . Para elucidar a diferença em suas estruturas eletrônicas, o diagrama de orbitais moleculares (DOM)<sup>12</sup> de cada espécie está ilustrado na **Figura 4**.

**Figura 4:** Diagrama de Orbitais Moleculares da camada de valência do  $^3\text{O}_2$  (esquerda) e  $^1\text{O}_2$  (direita).



**Fonte:** o próprio autor.

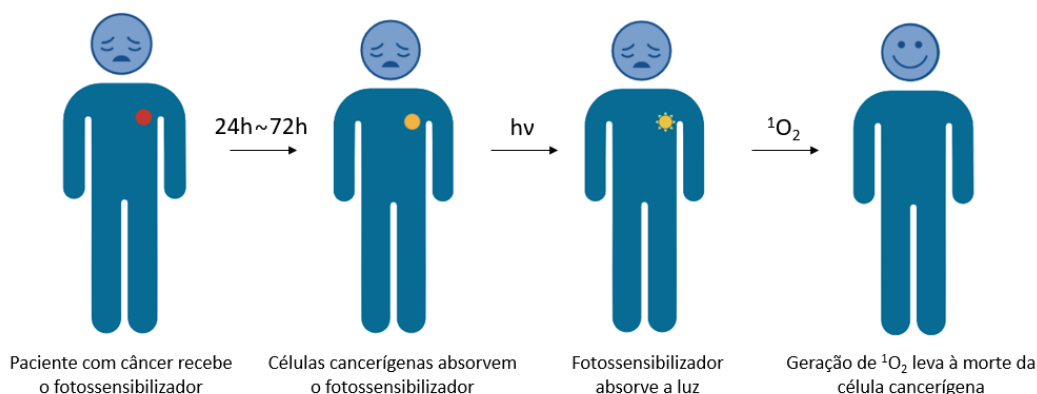
A geração de  $^1\text{O}_2$  através de uma transição  $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$  mediada pela radiação eletromagnética não pode ocorrer, visto que ela gera uma mudança na multiplicidade de spin, o que viola a regra de seleção de spin e, portanto, torna a transição proibida. Sendo assim, para

<sup>12</sup> Representação simplificada dos orbitais moleculares de uma molécula, ordenando-os em termos de energia.

que essa transição ocorra, é necessária uma molécula que capture energia em forma de radiação e consiga transferir essa energia ao  $^3\text{O}_2$ , promovendo sua excitação. Essa molécula é denominada fotossensibilizadora e sua utilização é essencial na terapia fotodinâmica.

Esse tratamento consiste nas etapas representadas na **Figura 5**, de maneira que os rutênio-polipiridinas, devido às suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas já discutidas, são fortes candidatos a fotossensibilizadores.

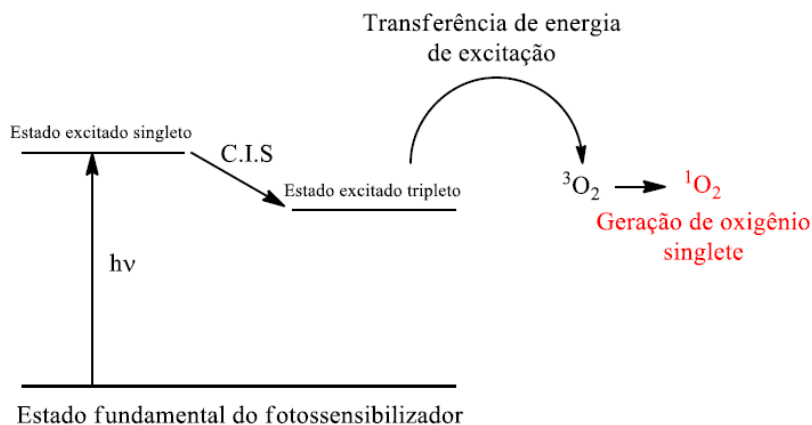
**Figura 5:** Esquema representado as etapas simplificadas da terapia fotodinâmica.



**Fonte:** o próprio autor, criado com BioRender.com

Os fotossensibilizadores, portanto, são espécies capazes de transferir sua energia de excitação (adquirida através da radiação eletromagnética) para o  $^3\text{O}_2$ , seguindo o diagrama simplificado da **Figura 6**. Esse tipo de fotossensibilizador, que realiza a transferência de energia eletrônica para o  $^3\text{O}_2$  é denominado um fotossensibilizador do tipo II (BAPTISTA et al., 2017).

**Figura 6:** Diagrama simplificado da geração de  $^1\text{O}_2$  por fotossensibilizadores.

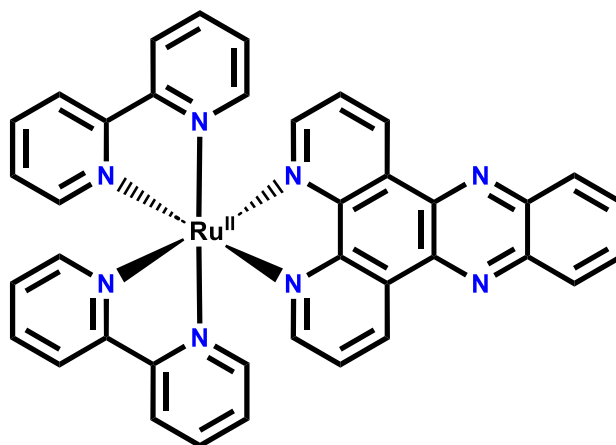


**Fonte:** o próprio autor.

### 1.3 Complexos de Rutênio e o ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

No ano de 1990, Friedman e seu grupo (FRIEDMAN et al., 1990) publicaram um resultado de grande importância para a química do rutênio envolvendo o ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz). No experimento conduzido por Friedman, o composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  (**Figura 7**) que não apresentava nenhum tipo de luminescência quando dissolvido em água, apresentou uma forte emissão quando solubilizado em uma solução aquosa contendo DNA, o que indicou uma interação entre as duas estruturas. Esse fenômeno ficou conhecido como “*light-switch effect*”, ou “efeito interruptor” em uma tradução livre, devido ao surgimento de uma radiação luminosa a partir da interação complexo:DNA.

**Figura 7:** Estrutura do complexo de coordenação estudado por Friedman em 1990.

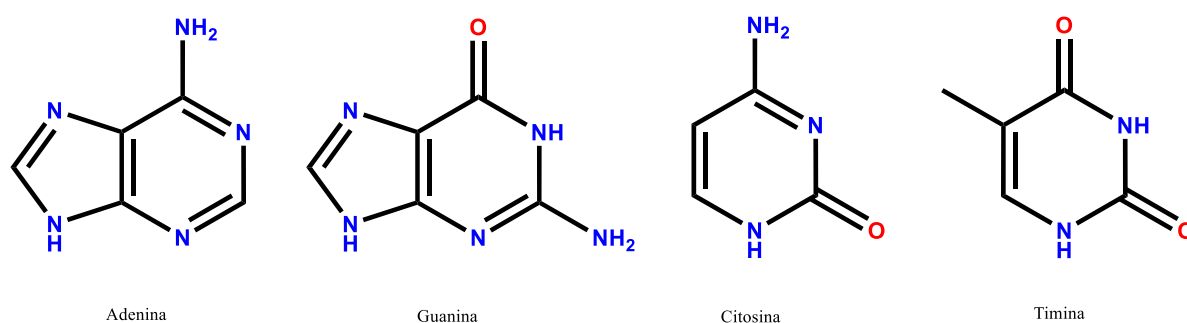


**Fonte:** o próprio autor.

Após essa descoberta, o número de pesquisas envolvendo complexos de rutênio coordenados com dppz e seus derivados aumentou exponencialmente, com o objetivo de desenvolver novos metalofármacos capazes de danificar seletivamente as fitas de DNA e avançando um pouco mais na luta contra o câncer (CHEN et al., 1997; DI PIETRO et al., 2021; KOMOR; BARTON, 2013; SOLIMAN; GASSER; THOMAS, 2020; SUN et al., 2010; YUSOH et al., 2020; ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007). A interação que é realizada entre o ligante dppz e o DNA é denominada intercalação, o que coloca esse ligante na categoria dos intercaladores. A química por trás dessa interação é relativamente simples e elucidada a importância da estrutura do dppz nesse efeito. É conhecido que o DNA é composto principalmente pelas bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina (**Figura 8**).

As ligações presentes nessa estrutura são caracterizadas como ligações duplas que são formadas por sobreposição lateral de orbitais atômicos, gerando um orbital molecular do tipo  $\pi$ . Esses orbitais  $\pi$  se encontram fora do plano da molécula e podem realizar interações que orbitais do tipo  $\sigma$ , característicos de sobreposições frontais entre orbitais atômicos, não podem. Observando a estrutura da dppz, é possível inferir que essa molécula também apresente orbitais  $\pi$  ao longo de toda sua estrutura, devido ao alto grau de conjugação. Esses orbitais da dppz podem interagir com os orbitais  $\pi$  das bases nitrogenadas, formando um sistema intercalador-DNA que é estabilizado por forças de Van der Waals<sup>13</sup>, interações hidrofóbicas e, principalmente, interações de empilhamento- $\pi$  (DI PIETRO et al., 2021).

**Figura 8:** Estrutura das bases nitrogenadas presentes no DNA.



**Fonte:** o próprio autor.

#### 1.4 Nitrosilos de Rutênio

Outra classe de compostos de interesse para os químicos inorgânicos são os nitrosilos de rutênio, ou seja, complexos de coordenação de rutênio que apresentam óxido nítrico (NO) como ligante. Essa molécula é encontrada principalmente em fase gasosa na atmosfera terrestre em pequenas quantidades, apresenta uma alta reatividade e é considerada um dos principais responsáveis pela degradação da camada de ozônio. Apesar de inicialmente essa molécula não aparentar possuir alguma atividade biológica de interesse, na década de 1980 surgiram pesquisas mostrando que essa molécula apresenta diversas funções biológicas no corpo humano, indo desde mensageira celular até defensora do organismo, com ação antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; IGNARRO, 2009). A partir da descoberta dessas aplicações biológicas do NO, uma linha de pesquisa voltada para o desenvolvimento de compostos liberadores dessa molécula foi iniciada, na qual essas moléculas

<sup>13</sup> Interações intermoleculares fracas entre duas moléculas apolares.

são conhecidas como NORMs (*Nitric Oxide Releasing Molecules*) e apresentam uma capacidade de liberar o NO em quantidades terapêuticas, visto que em excesso essa molécula pode também causar danos ao organismo (**Tabela 1**). A linha entre as aplicações biológicas de interesse e a toxicidade do NO no organismo é tênue, portanto, o desenvolvimento das NORMs se torna uma linha de pesquisa complexa que envolve áreas de pesquisa além da química, como farmácia, biologia, física e medicina (MIR; MALIK; MAURYA, 2019).

**Tabela 1:** Efeitos positivos e negativos que o NO pode exercer no organismo.

O Óxido Nítrico (NO) no organismo:	
Quando em concentrações normais	Quando presente em altas concentrações
Modula a resposta imunológica	Formação de óxidos de nitrogênio reativos
Exerce controle cardiovascular	Afeta as funções cardíacas
Participa na atividade neurotransmissora	Se liga irreversivelmente ao citocromo P450
Inibição de crescimentos tumorais	Compete com O <sub>2</sub> na citocromo oxidase
Auxilia na vasodilatação	Causa hipotensão

Fonte: Ignarro et al. (IGNARRO, 2009) e Cullota et al. (CULLOTA; KOSHLAND, 1992).

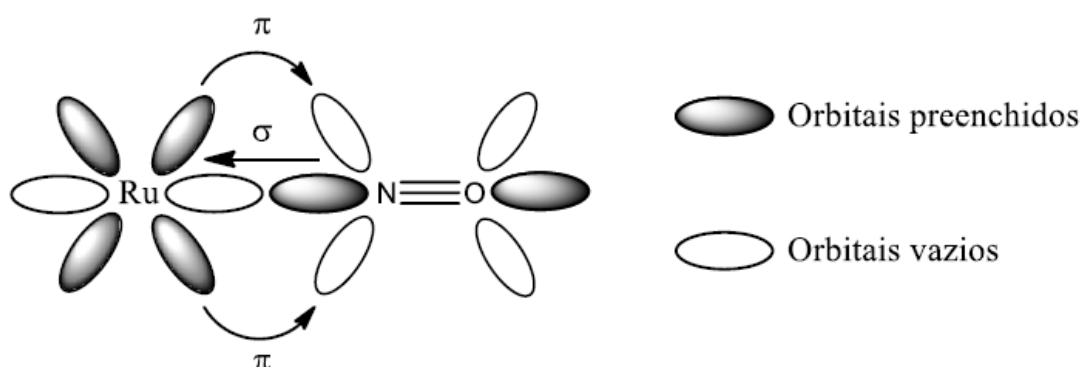
No desenvolvimento de novas moléculas candidatas a NORMs, os compostos de coordenação receberam destaque, visto que uma ligação de coordenação típica é mais fraca que uma ligação covalente em um composto orgânico, facilitando assim sua quebra e, conseqüentemente, a liberação do ligante NO.

Dentro da química de coordenação, o NO é considerado um “ligante não inocente”, ou seja, mesmo quando reage na sua forma neutra, ele pode assumir caráter de NO<sup>+</sup> ou NO<sup>-</sup> após a coordenação (IGNARRO, 2009). Tendo em vista esse problema, uma notação criada por Enemark e Feltham foi criada para descrever uma ligação do tipo M-NO que englobasse o caráter não inocente dessa ligante (ENEMARK; FELTHAM, 1974). A notação {M-NO}<sup>n</sup> indica a ligação do tipo M-NO onde n é a soma do número de elétrons do centro metálico com o número de elétrons do orbital π\* do NO. Sabe-se que a espécie NO neutra é radicalar, apresentando um elétron em seu orbital π\*, logo a espécie NO<sup>+</sup> não apresenta nenhum elétron no orbital π\*. No caso de um nitrosilo de rutênio, a notação {Ru-NO}<sup>6</sup> é utilizada então para descrever um sistema no qual essa ligação pode ser do tipo Ru(III)-NO ou Ru(II)-NO<sup>+</sup>.

Para complexos de Ru(II) octaédricos, a ligação é descrita na maioria dos casos como Ru(II)-NO<sup>+</sup>, visto que a espectroscopia vibracional revela frequências de estiramento referentes à espécie NO<sup>+</sup> coordenada ao invés do radical NO, que apresenta frequências de estiramento consideravelmente menores (BARBOSA et al., 2017; POELHSITZ et al., 2007; ROSE; MASCHARAK, 2008; SILVA et al., 2018).

O NO também é considerado um ligante  $\pi$ -aceptor dentro da química de coordenação, isto é, interage com o centro metálico de maneira que existe uma doação de densidade eletrônica do metal para o ligante através de uma interação  $\pi$ . Esse fenômeno também é conhecido como retrodoação e é de extrema importância para o entendimento das NORMs baseadas em complexos de coordenação. Destaca-se que a espécie que apresenta um maior caráter  $\pi$ -aceptor é o NO<sup>+</sup> em relação ao NO radicalar, visto que apresenta orbitais  $\pi^*$  sem nenhum elétron, tornando a aceção de elétrons dos orbitais d cheios do centro metálico mais acentuada.

**Figura 9:** Representação simplificada dos orbitais na retrodoação entre um centro metálico de Ru e o NO.



**Fonte:** o próprio autor.

Conhecendo a natureza desses orbitais, entende-se o motivo desses compostos serem classificados como NORMs. A irradiação de um nitrosilo de rutênio na região da banda MLCT causará uma excitação de um elétron que se encontra em um orbital de caráter metálico para um orbital de caráter do ligante, que no caso é o orbital vazio antiligante da ligação N-O. O fato desse orbital estar preenchido após a irradiação com luz enfraquece o efeito da retrodoação, ou seja, enfraquece a própria ligação Ru(II)-NO<sup>+</sup>, labilizando esse ligante. Visto que no caso dessa classe de moléculas a liberação de NO é induzida por luz, elas são categorizadas como photoNORMs, uma subclasse dentro das NORMs que é muito bem representada dentro dos complexos de coordenação (IMBERTI et al., 2020; NAVALE; SINGH; GHOSH, 2023).

## 1.5 Interação com Biomoléculas

Conforme evidenciado por todas as propriedades citadas nos itens acima, a interseção entre as áreas da química inorgânica e da química medicinal vem crescendo cada vez mais com o passar dos anos, desde a descoberta das propriedades anticâncer da cisplatina em 1960 (MIRANDA, 2022; ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965).

A partir dessa descoberta, a química inorgânica medicinal tomou forma e cada vez mais estudos surgiram visando estudar como esses complexos de coordenação interagem com biomoléculas alvo, em especial com o DNA e a albumina do soro humano (HSA) (BAL et al., 2013; LAZAREVIĆ; RILAK; BUGARČIĆ, 2017).

### 1.5.1 O ácido desoxirribonucleico (DNA)

A molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) é sempre um alvo importante a ser estudado devido à sua relevância para a química e biologia como um todo. Sua constituição se dá por unidades monoméricas de nucleotídeos, onde cada nucleotídeo apresenta açúcares (conhecidos como desoxirriboses), uma base contendo nitrogênio (base nitrogenada) ligada a esses açúcares e um grupo fosfato. O DNA apresenta quatro tipos de nucleotídeos diferentes que se diferenciam entre si somente com relação à base nitrogenada (adenina, citosina, guanina e timina, apresentadas na **Figura 8**, na seção 1.3 desse trabalho). A estrutura do DNA é formada por duas cadeias polinucleotídicas que, unidas por interações fracas (em especial ligações de hidrogênio), formam uma estrutura denominada de dupla hélice, que caracteriza a estrutura da macromolécula de DNA (CALLADINE; DREW, 2004).

A importância do DNA para a manutenção da vida torna essa biomolécula um alvo essencial para estudos iniciais no desenvolvimento de novos medicamentos, de maneira que atingir a molécula de DNA pode implicar na regulação de funções celulares através da interferência na replicação celular ou na modulação da expressão gênica, logo, entender o tipo de interação que um candidato a fármaco apresenta com o DNA é o primeiro passo (KOMOR; BARTON, 2013).

As interações com o DNA podem ser inicialmente divididas em dois grandes grupos: covalente e não-covalentes. As covalentes consistem basicamente na formação irreversível de adutos entre pequenas moléculas e o DNA, o que causam sua inibição completa e, por



consequência, a apoptose<sup>14</sup> da célula (BOLT; LAIB, 1980). Já as não-covalentes são interações geralmente reversíveis e que mudam a conformação do DNA, podendo gerar efeitos positivos ou negativos a depender da aplicação desejada. As interações do tipo não-covalentes podem ser classificadas como interação por intercalação ou ligação nos sulcos do DNA (REHMAN et al., 2015).

Para o escopo desse trabalho, o tipo de interação de maior interesse é a intercalação, cujo mecanismo ocorre conforme descrito no item 1.3. A vantagem de estudar uma interação não-covalente reversível é que, em comparação com a interação covalente da cisplatina, que apresenta efeitos colaterais severos para o corpo humano (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014), a intercalação com o DNA pode gerar efeitos próximos aos da cisplatina, porém com efeitos colaterais mais brandos (KELLETT et al., 2019).

#### 1.5.2 A Albumina do Soro Humano (HSA)

A albumina do soro humano (*Human Serum Albumin, HSA*) é a proteína globular mais abundante do plasma sanguíneo, onde representa mais de 50% das proteínas séricas. Apresenta uma massa molecular de aproximadamente 66kDa e sua estrutura primária<sup>15</sup> é constituída por 585 resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica<sup>16</sup>. Já sua estrutura é composta por três domínios principais (I, II e III) em que cada um apresenta dois subdomínios A e B. O armazenamento de compostos é realizado nos subdomínios IIA e IIIA, por isso esses sítios também são conhecidos como sítios I e II de Sudlow (FANALI et al., 2012; LEE; WU, 2015; THEODORE PETERS, 1995).

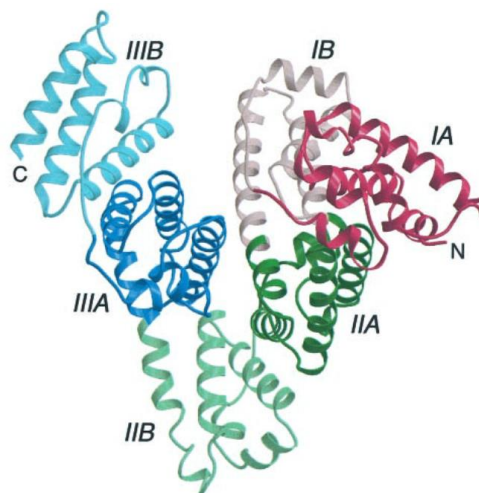
---

<sup>14</sup> Morte celular programada, um mecanismo natural essencial para manutenção da vida a partir da eliminação de células defeituosas.

<sup>15</sup> Nível estrutural mais simples de uma proteína, descrição de como seria a proteína caso fosse uma molécula linear.

<sup>16</sup> Uma ligação peptídica é aquela que une dois aminoácidos, logo uma cadeia polipeptídica consiste em uma cadeia de diversos aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas.

**Figura 10:** Estrutura cristalina da HSA com destaque da localização de seus principais sítios de interação.



**Fonte:** (BHATTACHARYA; CURRY; FRANKS, 2000).

A albumina apresenta uma importante função fisiológica: o transporte e a ligação com muitos compostos presentes no plasma sanguíneo, podendo ser ácidos graxos, hormônios ou até mesmo fármacos. (FANALI et al., 2012). A ligação da HSA com diferentes tipos de compostos e a natureza de suas interações, portanto, é um tópico de interesse no desenvolvimento de novos fármacos, avaliando como a presença desses fármacos ligados com a HSA pode influenciar sua absorção, distribuição ou excreção no corpo humano. Uma vez que a HSA possui resíduos de aminoácidos fluorescentes (triptofano e tirosina), é comum analisar essas interações a partir de espectroscopia de emissão ou, além disso, utilizar a técnica de dicroísmo circular para avaliar alterações na estrutura secundária<sup>17</sup> dessa proteína (DA SILVA et al., 2018, 2020b; ESPÓSITO; NAJJAR, 2002; SARMENTO et al., 2022; ZHIVKOVA, 2015).

## 1.6 Ferramentas para caracterização de moléculas

Visto que a escala de espaço das moléculas é da ordem de  $1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$ , ou seja, muito abaixo do limite no qual a visão humana consegue atuar, os cientistas necessitam de técnicas que os permitam visualizar sua estrutura de maneira indireta. Uma grande parte dessas técnicas consiste em analisar a interação da molécula alvo com a luz em diferentes comprimentos de onda (dando origem às diversas espectroscopias). Algumas dessas técnicas serão aplicadas e

<sup>17</sup> Conformação espacial local das cadeias polipeptídicas.

interpretadas nesse trabalho, portanto uma breve introdução será feita para aquelas que foram utilizadas.

### 1.6.1 Espectroscopia de absorção

Quando incididas com radiação eletromagnética, as moléculas são capazes de absorvê-la em comprimentos de onda específicos que dependem de sua estrutura. Essa absorção ocorre devido à uma transição entre dois estados de energia diferentes dessa molécula e pode acontecer em qualquer região do espectro eletromagnético, dependendo apenas dessa diferença de energia. Porém, dependendo da natureza desses estados de energia, é mais comum que suas transições ocorram em regiões específicas do espectro eletromagnético. Sabe-se que a energia total de uma molécula é uma contribuição de 4 fatores principais:

$$E = E_t + E_r + E_v + E_e \quad \text{Equação I}$$

Na **Equação I**, os subscritos se referem às energias translacional, rotacional, vibracional e eletrônica, respectivamente (P. W. ATKINS, 2014). A diferença de energia entre níveis de cada uma dessas naturezas é crescente, de maneira que a diferença entre níveis eletrônicos é tipicamente maior do que a de níveis vibracionais, que por sua vez é maior do que de níveis rotacionais e essa, por sua vez, é maior do que diferença entre níveis translacionais. Sabe-se que a energia de qualquer um desses níveis é quantizada e que a absorção da radiação eletromagnética ocorre apenas no comprimento de onda exato que corresponde à diferença de energia daquela transição. Para uma transição qualquer entre dois níveis, a mecânica quântica demonstra que a integral de momento de dipolo da transição ( $\mu_f$ ), representada pela **Equação II**, deve ser diferente de 0 para que uma transição entre os estados  $\psi_i$  e  $\psi_f$  ocorra (DONALD A. MCQUARRIE; JOHN D. SIMON, 1997).

$$\mu_f = \int \psi_f^* \hat{\mu} \psi_i d\tau \quad \text{Equação II}$$

Para que o valor dessa integral seja diferente de 0, algumas condições com relação às funções de onda (e, por consequência, com relação aos estados inicial e final da transição) devem ser cumpridas. Essas condições são denominadas regras de seleção e são de extrema importância para o entendimento da espectroscopia, de maneira que algumas delas foram descritas no item 1.2 deste capítulo para a espectroscopia eletrônica.

Tendo essas informações em mente, é conclusivo que a depender do tipo de transição que o pesquisador pretende analisar, a energia da radiação eletromagnética muda. Visto que os

níveis translacionais se referem ao movimento em 3 dimensões da molécula, a diferença de energia entre esses níveis é extremamente pequena, de maneira que não existe uma técnica espectroscópica capaz de acompanhar transições entre esses níveis e, portanto, não são muito estudados dentro dessa área. Os níveis rotacionais, por sua vez, apresentam uma diferença de energia que normalmente ocorre na região do microondas, podendo, portanto, serem estudados quando radiação eletromagnética nessa região é incidida sobre a molécula. Como tal técnica não foi utilizada nesse trabalho, ela não será discutida em detalhes. A primeira espectroscopia relevante para esse trabalho é a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), também conhecida como espectroscopia vibracional, em referência à natureza dos níveis de energia nos quais a transição ocorre nessa região do espectro eletromagnético (PAVIA et al., 2009). As regras de seleção para essa espectroscopia dizem que apenas os modos de vibração que apresentam variação no momento de dipolo total da molécula são ativos no IV e que as transições devem ocorrer entre níveis vibracionais adjacentes (considerando que os níveis vibracionais são comumente denominados pela letra  $v$ , essa regra implica que  $\Delta v = \pm 1$ ). Levando em conta o modelo do oscilador harmônico, a energia da vibração de uma molécula está diretamente relacionada com a constante de força  $k$  a partir da relação mostrada na **Equação III**.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Equação III}$$

Nessa equação,  $\mu$  representa a massa reduzida da molécula e  $\tilde{\nu}$  o número de onda associado àquela vibração. Esse número de onda, normalmente expresso em  $\text{cm}^{-1}$ , é o parâmetro utilizado na espectroscopia vibracional para determinar a estrutura de uma molécula, visto que cada tipo de ligação apresenta uma energia diferente e, portanto, pode ser identificado em um espectro vibracional (NAKAMOTO, 1997).

De maneira análoga à espectroscopia vibracional, a espectroscopia eletrônica é utilizada para identificar a energia das transições eletrônicas das moléculas, que normalmente ocorrem na região do UV-Vis. Nesse tipo de espectroscopia, a amostra é incidida com um feixe de luz nessa região à uma certa intensidade inicial  $I_0$  e a intensidade final  $I$  é detectada pelo instrumento. A razão entre essas duas intensidades é denominada de absorvância ( $A$ ), que se relaciona com a concentração ( $c$ ) e o caminho óptico de uma amostra a partir da Lei de Lambert-Beer (**Equação IV**) (SKOOG et al., 2008).

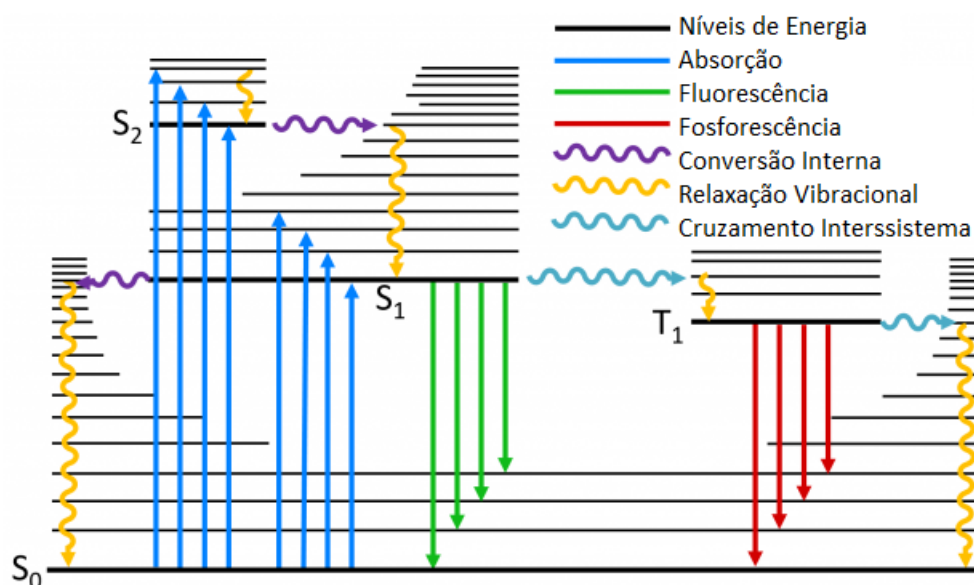
$$A = \epsilon bc \quad \text{Equação IV}$$

O símbolo  $\epsilon$  representa o coeficiente de absorvidade molar e é um indicativo da intensidade daquela transição eletrônica, um fator que é diretamente afetado pelas regras de seleção descritas no item 1.2 deste capítulo. Esse parâmetro também é utilizado na caracterização de moléculas, visto que seu valor se altera dependendo da estrutura eletrônica de cada analito. A espectroscopia eletrônica de absorção, então, se torna muito útil para determinar a energia e a intensidade das transições eletrônicas que podem ocorrer na molécula que está sendo analisada. É importante destacar que o movimento rotacional e vibracional das moléculas afeta diretamente seu espectro eletrônico, bem como o solvente que está sendo utilizado, de maneira que os espectros de absorção eletrônica não são constituídos de picos finos, mas sim de bandas largas que são resultado de todos esses efeitos combinados, impossibilitando uma análise mais rigorosa dos níveis eletrônicos da molécula. Para isso, mais técnicas devem ser aplicadas.

#### 1.6.2 Espectroscopia de emissão

Apesar da absorção ser o fenômeno mais comum quando se trata de interações da matéria com a luz, o estudo da emissão luminosa também é de extrema importância para o entendimento da estrutura eletrônica de uma molécula. O fenômeno de emissão consiste basicamente no decaimento de um elétron de um nível eletrônico de maior energia para um de menor energia, liberando energia na forma de radiação eletromagnética. Esses estados eletrônicos de maior energia, denominados de estados excitados, podem reagir de maneira muito diferente do estado fundamental da mesma molécula, podendo ser considerados praticamente uma molécula diferente. A **Figura 11** demonstra os possíveis fenômenos que são passíveis de ocorrer em uma molécula.

**Figura 11:** Diagrama de Jablonski mostrando os processos que podem ocorrer entre estados eletrônicos de uma molécula com estado fundamental singlete.



**Fonte:** Adaptado de <https://www.edinst.com/us/blog/jablonski-diagram>, acessado em 06/12/2022.

Com auxílio dessa figura, alguns dos mais importantes fenômenos da fotoquímica podem ser introduzidos. Naturalmente, o fenômeno mais comum de ocorrer é a absorção, representada pela seta azul na figura, que consiste na passagem de um elétron de um nível eletrônico para outro de maior energia quando incidido por uma radiação eletromagnética cuja energia corresponde exatamente à diferença entre esses níveis (HARRIS; BERTOLUCCI, 1978; PAVIA et al., 2009). Como já descrito no item anterior, os níveis vibracionais apresentam uma diferença de energia muito menor do que os eletrônicos, portanto uma absorção pode ocorrer entre quaisquer níveis vibracionais presentes nos dois estados eletrônicos envolvidos na transição, levando em conta que a regra de seleção  $\Delta v = \pm 1$  não é perfeitamente válida para sistemas reais que não são mais bem descritos pelo modelo quântico do oscilador harmônico. Após a molécula atingir um nível vibracional excitado em um estado eletrônico também excitado, o sistema pode perder energia através dos fenômenos de decaimentos não radiativos, seja por relaxação vibracional (decaindo para estados vibracionais de menor energia dentro do mesmo nível eletrônico, seta amarela), ou pelos fenômenos de conversão interna (passagem para um estado eletrônico de menor energia de mesma multiplicidade, seta roxa) ou cruzamento intersistema (passagem para um estado eletrônico de menor energia de multiplicidade diferente,

seta azul) (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014; DONALD A. MCQUARRIE; JOHN D. SIMON, 1997; P. W. ATKINS, 2014).

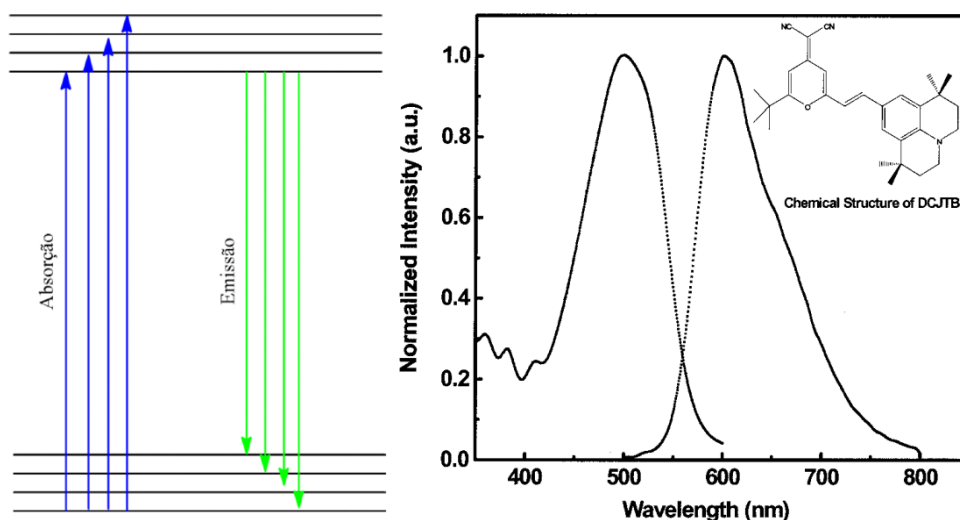
Outro fenômeno passível de ocorrer nas moléculas são os decaimentos radiativos, consistindo basicamente na passagem de um elétron de um nível eletrônico de maior energia para um outro de menor energia. Quando essa transição ocorre entre níveis de mesma multiplicidade de spin, ela é denominada como fluorescência (seta verde) e quando ocorre entre níveis de multiplicidade de spin diferentes é denominada fosforescência (seta vermelha). A principal diferença entre os processos radiativos e não radiativos, além do envolvimento da radiação eletromagnética, é também a escala de tempo na qual esses processos ocorrem. Processos não radiativos ocorrem em uma escala de tempo muito menor, especialmente na fase condensada, conforme enuncia a Regra de Kasha (KASHA, 1950). Essa regra enuncia que quaisquer fenômenos de decaimento radiativos, quando em fase condensada, ocorrem partindo apenas do estado vibracional fundamental do estado eletrônico excitado de menor energia. Uma possível interpretação para essa regra é de que, em fase condensada, ocorre a perda de energia em forma de calor devido ao contato com diversas outras moléculas no sistema, favorecendo esses processos não radiativos. Essa regra é válida para a imensa maioria das moléculas em condições experimentais comuns de laboratório, incluindo compostos de coordenação, e é um conceito de extrema importância para o entendimento da fotoquímica dessa classe de compostos.

A partir dos conceitos apresentados até aqui, é possível realizar a distinção entre um espectro de absorção e um de emissão. A princípio, seria de se esperar que esses dois espectros sejam exatamente idênticos, visto que são originados dos mesmos níveis eletrônicos, apresentando a mesma diferença de energia. No entanto, analisando o diagrama de Jablonski simplificado da **Figura 12**, é possível notar que o espectro de emissão apresenta um deslocamento batocrômico<sup>18</sup> com relação ao espectro de absorção.

---

<sup>18</sup> Deslocamento para uma região de menor energia no espectro.

**Figura 12:** Diagrama de Jablonski simplificado (esquerda) para os fenômenos radiativos que geram os espectros de absorção e emissão da molécula DCJTB (direita).



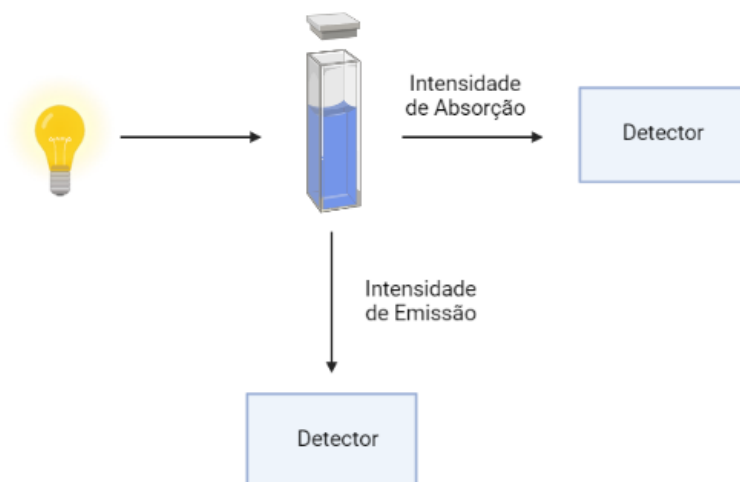
**Fonte:** o próprio autor (esquerda), Lu W. et al. (direita) (LU; ZHONG; MA, 2004).

Esse deslocamento ocorre devido justamente à Regra de Kasha. A perda de energia por decaimentos não radiativos faz com que a emissão libere fótons com uma energia menor do que os que foram absorvidos, causando esse efeito nos espectros (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014).

Em termos da instrumentação, a espectroscopia de emissão se assemelha à de absorção, com exceção de uma importante diferença, conforme ilustra a **Figura 13**. Na espectroscopia de emissão, o detector de intensidade luminosa é colocado à 90° da amostra, já que nessa técnica o parâmetro de interesse já não é mais a intensidade da luz após atravessar a amostra, mas sim a intensidade da luz emitida por ela. Sendo assim, a posição do detector é de extrema importância para que sejam medidos apenas os fótons provenientes da emissão da amostra, e não os que vieram da fonte luminosa do instrumento (SKOOG et al., 2008).



**Figura 13:** Esquema representando a posição dos detectores em um espectrômetro de absorção e de emissão.



**Fonte:** o próprio autor, criado com BioRender.com.

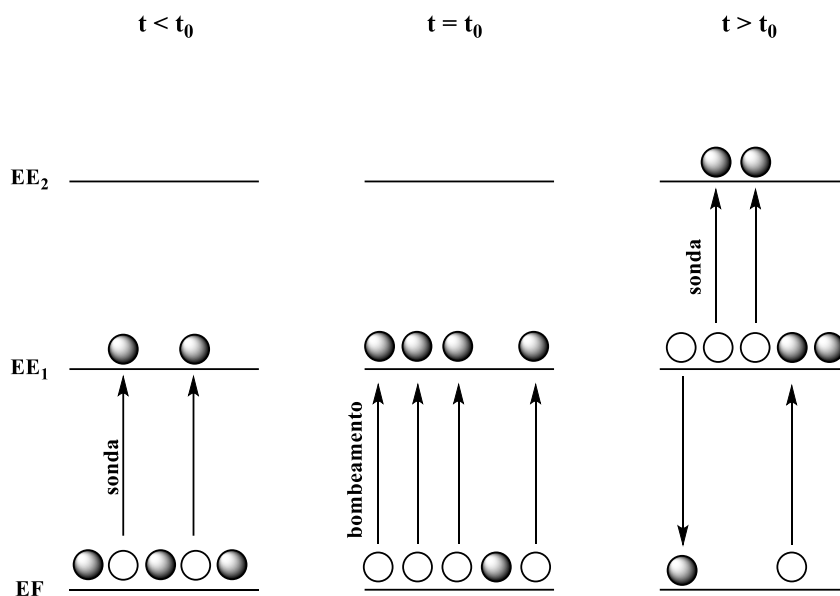
Os dados de emissão eletrônica, quando aliados com os de absorção, são o primeiro passo para o entendimento da estrutura eletrônica de uma molécula. A partir desses dados, técnicas mais sofisticadas podem ser utilizadas para uma descrição mais completa dos estados eletrônicos.

### 1.6.3 Espectroscopia de absorção resolvida no tempo

Além da espectroscopia de absorção comum, outra técnica baseada em princípios semelhantes, porém muito mais sofisticada é a espectroscopia de absorção resolvida no tempo, também conhecida como espectroscopia de absorção transiente. Essa técnica, do tipo “*pump-probe*” é utilizada para determinar a energia e o tempo de vida de estados excitados gerados de moléculas a partir da interação com a radiação eletromagnética (G. PORTER, 1950).

Apesar da construção de um equipamento para essa técnica ser extremamente complicada, o princípio por trás da técnica é relativamente simples de ser elucidado. O nome “*pump-probe*” se deve ao fato de a amostra ser irradiada por uma fonte de luz (um pulso de bombeamento, *pump*) ao mesmo tempo que uma segunda fonte de luz (pulso de sonda, *probe*) mede a variação da absorção da amostra em função do comprimento de onda e do tempo (PORTER, 1968).

**Figura 14:** Esquema representando o princípio por trás de um experimento de espectroscopia de absorção resolvida no tempo.



Fonte: o próprio autor.

Conforme elucidado na **Figura 14**, inicialmente o experimento mede a absorção da amostra quando o pulso de sonda causa uma transição eletrônica do estado fundamental (EF) para o primeiro estado excitado ( $EE_1$ ) e um espectro de absorção eletrônica comum é registrado. Quando a amostra é atingida com o pulso de bombeamento (no instante  $t = t_0$ ), a grande maioria dos elétrons presentes no estado fundamental populam o primeiro estado excitado. Após esse instante, o pulso de sonda agora detecta também a absorção do estado  $EE_1$  para um estado de ainda maior energia  $EE_2$ , registrando o espectro de absorção eletrônica da amostra em função do tempo após o bombeamento. O espectro final para um experimento de absorção transiente consiste no valor de  $\Delta OD_t$ , que significa basicamente a variação na absorção da amostra quando submetida ao bombeamento. Por padrão, espera-se um abaixamento na região da absorção do estado fundamental (visto que a partir do bombeamento, o estado fundamental não apresentará uma alta população) ao mesmo tempo que ocorrerá um aumento em uma região referente à absorção do primeiro estado excitado da amostra (G. PORTER, 1950).

Destaca-se aqui também que a escala de tempo na qual a espectroscopia de absorção resolvida no tempo consegue ser realizada depende do aparato experimental disponível. No geral, existem duas escalas de tempo utilizadas nesses experimentos a depender da problema a ser resolvido, sendo elas a escala de nanossegundos, gerando o experimento de ns-TA

(*nanosecond transient absorption*, ou também conhecida como *flash photolysis*) ou a escala de femtossegundos, gerando o fs-TA (*femtosecond transient absorption*, ou também conhecida como *ultra-fast transient absorption*). A depender do tempo de vida do estado excitado que está sendo investigado, a utilização de uma ou de outra se faz necessária. (BERERA; VAN GRONDELLE; KENNIS, 2009; PORTER, 1968)

#### 1.6.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Quando se trata de caracterização de compostos, em especial compostos de coordenação, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais utilizadas para a elucidação de estruturas químicas.

Seus princípios se baseiam no fato de que, assim como os elétrons, os núcleos também apresentam um momento angular intrínseco de spin, normalmente denominado pela letra  $I$ . A depender do número de prótons e nêutrons do núcleo,  $I$  pode assumir diferentes valores, inteiros ou fracionários. Sabe-se do estudo do magnetismo (DAVID HALLIDAY; ROBERT RESNICK; JEARL WALKER, 2016) que a energia potencial de um dipolo magnético  $\mu$  na presença de um campo magnético  $B$  pode ser descrita pela **Equação V**:

$$V = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad \text{Equação V}$$

Considerando um campo magnético unidirecional no eixo arbitrário  $z$ , o produto vetorial pode ser substituído por um simples produto escalar:

$$V = -\mu_z \cdot B_z \quad \text{Equação VI}$$

Sabendo que o momento magnético nuclear é definido em função da razão giromagnética nuclear  $\gamma_N$  e do spin nuclear  $I$ , a energia potencial de um núcleo de spin nuclear  $I$  quando submetido à um campo magnético  $B$  na direção  $z$  é descrita por:

$$V = -\gamma_N B_z I_z \quad \text{Equação VII}$$

Portanto, o operador hamiltoniano para essa energia potencial onde  $\gamma_N$  e  $B_z$  são constantes pode ser descrito como:

$$\hat{H} = -\gamma_N B_z \hat{I}_z \quad \text{Equação VIII}$$

Aplicando esse hamiltoniano na equação de Schrödinger, obtém-se o autovalor do operador de momento de spin nuclear:

$$\hat{H}\psi = E\psi$$

$$-\gamma_N B_z \hat{I}_z \psi = E\psi$$

$$\hat{I}_z \psi = \hbar m_I \psi \quad ; \quad m_I = I, I - 1, I - 2, \dots, -I \quad \text{Equação IX}$$

Na **Equação IX**, o número quântico de spin nuclear  $m_I$  aparece como resultado da resolução da equação de Schrödinger, sendo análogo ao número quântico de spin eletrônico  $m_s$  e indicando a orientação do vetor de momento de spin nuclear com relação ao eixo z. Substituindo esse resultado novamente no hamiltoniano:

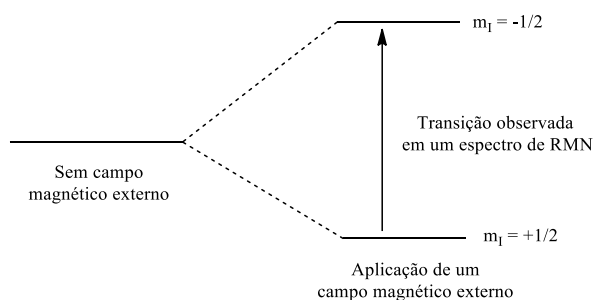
$$-\gamma_N B_z (\hbar m_I) \psi = E\psi$$

$$E = -\hbar \gamma_N m_I B_z \quad ; \quad m_I = I, I - 1, I - 2, \dots, -I \quad \text{Equação X}$$

A **Equação X** revela um fato muito importante: os níveis de energia associados aos estados de spin  $m_I$  de um núcleo são degenerados apenas na ausência de um campo magnético. Sabendo disso, o conceito da espectroscopia de RMN é simples de ser entendido: aplicar um campo magnético para causar o desdobramento desses níveis e promover a transição entre eles através da radiação eletromagnética na região da radiofrequência (DONALD A. MCQUARRIE; JOHN D. SIMON, 1997; P. W. ATKINS, 2014; PAVIA et al., 2009).

O núcleo de hidrogênio (um dos mais comumente estudados por RMN) apresenta o valor de  $I$  igual à  $1/2$ , o que implica que os possíveis valores de  $m_I$  são  $+1/2$  e  $-1/2$ . Na aplicação de um campo magnético externo, os níveis  $m_I$  se desdobram, quebrando sua degenerescência e permitindo que a transição entre esses níveis seja possível, conforme demonstra o esquema da **Figura 15**.

**Figura 15:** Esquema representando o desdobramento dos níveis  $m_I$  de um átomo de hidrogênio quando sujeito à um campo magnético externo.



**Fonte:** o próprio autor.

A **Equação X** também demonstra que a energia dessa transição depende do núcleo a ser analisado, visto que núcleos diferentes possuem diferentes valores de  $\gamma_N$  e podem possuir outros valores de spin nuclear, alterando os valores de  $m_I$ . Devido a esse fato, as análises de RMN de  $^1\text{H}$  utilizam solventes deuterados, visto que o núcleo de D apresenta  $I = 1$  e, portanto, não apresenta sinais em um instrumento calibrado para núcleos de  $^1\text{H}$ . Além disso, núcleos com  $I = 0$  não podem ser estudados por espectroscopia de RMN, já que apresentam um nível de energia relacionado ao spin nuclear com  $m_I = 0$ . Outros núcleos também comumente estudados por essa técnica são  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{31}\text{P}$ , porém a técnica pode ser empregada para qualquer núcleo com spin nuclear diferente de 0, sendo usada até para caracterização de metais de transição (BREVARD; GRANGER, 1983; MASON, 1989; PAVIA et al., 2009).

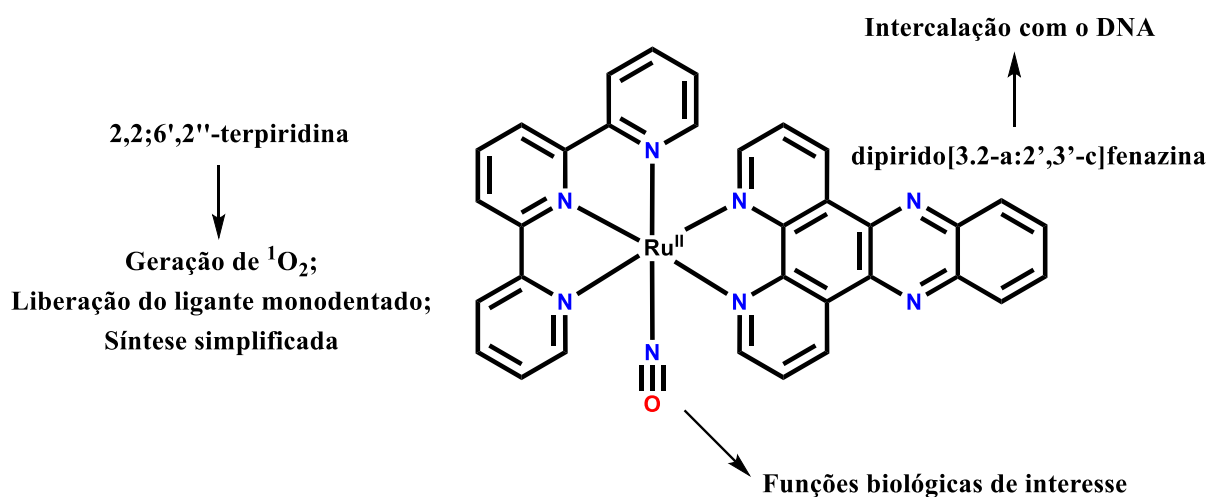
Em um espectro de RMN, as informações mais importantes a serem extraídas dos sinais são seu deslocamento químico (descrito em ppm), seu formato e sua área (expressa em termos de integral). Pensando no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , o deslocamento químico indica a densidade eletrônica ao redor daquele núcleo, o formato indica o número de hidrogênios que estão acoplando com a posição referente ao sinal e a integral relativa é proporcional ao número de hidrogênios representados por esse sinal (PAVIA et al., 2009). Esse tipo mais comum de espectro, como apresenta apenas o deslocamento químico como a variável de interesse, é normalmente chamado de espectro unidimensional de RMN. Existem também experimentos que retornam espectros bidimensionais de RMN que são utilizados para uma elucidação mais completa do sistema, como por exemplo o COSY (Correlation Spectroscopy) ou o NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (HUGGINS; BILLIMORIA, 2007; PITOUX et al., 2015). Todas essas informações possíveis de serem obtidas tornam a espectroscopia de RMN uma das ferramentas mais importantes na caracterização de compostos químicos.

### **1.7 A criação de um composto sinérgico**

Tendo em vista a enorme gama de aplicações de compostos de rutênio citadas até agora nesse texto, surge a ideia desse projeto: a criação de um composto que apresente uma combinação de todas as aplicações apresentadas até aqui. Um composto que, em teoria, é capaz de gerar  $^1\text{O}_2$  ao mesmo tempo que intercala com o DNA e libera óxido nítrico. Pensando nisso, foi sugerido o design de uma estrutura inédita na literatura, envolvendo um ligante polipiridínico (2,2';6',2''-terpiridina), o ligante dppz e o NO em sua estrutura. A estrutura do

composto está representada na **Figura 16**, juntamente com uma breve justificativa para a escolha de cada ligante.

**Figura 16:** Estrutura do composto inédito  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{NO}]^{3+}$  proposto neste trabalho.



Fonte: o próprio autor.

Um destaque a mais para o uso do ligante terpiridina é sua tripla denticidade. A combinação de um ligante tridentado com o ligante dppz, bidentado, resulta em apenas um sítio de coordenação livre para o complexo, justamente o sítio referente à coordenação do NO. Sendo assim, espera-se que a síntese do composto seja facilitada ao se coordenar os ligantes em ordem decrescente de denticidade. Como já discutido anteriormente neste capítulo, a presença da “cauda” na estrutura da dppz, ou seja, os dois anéis presentes na porção fenazínica da molécula, garantem com que esse ligante seja classificado como intercalador, de maneira que ligantes como a 2,2'-bipiridna (bpy), 1,10-fenantrolina (phen) ou a própria tpy não apresentam essa capacidade devido à ausência desse fator em sua estrutura.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho visa a síntese, caracterização e verificação de algumas propriedades biológicas de um complexo inédito na literatura de fórmula molecular  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  (tpy = 2,2';6',2''-terpiridina; dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina). Para efeitos de comparação, outro objetivo desse trabalho é realizar os mesmos estudos com o precursor  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{Cl})](\text{PF}_6)$  para verificar a influência do ligante nas propriedades eletrônicas e biológicas desses complexos.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o ligante dppz a ser coordenado em todos os complexos estudados;
- Realizar a síntese e caracterização dos complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  e  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{Cl})](\text{PF}_6)$  a partir das técnicas de espectroscopia eletrônica, vibracional e de  $^1\text{H}$ -RMN.
- Verificar o rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  dos complexos através da espectroscopia eletrônica de absorção;
- Verificar a liberação fotoinduzida de NO do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  através da técnica de cronoamperometria;
- Estudar a interação de ambos os complexos com HSA através das técnicas de espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular e docking molecular;
- Estudar a interação de ambos os complexos com DNA utilizando a técnica de deslocamento de sonda fluorescente (EtBr), dicroísmo circular e determinação da temperatura de desnaturação do DNA;
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos estudados através de testes em células pulmonares tumorais e não-tumorais.

## ***CAPÍTULO 2: SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES REALIZADAS***



# 1. Materiais e Metodologia

## 1.1 Procedência dos solventes e reagentes

Os reagentes listados abaixo foram obtidos comercialmente e não passaram por purificação prévia.

**Tabela 2:** Procedência dos solventes e reagentes utilizados ao longo deste trabalho.

<b>Solventes</b>	<b>Procedência</b>
Acetona	Êxodo
Acetonitrila	Êxodo
Acetonitrila-d <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	Êxodo
Diclorometano	Dinâmica
Dimetilformamida	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
Etanol	Dinâmica
Éter etílico	Sigma-Aldrich
Etilenoglicol	Synth
i-Propanol	JT Baker
Metanol	Êxodo
n-Propanol	Êxodo
Tetrahidrofurano	Honeywell
Trietilamina	Sigma-Aldrich
<b>Reagentes</b>	<b>Procedência</b>
1,2-Diaminobenzeno	Sigma-Aldrich
1-10-Fenantrolina-5,6-diona	Sigma-Aldrich
2,2':6',2''- terpiridina	Sigma-Aldrich

Ácido clorídrico	Synth
Alumina neutra	Sigma-Aldrich
Albumina do Soro Humano	Sigma-Aldrich
Brometo de Potássio	Sigma-Aldrich
DNA de esperma de peixe	Sigma-Aldrich
Hexafluorofosfato de amônio	Sigma-Aldrich
Nitrato de prata	Synth
Nitrito de sódio	Sigma-Aldrich
$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Tetrafluoroborato de nitrosilo	Sigma-Aldrich
Tris(hidroximetil)aminometano	Sigma-Aldrich

---

## 1.2 Sínteses realizadas

### 1.2.1 Síntese do ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

O método utilizado foi adaptado de Dupureur e Barton (DUPUREUR; BARTON, 1997). Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionado 0,8512g (4,05 mmol) de 1,10-fenantrolina-5,6-diona solubilizada em 50 mL de etanol à quente. À essa solução, adicionou-se 0,5015g (4,64 mmol) de 1,2-diaminobenzene previamente solubilizado em 10 mL de etanol. Manteve-se a solução sob agitação em refluxo por 4h e a solução foi armazenada na geladeira por 24h. Após retirar a solução da geladeira, ela foi filtrada com funil de placa porosa lavando-se o sólido obtido com porções de água deionizada, etanol gelado e 5 mL de éter etílico para facilitar a secagem. O sólido foi levado ao dessecador e secado até massa constante. A massa final foi de 0,5632g (2,00 mmol,  $\eta = 49\%$ ).

### 1.2.2 Síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$

A síntese foi adaptada de Sullivan et al (SULLIVAN; CALVERT; MEYER, 1980). Em um balão de fundo redondo de 250 mL de 3 bocas, foi adicionado 1,0385g (3,97 mmol) de  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e 160 mL de metanol. A solução possuía cor castanho escuro. Aqueceu-se à refluxo por 2h e a solução adquiriu uma cor alaranjada. Em seguida, adicionou-se 0,9185g (3,94

mmol) do ligante 2,2':6',2''-terpiridina (tpy) e a cor da solução voltou ao castanho escuro. Após mais 3h de refluxo, o aquecimento foi cessado e a solução resfriada à temperatura ambiente, permanecendo com a mesma cor. Após resfriada, a solução foi armazenada na geladeira por 3 dias. Filtrou-se a solução em funil de placa porosa. O sólido marrom fino foi lavado com etanol e em seguida com éter dietílico, e por fim, levado a um dessecador contendo sílica gel como agente secante, obtendo-se uma massa de 1,1636g (2,64 mmol,  $\eta = 67\%$ ).

### 1.2.3 Síntese do precursor [Ru(tpy)(dppz)Cl]PF<sub>6</sub> (Ru-Cl)

Para o precursor contendo o ligante dppz, adaptou-se o método de Gupta et al (GUPTA et al., 1992). Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionado 0,7562g (1,72 mmol) de [Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>] e 0,4253g (1,51 mmol) de dppz dissolvidos em 65 mL de EtOH com 3,5 mL de Et<sub>3</sub>N. Manteve-se a solução em refluxo por aproximadamente 4h. Em seguida, adicionou-se NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> para precipitação do complexo e levou-se à geladeira por 3 dias. Após a retirada da geladeira, a solução foi filtrada com funil de placa porosa lavando o sólido com porções de água deionizada gelada. Levou-se então o sólido ao dessecador para secar até massa constante. Em uma tentativa de purificação por recristalização, foi utilizado o solvente hexano, visto que ele solubiliza o composto à altas temperaturas com auxílio do sonicador. Apesar do procedimento ter retirado um pouco do ligante, a purificação não foi completa, sendo necessária então a utilização da coluna cromatográfica. Após tentativas com diversas fases móveis, foi encontrada a ideal. Inicia-se empacotando a coluna com hexano e dissolvendo o sólido em uma solução 9:1 DCM/Hex, sendo essa a fase móvel inicial para retirada do dppz, seguida de ACN para retirada do complexo. A massa final obtida foi de 0,6283g (0,79 mmol,  $\eta = 52\%$ ).

### 1.2.4 Síntese do complexo [Ru(tpy)(dppz)(H<sub>2</sub>O)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Ru-H<sub>2</sub>O)

Em um balão âmbar de 3 bocas de 100 mL, foi adicionado 0,3041 g (0,38 mmol) do complexo Ru-Cl dissolvidos em 30 mL de uma solução 1:1 de acetona/água. A essa solução, adicionou-se 300 mg de AgNO<sub>3</sub> (1,77 mmol, excesso) e, após a adição, a nova solução foi mantida sob agitação por 3h. A cor da solução passou de um vinho escuro para um vermelho tijolo. Essa então foi filtrada em celite em um funil de placa porosa, recolhendo-se o filtrado. A esse filtrado, foi adicionado NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> em excesso para precipitação do complexo [Ru(tpy)(dppz)H<sub>2</sub>O](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> e levado à geladeira por 24h. Após esse tempo, foi recolhido um sólido vermelho tijolo, que foi lavado com porções de água gelada e éter etílico. O sobrenadante teve seu volume reduzido por rotoevaporação e adicionou-se novamente NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> dessa vez

armazenando na geladeira por 3 dias. Após esse tempo, mais sólido foi recolhido, sendo lavado da mesma maneira. As duas porções do sólido foram reagrupadas e purificadas através de uma coluna cromatográfica utilizando acetonitrila como fase móvel e alumina como fase estacionária. A massa obtida do produto foi de 0,2201 g (0,24 mmol,  $\eta = 63\%$ ).

#### 1.2.4 Síntese do complexo inédito [Ru(tpy)(dppz)NO](BF<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (Ru-NO)

Visto que o composto a ser sintetizado é inédito, o método utilizado foi uma adaptação da literatura (DIAMANTIS; DUBRAWSKI, 1981). Em um balão âmbar de 3 bocas, foi adicionado 0,0982 g (0,12 mmol) do complexo Ru-Cl dissolvidos em 10 mL de ACN juntamente com 200 mg (1,71 mmol, excesso) de NOBF<sub>4</sub>. Após 10 minutos de agitação, a solução foi gotejada em éter etílico para uma precipitação por mudança de polaridade do meio. O sólido gerado foi filtrado, lavado com pequenas porções de éter etílico e levado ao dessecador para secar até massa constante. A massa obtida foi de 0,0810 g (0,09 mmol,  $\eta = 75\%$ ).

#### 1.2.5 Síntese do complexo [Ru(tpy)(dppz)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> por uma rota alternativa

Como uma segunda tentativa de síntese, realizou-se a rota clássica para síntese de nitrosilos de rutênio adaptada de Godwin et al (GODWIN; MEYER, 1971a). A um balão de 100 mL, foi-se adicionado 0,182g de Ru-Cl (0,23 mmol) em 30 mL de uma mistura 1:1 de acetona e água. Em seguida, adicionou-se 0,0502g de NaNO<sub>2</sub> (0,728 mmol, excesso) e deixou-se em agitação sob leve aquecimento por 1h. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de HPF<sub>6</sub> concentrado. O espectro eletrônico foi então registrado e chegou-se à conclusão de que o nitrosilo não havia sido formado, pois o espectro formado em nada se parecia com o espectro obtido na primeira síntese.

#### 1.2.6 Síntese do complexo alternativo [Ru(tpy)(dppz)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>) (Ru-NO<sub>2</sub>)

Observando os resultados da tentativa descrita no item anterior (1.2.5), foi realizada a síntese do composto [Ru(tpy)(dppz)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>) utilizando a mesma rota sintética, porém sem a adição do HPF<sub>6</sub>. As massas adicionadas foram 0,205g (0,26 mmol) de Ru-Cl e 0,0513g de NaNO<sub>2</sub> (0,743 mmol, excesso). A mistura foi deixada em refluxo por 2h. Após o desligamento do refluxo, foi adicionado excesso de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> à solução para precipitação do complexo e a solução foi armazenada na geladeira por 24h. Após esse tempo, o sólido vermelho obtido foi filtrado em um funil de placa porosa. A purificação foi realizada através de uma coluna cromatográfica, utilizando alumina como fase estacionária e inicialmente ACN como fase móvel até a eluição completa do complexo Ru-Cl (fase roxa na coluna). Em seguida, foi

utilizada uma fase móvel 80% ACN/20% MeOH para eluição do composto Ru-NO<sub>2</sub>. O sólido final obtido foi seco utilizando gás de N<sub>2</sub>. A massa final obtida foi de 0,1050g (0,13 mmol,  $\eta$  = 51%).

### 1.3 Equipamentos utilizados para caracterizações

#### 1.3.1 Espectroscopia de absorção eletrônica

Os espectros de absorção eletrônica foram registrados em um espectrofotômetro Agilent, modelo Cary 60, com faixa de aquisição máxima de 190 a 1100 nm e resolução de 0,5 nm. Foi empregada uma cubeta de 1 cm de caminho óptico para as análises.

#### 1.3.2 Espectroscopia de emissão eletrônica

Os espectros de emissão foram registrados no laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Turro, no Departamento de Química e Bioquímica da *The Ohio State University* (OSU) em um espectrofotômetro SPEX Fluoromax-2 utilizando uma lâmpada de xenônio de 150W como fonte luminosa.

#### 1.3.3 Espectroscopia de absorção resolvida no tempo

Os espectros de absorção resolvida no tempo na escala de nanossegundos foram registrados no equipamento Three Quanta-Ray acoplado a um sistema de laser pulsado Nd:YAG (fwhm ~8 ns), no laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Turro (OSU). Os espectros de absorção resolvida no tempo na escala de femtossegundos foram realizados no equipamento disponível no Departamento de Química da Universidade de Ohio (Center for Chemical and Biophysical Dynamics - The Ohio State University). O oscilador Ti: Safira (Vitara-S, Coherent) gerou pulsos de 20 fs a 80 MHz para um amplificador regenerativo Ti:Safira de alta energia (Astrella, Coherent) para produzir pulsos de 7 mJ, 35 fs a 1 kHz. 3 mJ destes pulsos foram inseridos em um amplificador paramétrico óptico (OPerA Solo, Coherent) para gerar pulsos nos comprimentos de onda de excitação (550 e 525 nm). As amostras foram excitadas com 4,0  $\mu$ J. Uma câmera CCD (Princeton Instrument, 1340  $\times$  100 pixels) e o programa LabView (PIXIS, Princeton Instruments) foram construídos para coletar os dados espectrais. A resposta do instrumento foi determinada como 85 fs através do efeito de Kerr em ciclohexano. Uma célula de fluxo Harrick Scientific de caminho óptico de 1 mm foi equipada com janelas de CaF<sub>2</sub> de 1 mm e utilizou-se um volume de amostra de ~ 3 mL, de maneira que a amostra se manteve em constante movimento através de um sistema de tubos e uma bomba. O ângulo de polarização

entre a bomba e os pulsos foi ajustado para evitar os efeitos da difusão rotacional. Todos os espectros registrados foram corrigidos no contínuo de luz branca. As curvas cinéticas foram analisadas por meio dos decaimentos exponenciais dos espectros.

### 1.3.4 Espectroscopia vibracional

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige 21, com janela de aquisição de 200 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 30 varreduras. Os espectros foram obtidos em pastilhas de brometo de potássio (grau espectroscópico).

### 1.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

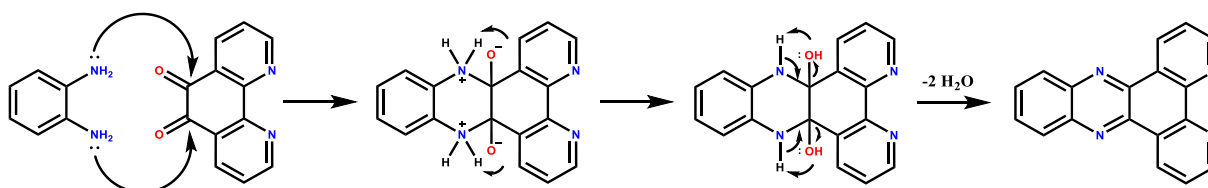
Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foram registrados no Departamento de Química da Universidade de Ohio (*The Ohio State University, CBEC Analytical Spectroscopy Laboratory*), em um espectrofotômetro Bruker Advance 600 MHz, em soluções de acetonitrila deuterada, onde a calibração é realizada a partir do sinal residual do solvente.

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1 A dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina

A síntese do ligante dppz é realizada em apenas uma etapa e consiste basicamente em uma condensação entre o 1,2-diaminobenzeno e a 1,10-fenantrolina-5,6-diona, envolvendo o ataque nucleofílico da amina primária da primeira estrutura no carbono carbonílico da segunda, conforme evidencia o mecanismo abaixo.

**Figura 17:** Esquema ilustrando o mecanismo da reação de condensação formando como produto o ligante dppz.



**Fonte:** o próprio autor.

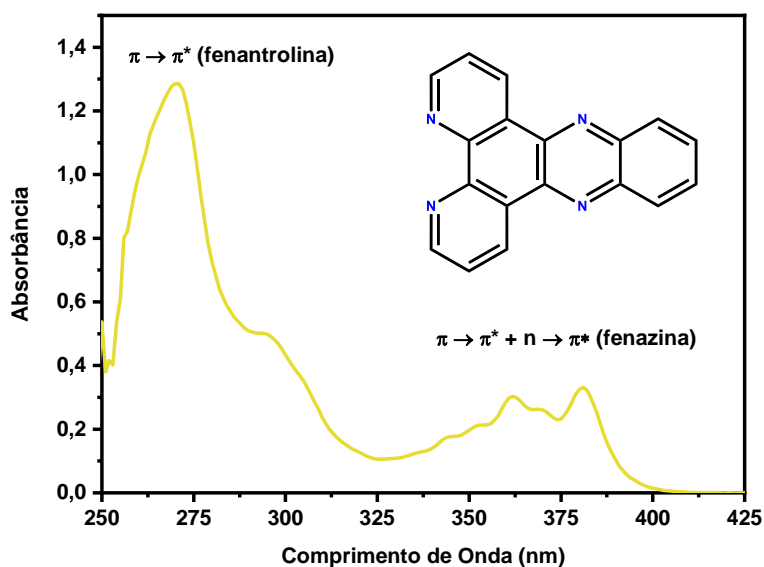
Esse tipo de reação é favorecido por solventes polares próticos<sup>19</sup>, justificando o uso do etanol na síntese. Nessa reação em específico, o nitrogênio da amina, que apresenta um par de elétrons, ataca o carbono deficiente em elétrons da carbonila (devido à sua ligação dupla com

<sup>19</sup> Solvente que apresenta um  $\text{H}^+$  dissociável.

o oxigênio), formando um intermediário denominado carbinolamina (terceira estrutura presente na **Figura 17**). Essa estrutura então passa por um rearranjo e perde uma molécula de água, que é um bom grupo abandonador<sup>20</sup>, formando as ligações duplas presentes no produto (JONATHAN CLAYDEN; NICK GREEVES; STUART WARREN, 2012). Além disso, destaca-se que a reação também é termodinamicamente favorável, especialmente pela liberação de duas moléculas de água, aumentando a entropia do sistema e pela formação de um sistema com uma maior  $\pi$ -conjugação, apresentando assim uma maior estabilidade.

O espectro eletrônico da dppz está registrado na **Figura 18**. Nesse espectro, são observadas duas principais transições, uma de maior e uma de menor energia. Estudos revelam que essas transições ocorrem de maneira separada com relação às duas porções distintas da molécula: a parte fenantrolínica e a parte fenazínica. A transição de maior energia ( $\lambda_{\text{max}} = 272$  nm) é atribuída a uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  da porção fenantrolínica, enquanto as bandas presentes em comprimentos de onda de menor energia, conforme observado no espectro, apresentam uma sobreposição entre bandas largas com uma estrutura vibracional parcialmente resolvida. Por isso mesmo, provavelmente correspondem à uma combinação de transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  da porção fenazínica com componentes vibracionais (DA SILVA MIRANDA et al., 2008).

**Figura 18:** Espectro eletrônico qualitativo da dppz em DMSO.

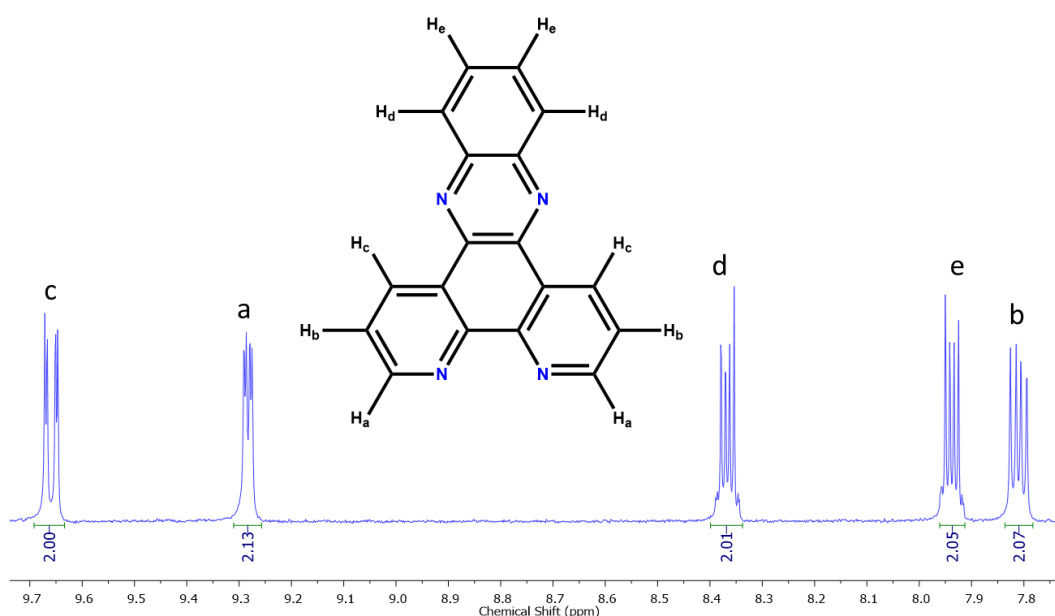


**Fonte:** o próprio autor.

<sup>20</sup> Átomo ou grupo de átomos que é eliminado ou substituído em uma reação. Para ser um bom grupo abandonador, a estrutura em questão deve ser estável quando liberada para o meio.

Além da espectroscopia eletrônica, outra técnica útil para elucidação da estrutura do ligante é a espectroscopia de RMN. Conhecer os sinais de  $^1\text{H}$ -RMN da dppz livre é de grande ajuda na elucidação dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN dos compostos sintetizados. Sendo assim, o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN e COSY da dppz foi registrado.

**Figura 19:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da dppz em clorofórmio deuterado (10 mM, 300 MHz, 298K) com as atribuições dos sinais obtidos.



**Fonte:** o próprio autor.

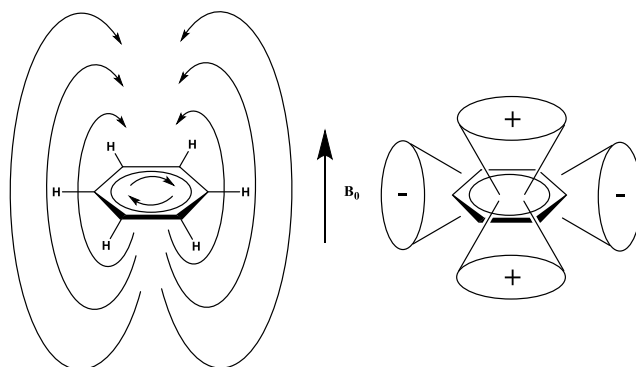
Inicialmente, destaca-se que a molécula da dppz apresenta um plano de reflexão que divide a molécula em duas porções idênticas. Sendo assim, os hidrogênios simétricos irão apresentar um mesmo sinal no RMN, pois são quimicamente equivalentes. Visto que a molécula de dppz apresenta 10 hidrogênios, espera-se, portanto, 5 sinais no RMN, conforme observado na **Figura 19** (AHMAD, 2016; FRODL; HEREBIAN; SHELDRIK, 2002).

A elucidação desse espectro é relativamente simples quando se leva em conta os dois principais fenômenos que alteram um sinal de RMN. O primeiro fenômeno é denominado de efeito de corrente de anel. Como o próprio nome diz, é um efeito eletrônico característico de compostos que possuem anéis aromáticos em sua estrutura. Devido à carga dos elétrons, sua rotação no centro do anel gera um campo magnético em suas proximidades, conforme demonstra a **Figura 20**. Os hidrogênios presentes no plano do anel interagem com um campo magnético mais intenso (representado pelo sinal - na figura), causando um efeito de



desblindagem, explicando o motivo dos hidrogênios da dppz terem sinais em campos mais baixos (JONATHAN CLAYDEN; NICK GREEVES; STUART WARREN, 2012; PAVIA et al., 2009).

**Figura 20:** Esquema demonstrando o efeito de corrente de anel em um anel benzênico.

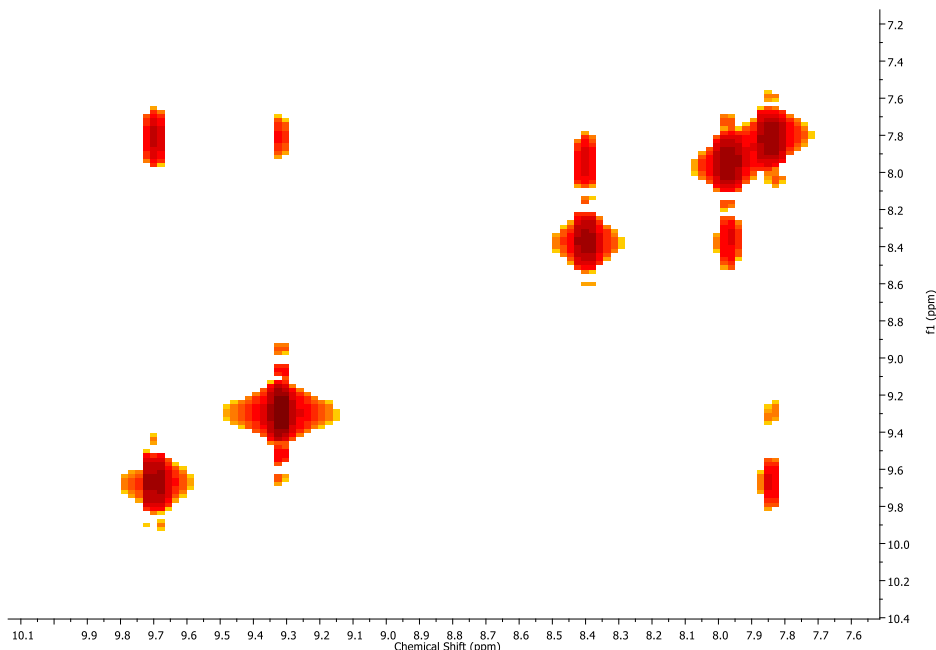


**Fonte:** o próprio autor.

O segundo efeito importante de ser destacado é o efeito indutivo de átomos eletronegativos. Quando um hidrogênio está próximo de um átomo eletronegativo, o efeito retirador de elétrons desses átomos diminui a densidade eletrônica presente no hidrogênio, diminuindo também o efeito de blindagem que esses elétrons causam e, portanto, fazendo com que o sinal desse hidrogênio no RMN apareça em um campo mais baixo (JONATHAN CLAYDEN; NICK GREEVES; STUART WARREN, 2012; PAVIA et al., 2009). No caso da molécula de dppz, os átomos de nitrogênio na molécula exercem esse efeito sobre os hidrogênios espacialmente próximos a eles, de maneira que os hidrogênios **a** e **c** são os mais desblindados da molécula e, como o hidrogênio **c** se encontra espacialmente mais próximo de um átomo de nitrogênio, este terá o sinal em campo mais baixo, seguido pelo hidrogênio **a**. Com essas informações e com o espectro COSY dessa molécula, sua atribuição total é simples de ser realizada.

As informações fornecidas pelo espectro COSY consistem basicamente na vizinhança dos hidrogênios de cada sinal. A diagonal do espectro consiste em todos os sinais visualizados no espectro unidimensional do composto, e as “manchas” presentes fora da diagonal revelam interações de curta distância entre os hidrogênios. Sendo assim, é possível identificar quais hidrogênios são vizinhos entre si através do espectro COSY, ajudando na elucidação do composto.

**Figura 21:** Espectro COSY da dppz em clorofórmio deuterado (10 mM, 300 MHz, 298K).



**Fonte:** o próprio autor.

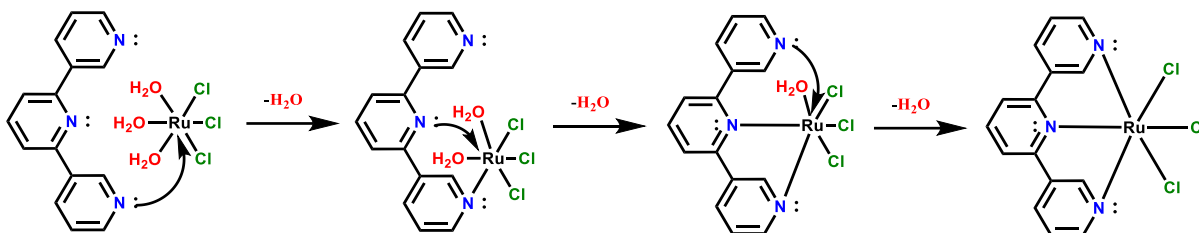
Observando o espectro da **Figura 21** e utilizando as informações já obtidas, o hidrogênio **b** é facilmente atribuído como aquele que apresenta o sinal em campo mais alto, dadas as posições dos sinais no COSY. Sendo assim, restam apenas 2 sinais referentes aos hidrogênios **d** e **e**. Ao analisar o COSY, é observado que ambos os sinais interagem apenas entre si, comprovando que realmente trata-se desses dois hidrogênios. Por fim, a atribuição é realizada como o hidrogênio **d** apresentando um campo mais baixo, por estar mais próximo de um átomo de nitrogênio da molécula. Assim, todos os sinais são atribuídos conforme mostra a **Figura 19**.

Com a síntese desse ligante bem-sucedida, a síntese dos compostos de coordenação a serem estudados pôde ser realizada.

## 2.2 Rota sintética elaborada para os complexos estudados nesse trabalho

Na elaboração da rota sintética dos complexos, nota-se o motivo da escolha do ligante tpy como representante dos ligantes polipiridínicos comuns nessas estruturas. O fato desse ligante apresentar uma tripla denticidade, isto é, se coordena ao centro metálico através de 3 sítios de coordenação, torna sua coordenação cinética e termodinamicamente favorecida. Analisando a estrutura desse ligante, é possível racionalizar essas observações.

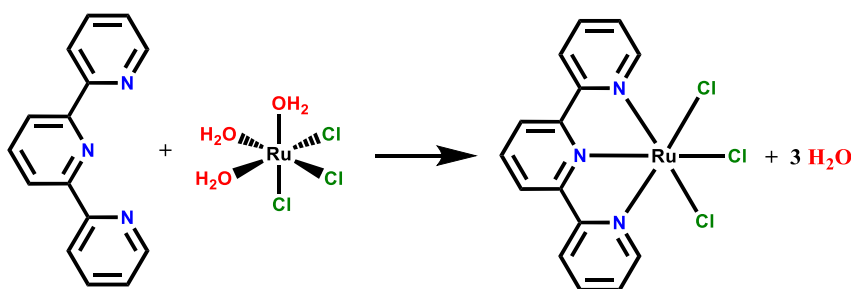
**Figura 22:** Esquema representando o mecanismo da coordenação da 2,2';6',2"-terpiridina no complexo.



Fonte: o próprio autor.

Como observado na **Figura 22**, a coordenação da terpiridina pelo primeiro sítio de coordenação faz com que os outros nitrogênios coordenantes fiquem próximos ao centro metálico, o que favorece sua coordenação ao mesmo e, por consequência, favorece cineticamente a coordenação da terpiridina.

**Figura 23:** Reação de formação do complexo [Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>].



Fonte: o próprio autor.

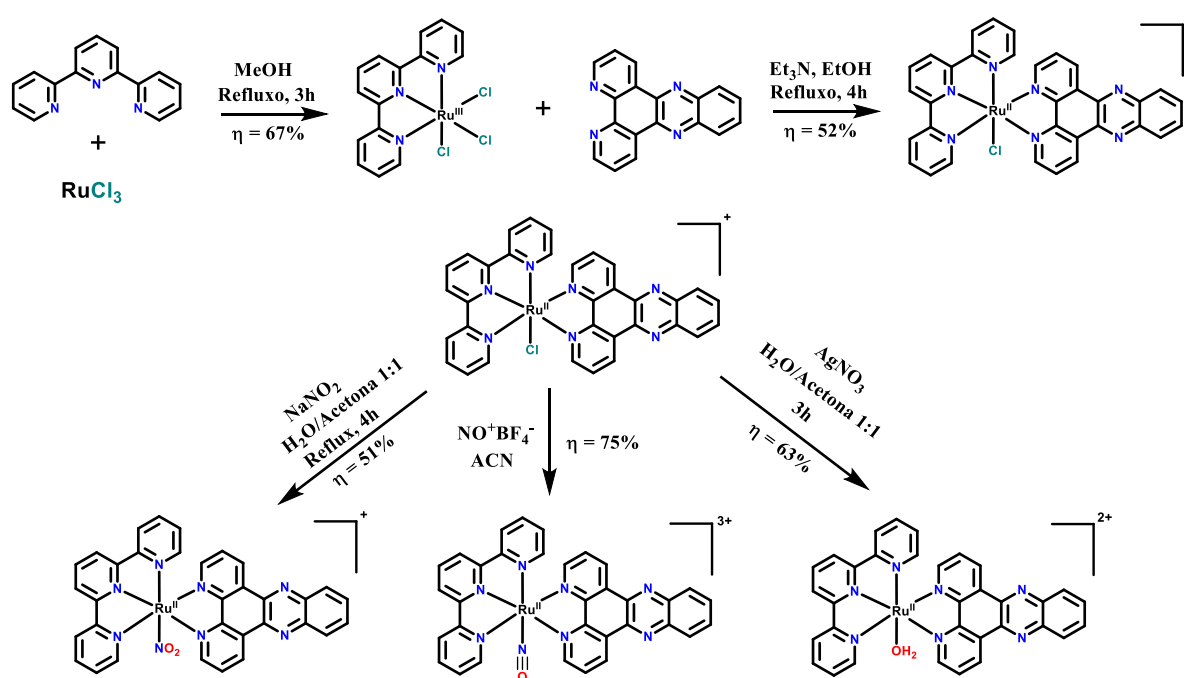
Já na representação descrita na **Figura 23**, é simples de perceber que a variação da entropia é positiva ( $\Delta S > 0$ ), visto que a liberação de três moléculas de água do complexo em comparação com a entrada de apenas uma molécula de terpiridina aumenta o número de microestados acessíveis desse sistema como um todo, aumentando assim a entropia desse sistema. Pela equação da energia livre de Gibbs (**Equação XI**), um aumento na entropia indica que uma reação se torna mais espontânea, já que numericamente isso resulta em um abaixamento da variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação XI}$$

Esses dois efeitos são recorrentes para ligantes polidentados e apresentam o nome de “efeito quelato”, que resumidamente indicam que esses ligantes polidentados são coordenados à centros metálicos com uma maior facilidade se comparados aos ligantes monodentados em geral (GARY L. MIESSLER; PAUL J. FISCHER; DONALD A. TARR, 2014; TOMA, 2016).

Apesar de apresentar essa enorme vantagem sintética, a coordenação da terpiridina em comparação com a bipyridina apresenta uma grande desvantagem do ponto de vista de sua aplicabilidade: a atenuação de suas propriedades fotoquímicas. É conhecido que os estados excitados do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$  apresentam tempos de vida bem menores que os do complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , devido à uma desativação não-radiativa pelo estado  $^3\text{MC}$ , e, portanto, não são tão promissores como fotossensibilizadores. No entanto, Brown et al. (BROWN et al., 2012) demonstraram que a utilização de ligantes tridentados com estruturas próximas à da terpiridina podem gerar estados excitados com tempos de vida maiores. Pensando nisso, um motivo a mais para estudar o ligante tpy nesse trabalho é verificar se a presença do ligante dppz e dos ligantes monodentados na estrutura pode também resultar no retorno dessas possíveis aplicações dos complexos ao mesmo tempo que sua síntese é facilitada pela presença do ligante tridentado.

**Figura 24:** Esquema representando todas as sínteses realizadas neste trabalho. Todos os cátions foram precipitados utilizando  $\text{PF}_6^-$  como contra-íon.



Fonte: o próprio autor.

A **Figura 24** mostra a rota sintética utilizada para todos os complexos estudados nesse trabalho. Todas as sínteses apresentaram um rendimento próximo ao reportado na literatura utilizada. A escolha de cada solvente foi realizada com base na solubilidade de ambos os

reagentes e visando a redução da solubilidade do produto, para facilitar a precipitação do mesmo e a  $\text{Et}_3\text{N}$  é utilizada para reduzir o centro metálico  $\text{Ru}^{\text{III}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{II}}$ .

Destaca-se aqui que a primeira síntese realizada, para a formação do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$  apresentou como subproduto o composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ , que foi precipitado de maneira separada utilizando o sal  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  e armazenado para quaisquer futuras necessidades. O surgimento dessa espécie foi detectado utilizando a espectroscopia eletrônica, que será discutida no próximo tópico.

A racionalização da rota sintética foi feita baseando-se na denticidade dos ligantes utilizados. Como explicado anteriormente, a terpiridina se liga facilmente ao centro metálico e, portanto, é o primeiro ligante a ser coordenado. O próximo ligante é o dppz, que apresenta os mesmos efeitos cinéticos e termodinâmicos devido à sua denticidade, porém menos acentuados por apresentar menos átomos coordenantes em sua estrutura. Sendo assim, é improvável que a coordenação do dppz ocorra mediante a saída do ligante terpiridina, e visto que ainda existem 3 sítios de coordenação livres, o mais provável que ocorra é que o dppz se coordene em 2 desses 3 sítios, conforme o esperado, deixando assim um único sítio de coordenação livre para a mudança do ligante monodentado presente nele a partir de cada reagente específico.

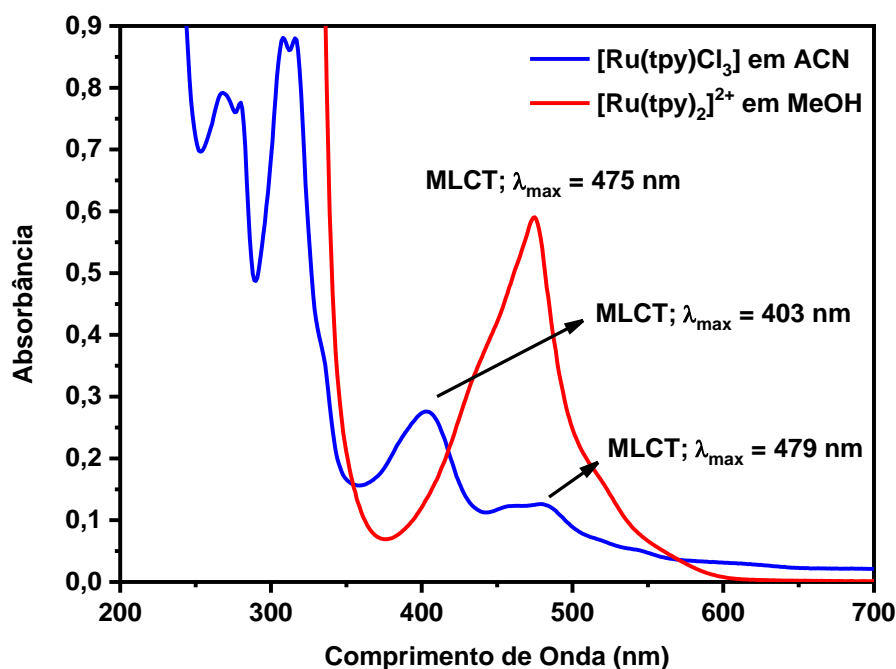
### 2.3 Espectroscopia de absorção eletrônica

Levando em conta que essa é a técnica mais utilizada no laboratório para o acompanhamento das sínteses, os espectros de absorção foram registrados para todos os produtos e subprodutos obtidos em todas as etapas sintéticas realizadas, com o objetivo de elucidar quais espécies estavam sendo formadas ou consumidas e em quanto tempo a síntese está completa.

A primeira síntese realizada foi para o precursor  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ , envolvendo basicamente a mistura entre o ligante tpy com o sal  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , promovendo assim sua coordenação. Sabendo que esse ligante ocupa 3 sítios de coordenação do complexo, e sabendo também que um complexo de coordenação octaédrico apresenta 6 sítios de coordenação, é de se esperar que essa síntese apresente um subproduto consequente da coordenação de duas tpy. No entanto, a separação desse subproduto e do produto desejado é realizada de maneira muito simples, visto que a espécie  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$  não apresenta carga e é insolúvel em metanol, o solvente utilizado na síntese, e sua precipitação ocorrerá sem a necessidade de adição de um sal. Dessa maneira, o precipitado encontrado após a síntese conterá apenas o composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ , enquanto o

subproduto  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$  se encontrará presente em solução. Para recuperar também esse subproduto, a filtração da solução foi realizada, separando o produto principal, e, em seguida, foi adicionado ao filtrado um excesso de  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  para precipitação do composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ . Para efeitos de comparação, o espectro eletrônico de ambos os compostos foi registrado.

**Figura 25:** Espectros de absorção eletrônica qualitativos dos compostos  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$  e  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$  gerados na primeira síntese.

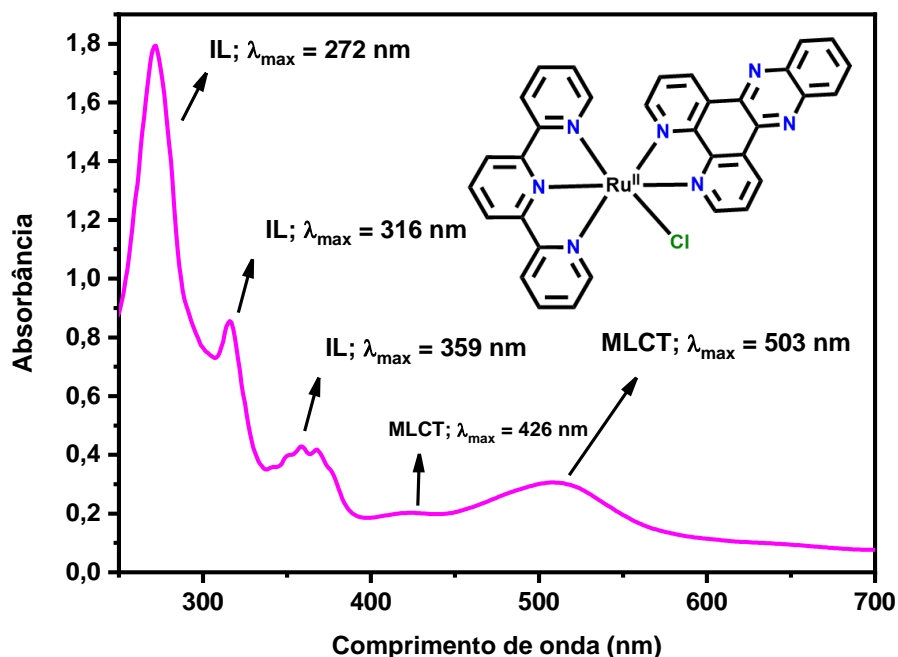


Fonte: o próprio autor.

Observando os espectros de ambas as espécies, é notável como a coordenação de uma ou duas terpiridinas altera sua estrutura eletrônica. Visto que esses complexos são apenas precursores daqueles estudados nesse trabalho, a atribuição de cada banda presente no espectro não será discutida em exaustão, porém com base na literatura e na diferente solubilidade, é fácil distinguir essas duas espécies e isolar apenas o composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ , necessário para dar seguimento às sínteses (ZEGKINOGLU et al., 2012).

O próximo passo foi a coordenação do ligante dppz na estrutura, resultando no complexo Ru-Cl, o precursor de todos os outros estudos nesse trabalho. Nessa síntese, espera-se o surgimento de novas bandas referentes às transições eletrônicas do próprio ligante, que podem ser observadas na **Figura 18**. Após a síntese ser realizada, o espectro obtido para o produto está apresentado na **Figura 26**.

**Figura 26:** Espectro de absorção eletrônica qualitativo do complexo Ru-Cl em ACN.



Fonte: o próprio autor.

É importante entender a natureza de cada banda observada nesse espectro, visto que a alteração apenas do ligante monodentado não irá alterar drasticamente a estrutura eletrônica e o mesmo perfil deve ser observado para todos os complexos estudados. Utilizando os conceitos introduzidos nos itens 1.2 e 1.6.1 do **Capítulo 1** deste trabalho, é possível realizar a atribuição de cada banda observada no espectro da espécie Ru-Cl. Inicialmente, como esperado, ocorreu o surgimento de uma banda ( $\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ ) associada a transição do próprio ligante dppz, discutida anteriormente. Essa banda é atribuída como intraligante, analogamente à banda de alta energia com  $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$ , que também está na região desse tipo de transição e apresenta uma intensidade alta. Foi observado também o surgimento de uma nova banda ( $\lambda_{\text{máx}} = 316 \text{ nm}$ ), também na região do espectro na qual cromóforos orgânicos absorvem, sendo atribuída, portanto, como uma transição IL  $\pi \rightarrow \pi^*$  da tpy (LÓPEZ et al., 2006). Além dessas, o composto também apresenta outras duas bandas que apresentam uma menor intensidade na região do visível, indicando que muito provavelmente são provenientes de transições de transferência de carga. O centro metálico na estrutura Ru-Cl apresenta NOX 2+, caracterizando-o como um centro metálico de alta densidade eletrônica (comparando-se com os estados de oxidação possíveis para esse metal). Os ligantes polipiridínicos são classificados como  $\pi$ -aceptores, logo, são aceptores de densidade eletrônica do centro metálico. Unindo esses dois fatos, conclui-se

que para esse complexo, a transição de transferência de carga é do tipo metal-ligante (MLCT). A presença de duas bandas desse tipo ocorre devido a transições para diferentes orbitais moleculares do complexo: um com maior caráter do ligante terpiridina e um com maior caráter do ligante dppz. A partir de um estudo de modelagem molecular presente na literatura, concluiu-se que a transição de menor energia ( $\lambda_{\text{max}} = 503 \text{ nm}$ ) refere-se à excitação de um elétron a um orbital de maior caráter da tpy, enquanto a transição com  $\lambda_{\text{max}} = 426 \text{ nm}$  refere-se à uma transição eletrônica para um orbital de maior caráter da dppz (JAKUBIKOVA et al., 2009).

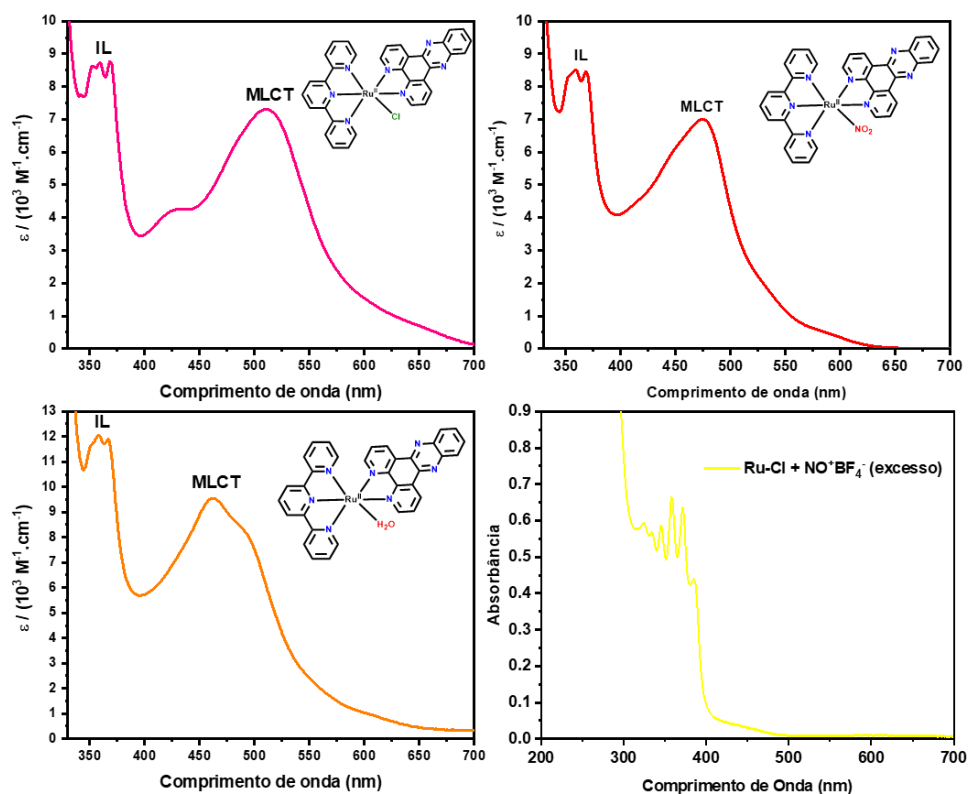
Visto que as próximas sínteses realizadas consistem na mudança do ligante monodentado do complexo, é possível realizar uma previsão de como essa mudança irá afetar a estrutura eletrônica do composto. Muito provavelmente, as bandas IL não serão afetadas, visto que são provenientes apenas dos orbitais ligantes que se mantêm coordenados. As bandas MLCT, no entanto, representam a passagem de um elétron de um orbital de caráter metálico para um caráter de ligante. Como discutido anteriormente, as duas bandas MLCT observadas correspondem a transições para os orbitais dos ligantes dppz e tpy, e, apesar da mudança do ligante monodentado afetar a energia dos orbitais do centro metálico, não afeta significativamente os orbitais dos outros ligantes, de maneira que se espera uma mudança não muito significativa nessas bandas. Dentre todos os ligantes estudados nesse trabalho, o ligante  $\text{H}_2\text{O}$  é o único que apresenta apenas o caráter  $\sigma$ -doador, o  $\text{Cl}^-$  é o único que apresenta também o caráter  $\pi$ -doador e os ligantes  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}^+$  apresentam também um caráter  $\pi$ -aceptor. Sendo assim, o esperado é que a substituição do ligante  $\text{Cl}^-$  por qualquer outro ligante monodentado fará com que o centro metálico apresente uma menor densidade eletrônica, estabilizando assim os orbitais moleculares de caráter metálico e, por consequência, aumentando a energia das transições MLCT observadas.

Nesse ponto, destaca-se um fator importante para esse trabalho como um todo: a síntese do composto Ru-NO, apesar de parecer ter sido realizada com sucesso, resulta em um sólido que a princípio é estável, porém apresenta uma alta labilidade do ligante  $\text{NO}^+$  em solução (mesmo no escuro), tornando toda sua caracterização utilizando técnicas que dependam de uma solução do composto inviável. Devido a esse fato, a caracterização desse composto não foi realizada e, em seu lugar, o mesmo trabalho foi realizado com o composto Ru- $\text{NO}_2$ , utilizando também o Ru- $\text{H}_2\text{O}$  como um terceiro composto para comparação. O motivo da mudança e algumas justificativas da impossibilidade do seguimento utilizando o composto Ru-NO estão descritas no **Capítulo 3** deste trabalho.



A **Figura 27** mostra os espectros eletrônicos de todos os produtos obtidos em ACN, assim como o espectro da solução após adição do sal de  $\text{NOBF}_4$  na tentativa de síntese do composto Ru-NO.

**Figura 27:** Espectros qualitativos de absorção eletrônica dos compostos Ru-Cl, Ru- $\text{NO}_2$ , Ru- $\text{H}_2\text{O}$  e da solução ao final da tentativa de síntese do composto Ru-NO.



**Fonte:** o próprio autor.

Além do espectro eletrônico qualitativo, é possível também calcular o valor de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para as principais transições dos compostos Ru-Cl, Ru- $\text{NO}_2$  e Ru- $\text{H}_2\text{O}$ . Esses valores calculados estão resumidos na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Valores de absorvidade molar calculada para as transições dos compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub>, em acetonitrila.

Composto	$\lambda_{\max}$ (nm), $\epsilon$ ( $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )			
	MLCT (tpy)	MLCT (dppz)	$\pi \rightarrow \pi^* + n \rightarrow \pi^*$ (dppz)	$\pi \rightarrow \pi^*$ (dppz)
<b>Ru-Cl</b>	503 (7,3)	426 (3,8)	369 (8,8)	272 (35,2)
<b>Ru-H<sub>2</sub>O</b>	462 (7,6)	-	367 (9,8)	276 (35,6)
<b>Ru-NO<sub>2</sub></b>	474 (7,1)	-	368 (9,5)	275 (35,3)

Como esperado, a introdução dos outros ligantes monodentados causou um deslocamento hipsocrômico nas bandas MLCT do complexo, de maneira que a banda MLCT em 426 nm do Ru-Cl não pode mais ser vista nos espectros do Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub>. Isso não significa que a transição não ocorre mais, apenas que, devido ao deslocamento da banda, ela se encontra sobreposta com outra transição, portanto não pode ser visualizada utilizando essa técnica. Além disso, destaca-se aqui o espectro da solução após a tentativa de síntese do Ru-NO. A cor da solução desse espectro é amarelada, característica de nitrosilos de rutênio, e o deslocamento da banda MLCT foi tão acentuado que ela não pode ser mais vista no espectro eletrônico. Essa solução muda de cor rapidamente, mesmo quando mantida no escuro, retornando para uma solução do precursor Ru-Cl (**Capítulo 3**), sendo assim esse espectro só pode ser tirado imediatamente após a adição do sal NOBF<sub>4</sub> em excesso, o que explica a estrutura vibracional na região da transição IL do dppz, que é a mesma região na qual esse sal absorve a radiação eletromagnética. Com a caracterização dos compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub> por espectroscopia de absorção eletrônica realizada, as próximas técnicas também podem ser realizadas para entender melhor a estrutura desses compostos.

## 2.4 Espectroscopia de emissão eletrônica

Um dos fatores importantes a ser verificado para os compostos estudados nesse trabalho é sua capacidade de emitir luz. A emissão de luz implica em um decaimento radiativo do estado eletrônico excitado, sendo assim, suas propriedades fotoquímicas podem gerar as aplicações desejadas e listadas no **Capítulo 1** deste trabalho. Para isso, foi utilizada a técnica de espectroscopia de emissão eletrônica e os espectros de emissão e de excitação foram registrados. Os conceitos por trás de um espectro de emissão já foram abordados no item 1.6.2

desse trabalho, porém o espectro de excitação ainda não foi devidamente apresentado e cabe aqui uma breve introdução a seu respeito.

Como já discutido, a utilização da radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico irá causar uma excitação eletrônica, que, caso seja uma propriedade da molécula analisada, poderá decair ao estado fundamental emitindo luz, e essa luz será detectada pelo equipamento, registrado o espectro de emissão. O espectro de excitação, por sua vez, é obtido ao irradiar a amostra em questão com diversos comprimentos de onda fazendo com que o detector capture sinais apenas do comprimento de onda específico do máximo de emissão daquela molécula, de maneira que o espectro registrado corresponderá aos comprimentos de onda nos quais aquela molécula absorveu para emitir a luz (J. R. ALBANI, 2004). Ou seja, basicamente, o espectro de excitação deve ter seu perfil muito próximo ao de absorção, assumindo que a molécula não sofra nenhuma reação ou rearranjo quando atinge o estado eletrônico excitado.

Outro parâmetro importante de ser comentado é o rendimento quântico de emissão ( $\Phi$ ) de um composto. Pela definição presente na física de partículas, o rendimento quântico de um processo induzido por radiação eletromagnética é a razão entre número de vezes que esse processo ocorre e o número de fótons absorvidos pelo sistema (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014; BRASLAVSKY, 2007). No caso de um rendimento quântico de emissão, o processo em questão é a emissão de um fóton, portanto pode-se definir o rendimento quântico de emissão como:

$$\Phi_{em} = \frac{\text{número de fótons emitidos}}{\text{número de fótons absorvidos}} \quad \text{Equação XII}$$

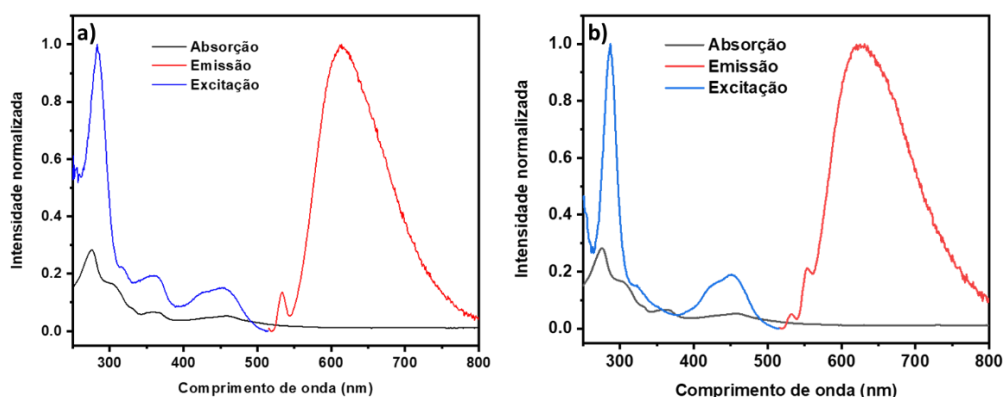
Experimentalmente, essa equação não é aplicável utilizando os equipamentos disponíveis em um laboratório comum de química. Uma alternativa para o cálculo desse parâmetro é utilizando um padrão, ou seja, um composto cujo rendimento quântico já seja conhecido, comparando diretamente a curva de emissão obtida para a amostra em questão com o padrão através da equação (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014):

$$\Phi_{em} = \Phi_{em(\text{padrão})} * \left( \frac{\text{Área da banda de emissão da amostra}}{\text{Área da banda de emissão do padrão}} \right) \left( \frac{\text{Absorbância no } \lambda_{exc} \text{ do padrão}}{\text{Absorbância no } \lambda_{exc} \text{ da amostra}} \right) \quad \text{Equação XIII}$$

Neste trabalho, foi utilizado o composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  como padrão e o solvente acetonitrila para realização dos experimentos em triplicata ( $\Phi_{em,ACN} = 0,059$ ) (KARGES et al.,

2019). Os espectros de emissão, excitação e os valores calculados para os compostos Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub> estão representados na **Figura 28** e na **Tabela 4**.

**Figura 28:** Espectros de Emissão, Excitação e Absorção eletrônica para os compostos Ru-H<sub>2</sub>O (a) e Ru-NO<sub>2</sub> (b) em acetoneitrila. [Ru] = 5 μM; Abertura das fendas = 6 nm; λ<sub>exc</sub> = 462 nm (Ru-H<sub>2</sub>O) e 474 nm (Ru-NO<sub>2</sub>).



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 4:** Valores do comprimento de onda do máximo de emissão e do rendimento quântico de emissão dos compostos estudados.

Composto	λ <sub>em</sub> (nm)	Φ <sub>em</sub>
Ru-Cl	-	-
Ru-H <sub>2</sub> O	614	5,45.10 <sup>-4</sup> (± 9,38.10 <sup>-5</sup> )
Ru-NO <sub>2</sub>	631	9,40.10 <sup>-3</sup> (± 1,37.10 <sup>-4</sup> )

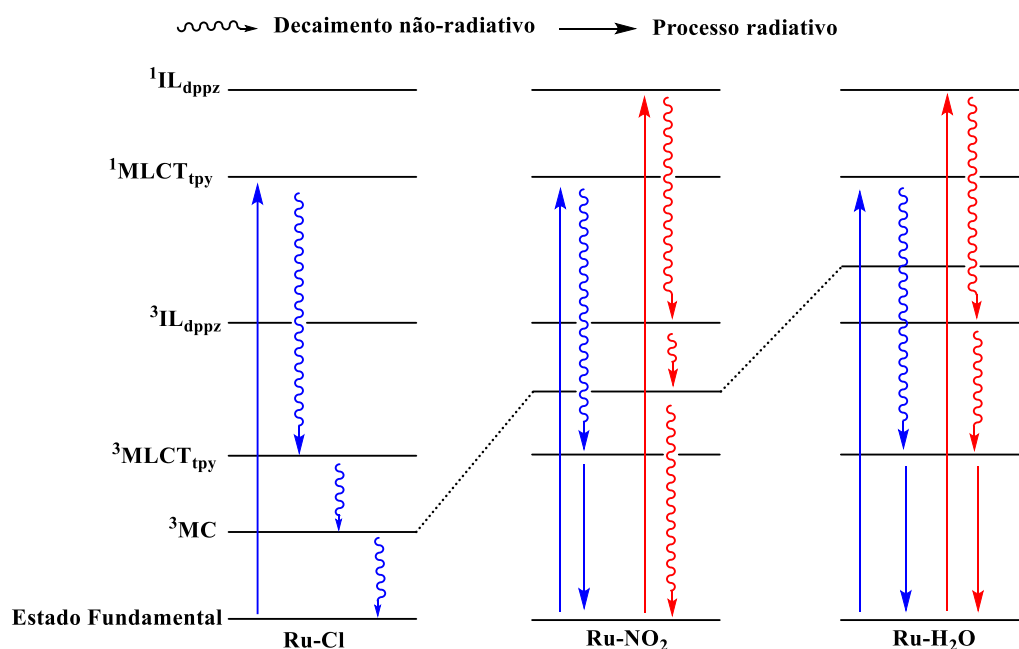
Com os resultados da espectroscopia de emissão em mãos, a energia relativa dos orbitais desses compostos pode ser compreendida, utilizando os conceitos discutidos no item 1.6.2 do **Capítulo 1** deste trabalho. Inicialmente, destaca-se que a banda de absorção de menor energia atribuída como MLCT em todos os complexos corresponde à passagem de um elétron do estado fundamental (um orbital de caráter metálico) para o estado <sup>1</sup>MLCT (um orbital de caráter do ligante tpy). Sendo assim, a energia observada no λ<sub>max</sub> dessa banda corresponde à diferença de energia entre esses dois estados de energia. Sabe-se que a emissão dos complexos ocorre devido à um decaimento radiativo do estado <sup>3</sup>MLCT<sub>tpy</sub> (o nível de menor energia, portanto seguindo a regra de Kasha), que é acessado através de um cruzamento intersistema <sup>1</sup>MLCT<sub>tpy</sub> → <sup>3</sup>MLCT<sub>tpy</sub> (JURIS et al., 1988). No entanto, esse estado pode ser desativado por um estado <sup>3</sup>MC próximo

em energia, fazendo com que o complexo não apresente uma luminescência em temperatura ambiente. Nesse caso, a alteração do ligante monodentado apresenta um papel importante na interpretação dos dados. Como já discutido anteriormente, a presença de um ligante  $\pi$ -doador como o  $\text{Cl}^-$  irá doar densidade eletrônica para o centro metálico, aumentando assim a energia dos orbitais ligantes com caráter metálico e diminuindo a energia dos orbitais antiligantes de mesmo caráter (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014; JURIS et al., 1988). Devido a esse fato, o nível  $^3\text{MC}$  do complexo Ru-Cl apresenta uma energia menor do que o estado  $^3\text{MLCT}$ , gerando uma situação representada na **Figura 2** (a). Isso explica a observação do composto Ru-Cl ser o único não emissivo da série. Já no caso dos compostos Ru- $\text{H}_2\text{O}$  e Ru- $\text{NO}_2$ , a emissão observada ocorre devido ao estado  $^3\text{MC}$  apresentar uma energia maior do que o estado  $^3\text{MLCT}_{\text{tpy}}$ , e seu espectro de emissão eletrônica revela a energia do nível  $^3\text{MLCT}_{\text{tpy}}$ , que, como esperado, é menor do que o estado  $^1\text{MLCT}_{\text{tpy}}$ , dada sua maior multiplicidade de spin, causando uma estabilização no sistema.

Analisando agora os espectros de excitação, percebe-se como a energia do estado  $^3\text{MC}$  varia de acordo com o ligante monodentado coordenado ao sistema. Comparando os espectros de excitação do Ru- $\text{H}_2\text{O}$  e do Ru- $\text{NO}_2$ , nota-se que o espectro do Ru- $\text{H}_2\text{O}$  apresenta uma banda a mais ( $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$ ). A posição relativa do nível  $^3\text{MC}$  pode explicar o motivo dessa banda aparecer apenas no espectro do Ru- $\text{H}_2\text{O}$ . Como observado no espectro de absorção eletrônica, essa região é onde está a banda atribuída como uma das transições do ligante dppz ( $n \rightarrow \pi^* + \pi \rightarrow \pi^*$ ). Destaca-se aqui também que, conforme explicado no item anterior, a transição para o estado  $^1\text{MLCT}_{\text{dppz}}$  dos complexos Ru- $\text{H}_2\text{O}$  e Ru- $\text{NO}_2$  apresentou um deslocamento hipsocrômico com relação ao composto Ru-Cl, fazendo com que não aparecesse no espectro de absorção eletrônica. No caso dessa transição ocorrer em uma energia muito próxima à energia da transição IL da dppz, com os experimentos realizados não é possível de determinar quais desses dois níveis está contribuindo para a banda observada no espectro de excitação. Nesse texto, esse nível será abordado como  $^1\text{IL}_{\text{dppz}}$  por coerência com o espectro de absorção eletrônica. Como essa banda está sendo visualizada no espectro de emissão do Ru- $\text{H}_2\text{O}$ , isso indica que o nível  $^3\text{MC}$  está acima do estado  $^3\text{MLCT}_{\text{tpy}}$  para ambos os compostos, porém que está acima do estado  $^3\text{IL}_{\text{dppz}}$  apenas no caso do composto Ru- $\text{H}_2\text{O}$ . Para o composto Ru- $\text{NO}_2$ , nenhuma emissão é observada partindo do estado  $^3\text{IL}_{\text{dppz}}$ , indicando que o estado  $^3\text{MC}$  apresenta uma menor energia, desativando o estado  $^3\text{IL}_{\text{dppz}}$  de maneira não radiativa. A **Figura 29** mostra

de maneira esquematizada a posição relativa desses níveis de energia, resumizando o que foi discutido até agora de maneira qualitativa.

**Figura 29:** Diagrama simplificado dos níveis de energia dos compostos estudados neste trabalho.



**Fonte:** o próprio autor.

A princípio, um fato que pode ser questionado é de que o composto Ru-NO<sub>2</sub> apresenta o nível <sup>3</sup>MC com uma energia menor do que o Ru-H<sub>2</sub>O. Dada a natureza  $\pi$ -aceptora do ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (quando coordenado pelo N, como será demonstrado nos próximos itens deste trabalho), esperava-se que a retirada de densidade eletrônica do centro metálico por parte do ligante iria aumentar a energia do nível <sup>3</sup>MC, um efeito que não é observada para o ligante H<sub>2</sub>O e, portanto, a energia desse nível nos três complexos seguiria a ordem <sup>3</sup>MC<sub>Ru-NO<sub>2</sub> > <sup>3</sup>MC<sub>Ru-H<sub>2</sub>O</sub> > <sup>3</sup>MC<sub>Ru-Cl</sub>. No entanto, um outro efeito que age sobre esses compostos deve ser analisado para um melhor entendimento da energia do nível <sup>3</sup>MC. Como já mencionado no **Capítulo 1**, a presença de ligantes volumosos (em especial a tpy) na estrutura desses complexos afeta de maneira significativa sua estrutura eletrônica. Sabe-se que a formação dos orbitais moleculares de um complexo de coordenação são formados a partir da combinação linear dos orbitais dos ligantes e do centro metálico. A presença de um ligante volumoso na estrutura do complexo acaba distorcendo sua geometria, de maneira que os orbitais d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub> e d<sub>z<sup>2</sup></sub> do centro metálico apresentam uma superposição menor com os orbitais dos ligantes, quando comparados com um complexo octaédrico perfeito. Visto que essa superposição é menor, a combinação dos orbitais é menos</sub>

efetiva e, portanto, os orbitais moleculares gerados apresentam uma menor diferença de energia, o que torna o estado  $^3\text{MC}$  mais próximo do estado fundamental, resultando nas propriedades observadas (JURIS et al., 1988; KNOLL; ALBANI; TURRO, 2015; SUN et al., 2013b). Apesar dos mesmos ligantes volumosos estarem envolvidos nos três complexos, o que ocorre nesses casos é de que a combinação de cada ligante monodentado com os ligantes volumosos gera uma soma dos efeitos discutidos, ordenando a energia do nível  $^3\text{MC}$  da maneira observada. Outro fator a ser discutido é a natureza do ligante  $\text{NO}_2^-$  em comparação com outro ligante muito estudado na química de coordenação, o  $\text{CN}^-$ . O ligante  $\text{CN}^-$ , assim com o  $\text{NO}_2^-$ , apresenta uma ligação múltipla em sua estrutura, portanto, apresenta orbitais  $\pi$  antiligantes vazios capazes de interagir com os orbitais  $d$  cheios do centro metálico através do fenômeno da retrodoação, caracterizando esse ligante como  $\pi$ -acceptor. No entanto, essa molécula também apresenta um forte efeito  $\sigma$ -doador, podendo, portanto, se coordenar à metais com alta e baixa densidade eletrônica, de maneira que estabiliza metais com alta densidade eletrônica a partir do efeito de retrodoação e estabiliza metais com baixa densidade eletrônica através da doação  $\sigma$  de densidade eletrônica (COTTON; ZINGALES1, 1961; HANUSA, 2011). Apesar desse efeito não ser vastamente discutido na literatura para o ligante  $\text{NO}_2^-$ , Conradie & Ghosh demonstraram que, apesar do ligante  $\text{NO}_2^-$  apresentar um caráter  $\pi$ -acceptor relativamente alto devido à energia do seu LUMO, a energia e simetria de seu HOMO também garantem que esse ligante apresente também um forte efeito  $\sigma$ -doador (CONRADIE; GHOSH, 2006). Dessa maneira, essa doação de elétrons através da interação  $\sigma$  pode estabilizar o átomo de Ru do Ru- $\text{NO}_2$  (que, conforme será discutido no **Capítulo 3**, apresenta uma baixa densidade eletrônica devido à presença dos ligantes tpy e dppz), causando o efeito observado de abaixamento da energia do nível  $^3\text{MC}$ .

No entanto, quando se observa os rendimentos quânticos de emissão calculados para ambos os complexos emissivos, percebe-se que o composto Ru- $\text{NO}_2$  apresenta um maior rendimento quântico de emissão, indicando que o processo de emissão é mais favorecido para esse complexo com relação ao Ru- $\text{H}_2\text{O}$ , o que pode ser um indicativo de que esse composto apresenta um tempo de vida do estado  $^3\text{MLCT}$  maior e que talvez seja um melhor candidato à fotossensibilizador, visto que o processo de decaimento radiativo é menos impedido por processos vibracionais e que, devido à isso, os mesmos processos vibracionais também deixariam de competir com a transferência de energia de excitação para o  $^3\text{O}_2$ .

## 2.5 Espectroscopia de absorção resolvida no tempo

Como explicado no item 1.6.3, a espectroscopia de absorção resolvida no tempo será utilizada, nesse trabalho, para determinação do tempo de vida dos estados excitados dos compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub>. Primeiramente, destaca-se aqui a escala de tempo utilizada nos experimentos. Como já discutido, as duas escalas possíveis de serem utilizadas consistem nos experimentos ns-TA e fs-TA.

Os equipamentos utilizados para ambas as técnicas apresentam limites experimentais para determinação do tempo de vida na forma de limites inferiores e superiores da escala de tempo utilizada. Para os equipamentos disponíveis no *Department of Chemistry and Biochemistry (OSU)*, o experimento de ns-TA apresenta um limite inferior de aproximadamente 8 ns, enquanto o experimento de fs-TA apresenta um limite superior de aproximadamente 3 ns. Portanto, existe uma janela de tempo na qual nenhum dos dois equipamentos pode medir, gerando a necessidade da utilização de outra técnica para determinação do tempo de vida. A vantagem da utilização dessas técnicas, apesar de mais complexas, é a visualização do espectro de absorção do estado excitado indiretamente, revelando se a dinâmica de estados excitados desse tipo de complexo apresenta algum comportamento anômalo ou se se comporta conforme o esperado.

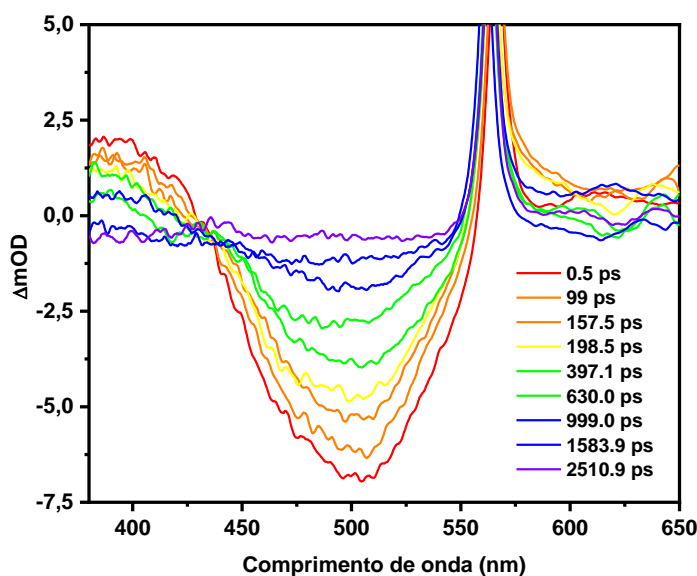
Inicialmente, foi realizada uma tentativa de medir os tempos de vida dos compostos deste trabalho utilizando a ns-TA, no entanto foi observado que o tempo de vida desses complexos era menor do que o limite inferior dessa técnica, sendo então necessária a utilização da fs-TA para determinação desses tempos de vida. O primeiro composto a ser analisado foi o Ru-Cl.

Analisando o espectro e juntando com as informações apresentadas no item 1.6.3, é possível interpretar um pouco da dinâmica dos estados excitados desse complexo. A partir do espectro eletrônico do Ru-Cl apresentado na **Figura 26**, observa-se que a banda MLCT do composto apresenta um máximo de 503 nm em acetonitrila. Sendo assim, espera-se que o valor da absorção nesse comprimento caia conforme a amostra é irradiada, indicando uma menor população do estado fundamental. Esse comportamento é observado na **Figura 30**, na forma de um  $\Delta$ OD negativo nessa região logo após o bombeamento da amostra. Com o passar do tempo, esse valor diminui em amplitude, indicando que a absorção voltou a aumentar devido ao retorno dos elétrons ao estado fundamental. Ao mesmo tempo, após o bombeamento da



amostra é observado um aumento na absorção em uma região de maior energia, com  $\lambda_{\text{max}} = 392$  nm, referente à absorção do estado  $^3\text{MLCT}$  do composto.

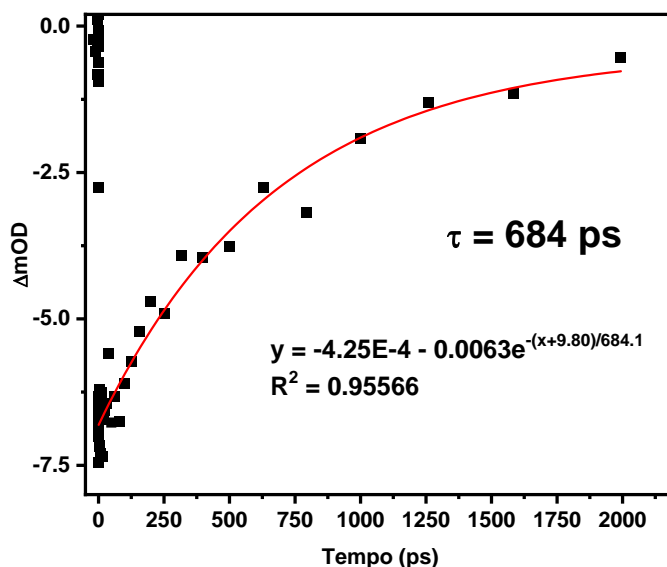
**Figura 30:** Espectro de fs-TA de uma solução 100  $\mu\text{M}$  Ru-Cl em acetonitrila ( $\lambda_{\text{exc}} = 550$  nm).



Fonte: o próprio autor.

A partir do espectro de fs-TA, a determinação do tempo de vida do estado excitado é realizada utilizando uma curva cinética no máximo observado no espectro (503 nm) e utilizando um *fit* exponencial para determinação do tempo no qual o valor de  $\Delta\text{mOD}$  caiu pela metade, ou seja, o tempo de vida do estado excitado do composto Ru-Cl. Apesar de não ser possível inferir exatamente quais são todos os estados excitados envolvidos nessa absorção apenas com esse experimento, utilizando o *fit* monoexponencial, é possível avaliar o tempo no qual o composto se mantém em qualquer outro estado além do fundamental.

**Figura 31:** Curva cinética obtida para o experimento de fs-TA do Ru-Cl ( $\lambda_{\text{max}} = 503 \text{ nm}$ ).



**Fonte:** o próprio autor.

De acordo com a curva cinética, o tempo de vida do estado excitado do complexo Ru-Cl é de 684 ps. Apesar de ainda ser um tempo de vida relativamente curto para um complexo de coordenação, esse tempo é consideravelmente maior do que o tempo de vida do composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ , de 250 ps (BROWN et al., 2012; HOFMEIER; SCHUBERT, 2004), indicando que a presença do dppz na estrutura, além de garantir a possibilidade de intercalação do complexo com DNA, ainda aumenta o tempo de vida do estado excitado, agindo de maneira sinérgica no complexo. Essa informação é importante pois, como já discutido antes, a presença de um ligante volumoso como a tpy diminui a energia do nível  $^3\text{MC}$ , fazendo com que esse estado desative de maneira não-radiativa o estado emissivo  $^3\text{MLCT}$ , o que explica o motivo do composto  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ , que apresenta dois desses ligantes, não ser emissivo em comparação ao composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , no qual o estado  $^3\text{MC}$  se encontra acima do estado  $^3\text{MLCT}$ , o que torna o complexo emissivo. Apesar de existirem complexos com dppz em sua estrutura que apresentem tempos de vida maiores, é importante que a presença do dppz na estrutura de um complexo contendo tpy faça com que o tempo de vida desse complexo seja superior ao complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ , visto que o ligante tpy está presente nesse complexo com um importante papel de facilitar a fotoliberação do ligante monodentado e facilitar as rotas sintéticas para obtenção dos compostos. Visto que, a partir dos resultados da espectroscopia de emissão, concluiu-se que a espécie Ru-Cl era a única não-emissiva, é de se esperar que os tempos de

vidas dos estados excitados dos outros dois compostos sejam maiores, potencializando ainda mais suas aplicações.

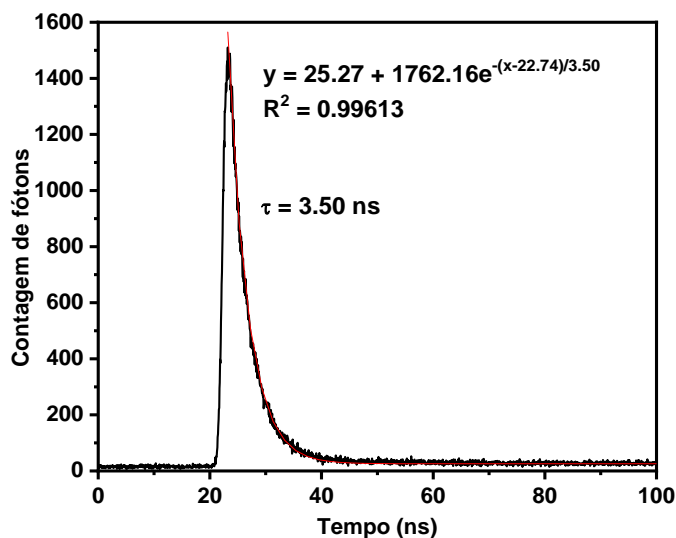
A **Tabela 5** resume o valor do tempo de vida do estado excitado de cada complexo estudado, de maneira que o gráfico de fs-TA e a curva cinética do composto Ru-H<sub>2</sub>O estão em **ANEXO**.

**Tabela 5:** Valores de rendimento quântico de emissão e tempo de vida do estado excitado para os compostos estudados neste trabalho.

Composto	$\Phi_{em}$	$\tau$ (ns)
<b>Ru-Cl</b>	-	0,68
<b>Ru-H<sub>2</sub>O</b>	$5,45 \cdot 10^{-4} (\pm 9,38 \cdot 10^{-5})$	0,91
<b>Ru-NO<sub>2</sub></b>	$9,40 \cdot 10^{-3} (\pm 1,37 \cdot 10^{-4})$	3,50

Nota-se que a coordenação do ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> aumentou consideravelmente o tempo de vida do estado excitado do complexo Ru-NO<sub>2</sub>, uma propriedade promissora quando se pensa em suas possíveis aplicações fotoquímicas. Esse aumento, no entanto, fez com que o valor desse tempo de vida fosse maior do que o limite superior que o equipamento de fs-TA poderia detectar, ao mesmo tempo que é menor do que o limite inferior que o equipamento de ns-TA consegue detectar, sendo assim seu tempo de vida foi determinado utilizando uma técnica mais simples, a TCSPC (*Time-correlated single photon counting*), que consiste basicamente em detectar fótons emitidos por uma amostra irradiada por um laser de alta repetição ao longo de um determinado período de tempo, gerando uma distribuição dos fótons em função do tempo e retornando o tempo do processo em questão (no caso, o tempo de vida do estado excitado) (W. BECKER, 2021).

**Figura 32:** Contagem de fótons em função do tempo do experimento de TCSPC para o complexo Ru-NO<sub>2</sub>.



Fonte: o próprio autor.

Analogamente ao experimento de fs-TA, o tempo de vida a partir do experimento de TCSPC é determinado a partir de um *fit* exponencial da curva obtida na **Figura 32**. Apesar da perda das informações que o espectro de fs-TA revelaria para o complexo Ru-NO<sub>2</sub>, visto que os espectros para os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O são semelhantes, é de se esperar que o comportamento dos estados excitados do composto Ru-NO<sub>2</sub> seja semelhante ao dos outros dois, apresentando uma energia de absorção do estado MLCT de maior energia do que a energia na qual o estado fundamental absorve a energia eletromagnética.

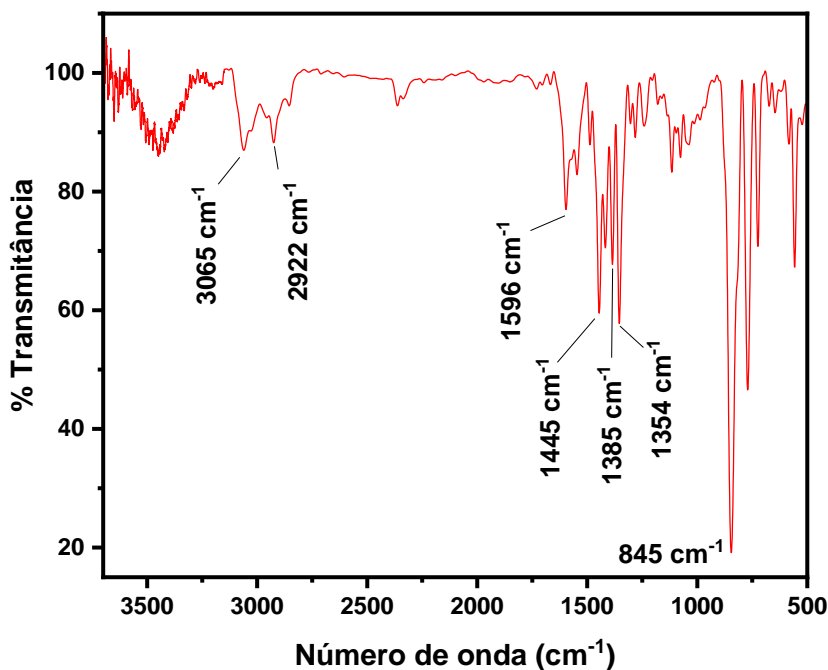
Comparando os valores de rendimento quântico de emissão com os tempos de vida dos estados excitados, é observado que um estado excitado com um tempo de vida maior está diretamente ligado com um rendimento quântico de emissão maior do composto, conforme evidenciado na **Tabela 5**. Essa observação demonstra que realmente o composto Ru-NO<sub>2</sub> é realmente o mais promissor da série, visto que apresentou o maior tempo de vida do estado excitado e, por consequência, um maior rendimento quântico de emissão. Devido a isso, pode-se esperar que a eficiência da geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> para esse composto também deve ser a maior dentre a série, já que um tempo de vida maior do estado excitado significa que a chance desse estado transferir sua energia para uma molécula de <sup>3</sup>O<sub>2</sub> seja maior.

## 2.6 Espectroscopia vibracional

No que diz respeito à espectroscopia vibracional desses compostos, muitas informações úteis podem ser inferidas a partir dos espectros vibracionais, especialmente do ponto de vista

da coordenação dos ligantes monodentados  $\text{NO}^+$  e  $\text{NO}_2^-$ . O espectro vibracional do sólido referente à tentativa de síntese do Ru-NO será analisado no **Capítulo 3**, devido aos problemas encontrados para esse composto. O primeiro espectro a ser analisado será o do precursor Ru-Cl, visando elucidar os estiramentos presentes no espectro.

**Figura 33:** Espectro vibracional da pastilha do complexo Ru-Cl em KBr.

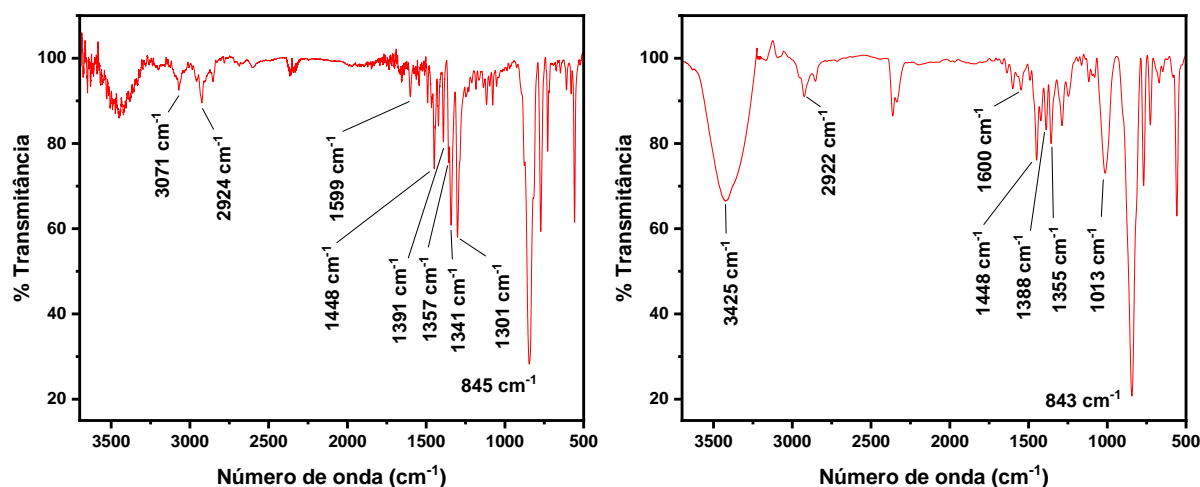


**Fonte:** o próprio autor.

Considerando que os tipos de ligação envolvendo os ligantes são parecidas, é de se esperar que o espectro FTIR desse complexo seja relativamente simples, já que levando em conta os ligantes, existem apenas ligações C=C, C=N e C-H. As bandas presentes de 1354 a  $1596 \text{ cm}^{-1}$  são correspondentes às vibrações C=C e C=N tanto da tpy quanto da dppz, de maneira que a intensidade desses sinais pode se somar, já que irão cair em regiões muito próximas, gerando o perfil observado, enquanto as vibrações em 2922 e  $3065 \text{ cm}^{-1}$  corresponde às ligações C-H dos carbonos  $\text{sp}^2$ . Já o estiramento em  $845 \text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação P-F do contra-íon hexafluorofosfato (NAKAMOTO, 1997, 2008).

Visto que todos os compostos apresentam grande parte de sua estrutura parecida, espera-se que o espectro vibracional dos três compostos também seja semelhante, conforme é observado comparando o espectro do Ru-Cl com os espectros dos outros dois compostos, ilustrados na **Figura 34**.

**Figura 34:** Espectros vibracionais das pastilhas do complexo Ru-NO<sub>2</sub> (esquerda) e Ru-H<sub>2</sub>O (direita) em KBr.



Fonte: o próprio autor.

As bandas presentes no espectro do Ru-Cl continuam com basicamente os mesmos valores de número de onda (com alterações de no máximo 6 cm<sup>-1</sup>), indicando que a tpy e a dppz estão presentes na estrutura. O que se destaca de novo nesses espectro é o surgimento de bandas em 1341 e 1301 cm<sup>-1</sup> (no caso do Ru-NO<sub>2</sub>) e em 3425 e 1013 cm<sup>-1</sup> (no caso do Ru-H<sub>2</sub>O). Tendo em vista a mudança que ocorreu na estrutura do complexo e a energia dessas bandas, é seguro afirmar que os novos picos observados no espectro do Ru-NO<sub>2</sub> são referentes às vibrações do ligante monodentado, aparecendo entre 1300 e 1400 cm<sup>-1</sup>, característica para esse ligante coordenado a complexos mononucleares de rutênio, revelando também informações à respeito da isomeria de ligação do NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, já que esses valores são tipicamente reportados para isômeros cujo ligante está coordenado pelo átomo de N (GODWIN; MEYER, 1971b; LUIZ MOREIRA DO AMARAL et al., 2022; SAUAIA; DA SILVA, 2003; SCHANIEL et al., 2010). Já as bandas novas que surgiram no espectro do composto Ru-H<sub>2</sub>O são referentes à vibração da ligação da molécula de H<sub>2</sub>O e à ligação Ru-OH<sub>2</sub>, respectivamente. A primeira é facilmente atribuída pois a vibração O-H apresenta uma banda larga característica nessa região, enquanto a outra banda pode ser atribuída como da vibração Ru-O devido ao valor de sua energia, relativamente próxima de uma ligação M-O (SREENAVYA et al., 2018). Além disso, outro destaque a ser realizado é o aumento na intensidade do pico referente ao contra-íon PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (843 cm<sup>-1</sup>) no complexo Ru-H<sub>2</sub>O, devido ao fato de agora 2 desses ânions estarem presentes na estrutura em comparação com apenas 1 nos complexos Ru-Cl e Ru-NO<sub>2</sub>. A **Tabela 6** reúne as tentativas de atribuição dos espectros vibracionais de todos os compostos.

**Tabela 6:** Tentativa de atribuição dos picos destacados nos espectros vibracionais dos complexos estudados.

Tentativas de atribuição	Ru-Cl (cm <sup>-1</sup> )	Ru-H <sub>2</sub> O (cm <sup>-1</sup> )	Ru-NO <sub>2</sub> (cm <sup>-1</sup> )
$\nu^{21}_{as}(\text{PF}_6)$	845, s	843, s	845, s
$\nu(\text{Ru-O})$	-	1013, m	-
$\nu(\text{C=N})_{\text{dppz}}$	1354, m	1355, m	1357, m
$\nu(\text{C=C})_{\text{tpy}}$	1385, m	1388, m	1391, m
$\nu(\text{C=C})_{\text{dppz}}$	1445, m	1448, m	1448, m
$\nu(\text{C=N})_{\text{tpy}}$	1596, w	1600, w	1559, w
$\nu(\text{O-H})$	-	3425, m, br	-
$\nu(\text{NO}_2)$	-	-	1301;1341, s

Abreviações: s = forte (*strong*); m = médio (*medium*); w = fraco (*weak*); br = largo (*broad*). Todos os dados foram obtidos a partir de pastilhas de KBr, preparadas com 200 mg de KBr (grau espectroscópico) e 2 mg de cada composto.

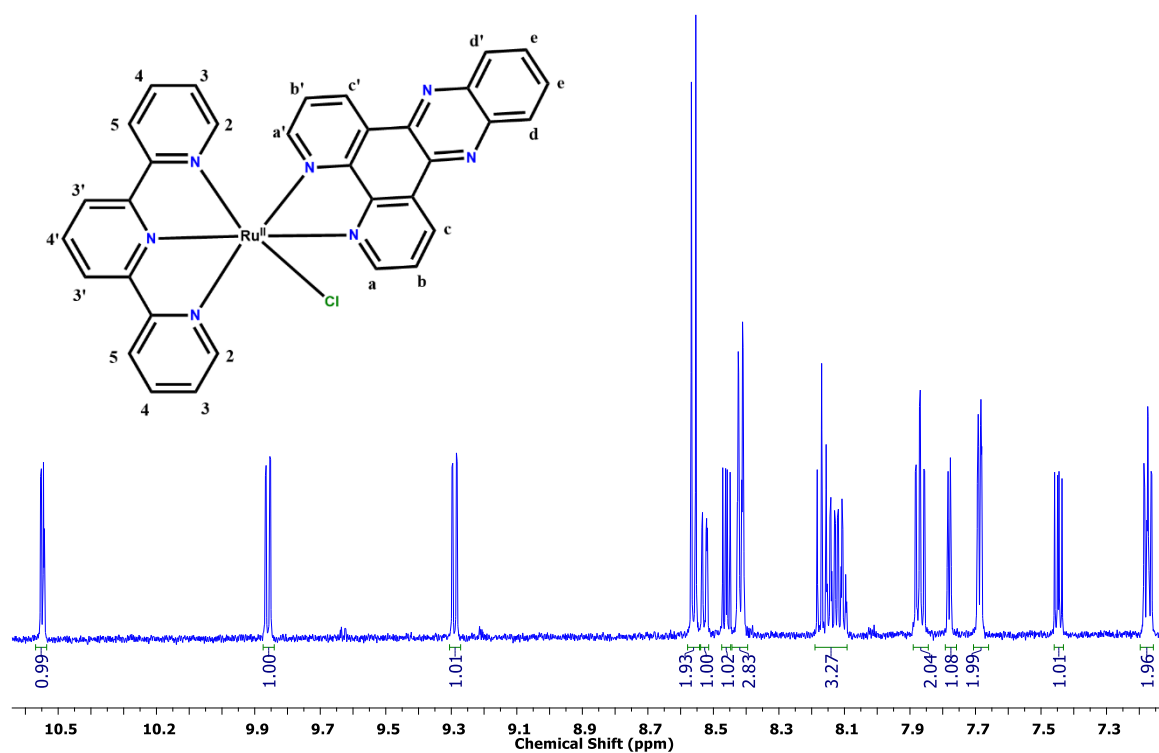
## 2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Como discutido no item 1.6.4, a espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN é uma das mais importantes na elucidação da estrutura de um composto de coordenação. Nesse item, será feita a análise dos espectros dos compostos estudados nessa série e uma tentativa da atribuição dos sinais com base na literatura e na estrutura de cada composto.

Inicialmente, o primeiro fator a ser verificado em um espectro de <sup>1</sup>H-RMN é se a soma das integrais dos sinais realmente corresponde ao número total de hidrogênios da molécula. No espectro do Ru-Cl, a soma das integrais totaliza o número 21, que é exatamente o número de hidrogênios da molécula, mostrando que se pode prosseguir com a análise. Dada a complexidade da estrutura desse composto, um experimento que pode auxiliar em sua elucidação é o COSY, como descrito no item 1.6.4. Sendo assim, o espectro COSY para o composto Ru-Cl também foi registrado.

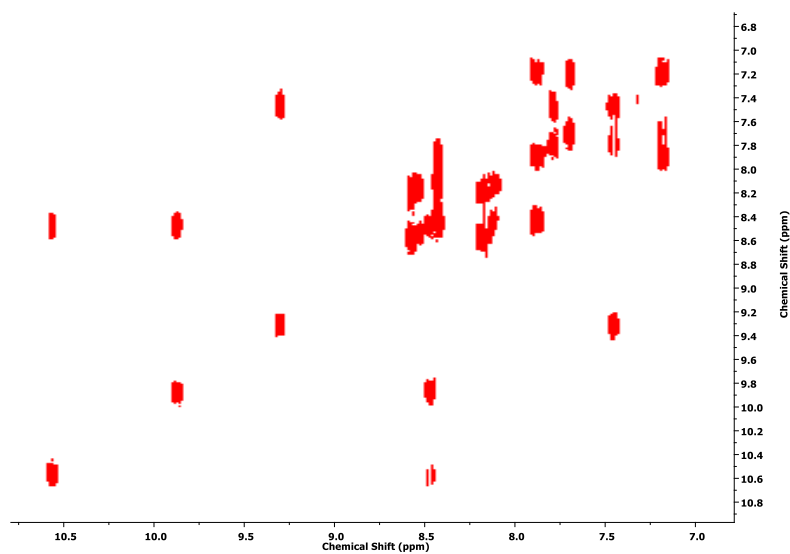
<sup>21</sup> Símbolo que representa a frequência de estiramento de uma ligação, em cm<sup>-1</sup>.

**Figura 35:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto Ru-Cl em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K).



Fonte: o próprio autor.

**Figura 36:** Espectro COSY de uma solução do composto Ru-Cl em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K).

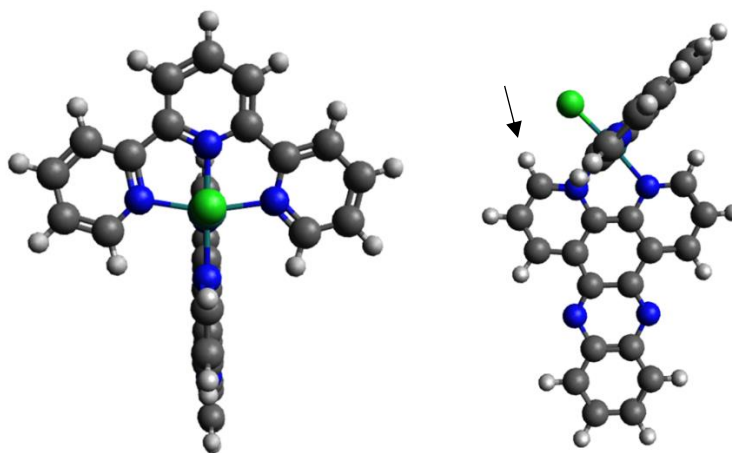


Fonte: o próprio autor.



É de se esperar que os hidrogênios mais distantes do centro metálico não apresentem uma grande variação quando comparados ao espectro dos ligantes livres, visto que não existe nenhum efeito eletrônico muito pronunciado. No entanto, quando coordenados, os hidrogênios dos ligantes podem perder sua equivalência devido à simetria e gerar sinais diferentes no RMN. Para isso, a visualização da estrutura tridimensional do complexo é necessária. Essa estrutura foi construída utilizando o programa Avogadro (HANWELL et al., 2012) e está representada de duas maneiras diferentes na **Figura 37**.

**Figura 37:** Representação tridimensional do composto Ru-Cl no plano de cada ligante polipiridínico.



**Fonte:** o próprio autor.

Observando a estrutura tridimensional do composto, é possível inferir que o plano de reflexão presente no plano do ligante dppz garante que os hidrogênios das duas metades do ligante tpy sejam equivalentes e, portanto, apresentem os mesmos sinais no RMN. No entanto, o mesmo não pode ser dito para os hidrogênios do ligante dppz, como observado à direita na **Figura 37**. Sendo assim, é esperado que os sinais de hidrogênios equivalentes na dppz livre apresentem duplicação no complexo, com uma possível exceção dos hidrogênios mais distantes do centro metálico. Outro destaque a ser feito a partir da estrutura tridimensional é que o hidrogênio **a** da dppz está muito próximo do ligante monodentado Cl<sup>-</sup> (como observado pelo destaque da seta na **Figura 37**). Devido à essa proximidade, espera-se que esse hidrogênio apresente um sinal em campo mais baixo, visto que a presença da nuvem eletrônica do ligante monodentado o desblinda de maneira acentuada, um efeito que é observado nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN de compostos semelhantes que apresentam hidrogênios espacialmente próximos de ligantes monodentados com átomos eletronegativos (LÓPEZ et al., 2006; SILVA et al., 2018).

Partindo dessa observação, a primeira atribuição realizada é justamente a do sinal mais desblindado, associando com o hidrogênio **a** da **Figura 35**.

O espectro COSY, aliado ao raciocínio a partir da estrutura tridimensional, pode confirmar essa primeira atribuição. No espectro da **Figura 36**, observa-se que o hidrogênio apresentando um deslocamento químico próximo a 10,5 ppm está acoplando com apenas outro hidrogênio, indicando que apresenta apenas um hidrogênio vizinho. Observando a estrutura do complexo, o hidrogênio **a** também apresenta apenas um vizinho, confirmando a hipótese da atribuição. Os hidrogênios **c** e **c'** apresentam deslocamentos químicos próximos ao observado no ligante livre, porém agora os dois apresentam sinais diferentes devido à quebra da simetria da molécula.

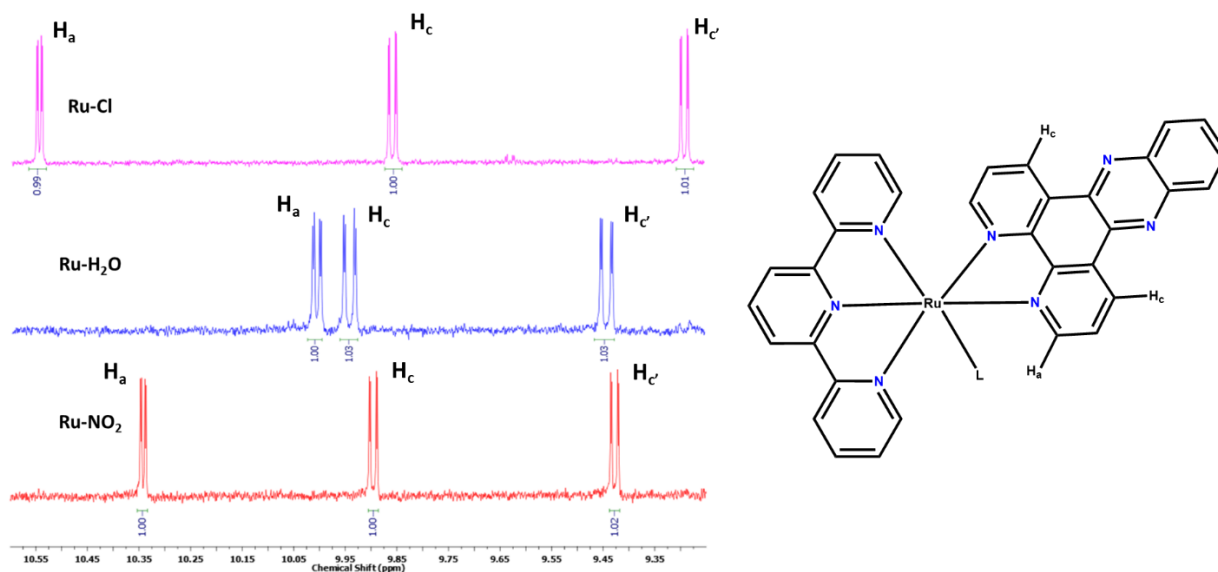
Apesar do efeito de corrente de anel ser observado na química orgânica como um efeito de desblindagem dos hidrogênios na grande maioria das vezes, quando ligantes orgânicos são coordenados a centros metálicos, a estrutura tridimensional dos complexos de coordenação pode fazer com que alguns hidrogênios se encontrem na região de blindagem do anel (representada por + na **Figura 20**) (ABRAHAM; THOMAS, 1966; PAVIA et al., 2009). Desse modo, o efeito de corrente do anel acaba tornando esses hidrogênios mais blindados, fazendo com que seu sinal ocorra em um campo mais baixo. Observando a estrutura tridimensional do Ru-Cl, o hidrogênio denominado como **a'** se encontra justamente nessa região do espaço, justificando o fato de seu sinal não ser mais observado na região de campo baixo, como era observado no ligante livre. Essas primeiras atribuições aliadas ao espectro COSY servem como a base para elucidação total do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN. A lógica utilizada é que, visto que o hidrogênio **a** foi atribuído para o sinal em aproximadamente 10,5 ppm, o único hidrogênio ao qual o hidrogênio **a** acopla no espectro COSY é o hidrogênio **b**, que se encontra no carbono vizinho ao carbono do hidrogênio **a**. Por consequência, descobre-se que o sinal em aproximadamente 8,5 ppm se refere ao hidrogênio **b**. Seguindo essa lógica e utilizando os dados na literatura para o espectro tanto da dppz quanto da tpy (CHARLES J. POUCHERT; JACQLYNN BEHNKE, 1993), foi possível realizar uma tentativa de atribuição de cada sinal observado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto Ru-Cl e a mesma lógica foi seguida para os outros dois compostos. A **Tabela 7** resume as tentativas de atribuições para todos os compostos estudados neste trabalho.

**Tabela 7:** Tentativas de atribuição do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para os compostos.

Posição do $^1\text{H}$	$\delta_{\text{Ru-Cl}}$ (ppm)	$\delta_{\text{Ru-H}_2\text{O}}$ (ppm)	$\delta_{\text{Ru-NO}_2}$ (ppm)	Integral	Multiplicidade
<b>2</b>	7,68	7,72	7,76	1	Dubleto
<b>3</b>	7,28	7,25	7,21	2	Tripleto
<b>4</b>	7,87	7,72	7,92	2	Tripleto
<b>5</b>	8,42	8,45	8,41	2	Dubleto
<b>2'</b>	7,68	7,72	7,80	1	Dubleto
<b>3'</b>	8,55	8,61	8,54	2	Dubleto
<b>4'</b>	7,78	8,38	8,27	1	Tripleto
<b>a</b>	<b>10,55</b>	<b>10,01</b>	<b>10,34</b>	<b>1</b>	<b>Dubleto</b>
<b>b</b>	8,46	8,54	8,46	1	Multiplete
<b>c</b>	<b>9,85</b>	<b>9,95</b>	<b>9,90</b>	<b>1</b>	<b>Dubleto</b>
<b>d</b>	8,42	8,47	8,43	1	Multiplete
<b>e</b>	8,12	8,15	8,12	2	Multiplete
<b>a'</b>	8,17	8,15	8,15	1	Multiplete
<b>b'</b>	7,44	7,58	7,56	1	Tripleto
<b>c'</b>	<b>9,29</b>	<b>9,45</b>	<b>9,43</b>	<b>1</b>	<b>Dubleto</b>
<b>d'</b>	8,52	8,55	8,52	1	Dubleto

Com a atribuição realizada, é possível avaliar a influência do ligante monodentado na estrutura eletrônica do composto ao comparar os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de cada composto da série. Os espectros dos outros compostos da série estão em **ANEXO** neste trabalho. É esperado que os hidrogênios mais distantes do ligante monodentado não sofram alterações significativas com a mudança do ligante monodentado, e esse realmente foi o efeito observado para a série de compostos. No entanto, os hidrogênios próximos ao ligante monodentado (**a**, **c** e **c'**, destacados na tabela) sofreram modificações que permitem monitorar a troca desse ligante através da espectroscopia de RMN de maneira simples, visto que esses ligantes estão em uma região com poucos sinais no espectro.

**Figura 38:** Comparação dos sinais de  $^1\text{H}$ -RMN para os hidrogênios **a**, **c** e **c'** para a série de compostos estudados nesse trabalho.



Fonte: o próprio autor.

Analisando os 3 sinais de campo mais baixo (**a**, **c**, **c'**), observa-se que os sinais referentes aos hidrogênios **c** e **c'** não sofrem alterações drásticas, porém o hidrogênio **a** apresenta uma mudança significativa em sua blindagem com a mudança do ligante monodentado (**Figura 38**). Sendo assim, o acompanhamento desse sinal é uma maneira de verificar a troca de um ligante monodentado nesses complexos. A região na qual esses sinais aparecem também é um primeiro indicativo da pureza dos compostos, pelo menos em relação a outros complexos do mesmo tipo, visto que a presença de qualquer outro complexo do tipo  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{L}]^{n+}$  apresentaria um sinal próximo referente ao hidrogênio **a** dessa molécula.

## 2.8 Considerações a respeito da estrutura e composição do composto inédito Ru- $\text{NO}_2$

Por fim, encerra-se esse capítulo com uma discussão muito importante. Visto que o composto Ru- $\text{NO}_2$  é inédito na literatura, é importante que a estrutura que foi analisada até agora neste trabalho seja realmente a estrutura esperada a partir da síntese reagindo o composto Ru-Cl com o sal  $\text{NaNO}_2$ . Para isso, serão utilizadas duas técnicas experimentais para determinação da massa e da estrutura tridimensional do composto obtido: a espectrometria de massas e a difração de raios-X.

### 2.8.1 Espectrometria de massas de alta resolução

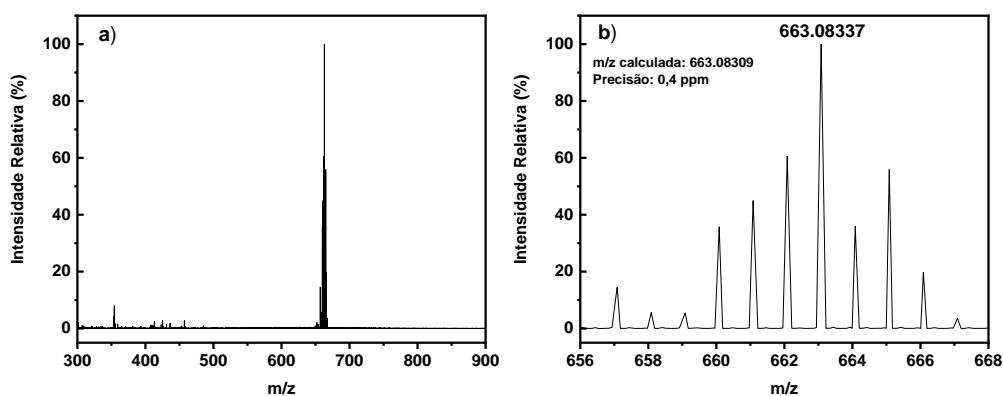
A utilização da espectrometria de massas de alta resolução é amplamente utilizada para determinação da massa molecular com uma alta precisão. Essa precisão é necessária para verificar a composição da molécula em questão, e pode ser expressa em partes por milhão (ppm), seguindo a equação abaixo:

$$\text{Precisão da massa (ppm)} = \left| \frac{m/z_{\text{experimental}} - m/z_{\text{teórico}}}{m/z_{\text{teórico}}} \right| \cdot 10^6$$

Na literatura, um valor máximo da precisão de 5 ppm é aceito para determinação da composição de uma amostra (ARREBOLA-LIÉBANAS; ROMERO-GONZÁLEZ; GARRIDO FRENICH, 2017; GROSS, 1994).

O espectro de massas foi registrado no Departamento de Química da Universidade de Ohio (*The Ohio State University, CBEC Analytical Spectroscopy Laboratory*), em um espectrômetro de massas Bruker 15 Tesla FT-ICR, utilizando a ionização por electrospray.

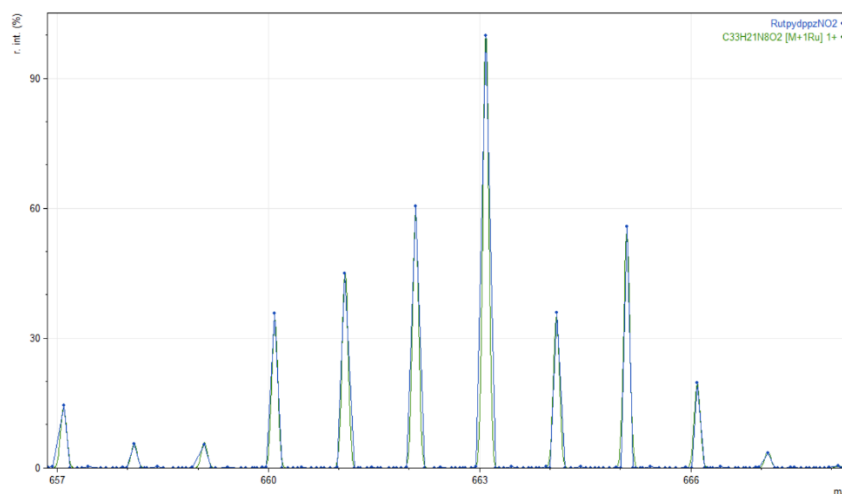
**Figura 39:** Espectro de massas obtido de uma solução de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  do composto Ru-NO<sub>2</sub> em acetonitrila (a), com ampliação do pico base (b).



Fonte: o próprio autor.

A partir do espectro de massas, duas informações devem ser verificadas para garantir a composição do complexo obtido. A primeira é o cálculo da precisão da medida utilizando como valor teórico a massa calculada para o isótopo mais abundante da molécula. Como demonstrado na **Figura 39**, esse valor foi de 0,4 ppm, um valor muito menor que o limite de 5 ppm aceito pela literatura, garantindo que a composição desse complexo é a esperada. Além disso, o segundo fator a ser verificado é a comparação da intensidade relativa e valor de m/z dos picos obtidos.

**Figura 40:** Comparação entre os picos calculados (linha verde) e obtidos (linha azul) a partir da espectrometria de massas do composto Ru-NO<sub>2</sub>.



**Fonte:** o próprio autor.

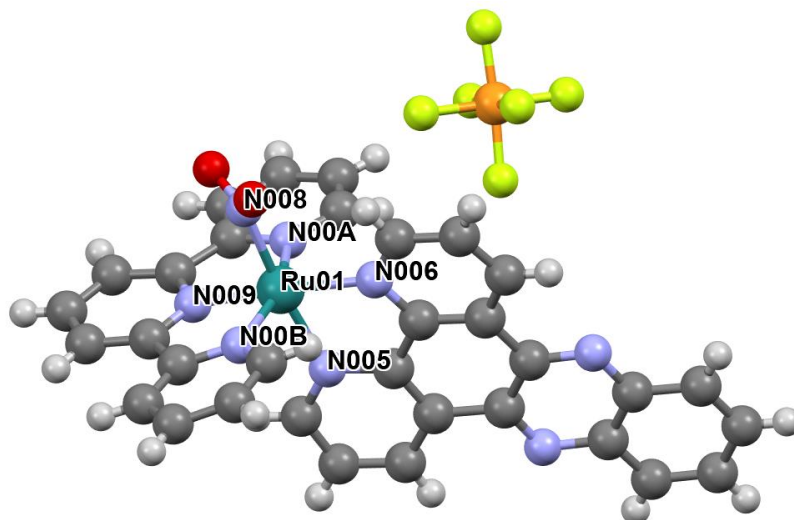
Os picos teóricos foram calculados utilizando o programa mMass (STROHALM et al., 2010) e sobrepostos com os picos obtidos experimentalmente. Como observado na **Figura 40**, o padrão dos picos se manteve exatamente igual ao esperado, indicando mais uma vez que a amostra apresenta a composição esperada.

### 2.8.2 Difração de Raios-X

Além da confirmação da fórmula molecular esperada, outro estudo importante a ser realizado para moléculas inéditas é a compreensão de sua estrutura tridimensional a partir da técnica de difração de raios-X.

Um cristal do composto Ru-NO<sub>2</sub> foi obtido da seguinte maneira: em um frasco pequeno sem tampa, foi adicionada uma quantidade de massa do composto dissolvida em ACN. Em seguida, esse frasco menor, ainda sem tampa, foi inserido em um frasco maior contendo éter, e este frasco maior foi vedado. Após 4 dias de espera, foi observada a formação do cristal no frasco menor. Esse cristal então foi levado para análise no Departamento de Química da OSU em um difratômetro Nonius Kappa APEX-II pelo técnico Dr. Curtis Moore. Após a obtenção dos dados, foi utilizado o programa Mercury (MACRAE et al., 2020) para obtenção da estrutura tridimensional do composto e verificação das distâncias e ângulos de ligação obtidos. A tabela contendo os parâmetros do cristal obtido está em **ANEXO** neste trabalho.

**Figura 41:** Estrutura tridimensional do composto Ru-NO<sub>2</sub> obtida através da difração de raios-X.



**Fonte:** o próprio autor.

Observando a estrutura tridimensional, várias informações podem ser obtidas. A primeira é que a precipitação do composto realmente ocorreu com o ânion  $\text{PF}_6^-$ , conforme esperado. Além disso, uma informação extremamente importante para o trabalho também pôde ser obtida: o isômero formado é o isômero nitro, ou seja, com o  $\text{NO}_2^-$  coordenado pelo átomo de N. A partir do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do Ru-NO<sub>2</sub>, percebe-se que não existe mistura de isômeros, e já era esperado que o isômero nitro seria o formado, visto que um centro metálico  $\text{Ru}^{\text{II}}$  tem uma maior afinidade para se coordenar ao átomo de N quando comparado ao átomo de O, de acordo com a teoria da acidez e basicidade de Pearson (TOMA, 2016). Esse isômero pôde ser confirmado a partir da estrutura tridimensional obtida. Outras informações obtidas a partir do cristal obtido são os valores das distâncias e ângulos de ligação, representados na **Tabela 8** e **Tabela 9**, respectivamente.

**Tabela 8:** Valores da distância de ligação do centro metálico para cada átomo ligante no composto Ru-NO<sub>2</sub>.

Ligação	Distância (Å)
<b>Ru01-N005 (dppz)</b>	2,081(3)
<b>Ru01-N006 (dppz)</b>	2,086(3)
<b>Ru01-N008 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	2,035(3)
<b>Ru01-N009 (tpy)</b>	1,968(3)
<b>Ru01-N00A (tpy)</b>	2,074(2)
<b>Ru01-N00B (tpy)</b>	2,072(3)

**Tabela 9:** Valores do ângulo de ligação que envolvem o átomo de Ru obtidos para o composto Ru-NO<sub>2</sub>.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Ângulo de ligação (°)
<b>N005 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N006 (dppz)</b>	<b>78,5 (1)</b>
<b>N005 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N008 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	173,9 (1)
<b>N005 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N009 (tpy)</b>	<b>98,8 (1)</b>
<b>N005 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00A (tpy)</b>	89,2 (1)
<b>N005 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00B (tpy)</b>	93,7 (1)
<b>N006 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N008 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	95,9 (1)
<b>N006 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N009 (tpy)</b>	177,0 (1)
<b>N006 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00A (tpy)</b>	<b>101,3 (1)</b>
<b>N006 (dppz)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00B (tpy)</b>	<b>99,6 (1)</b>
<b>N008 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N009 (tpy)</b>	87,0 (1)
<b>N008 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00A (tpy)</b>	89,8 (1)
<b>N008 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00B (tpy)</b>	89,4 (1)
<b>N009 (tpy)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00A (tpy)</b>	<b>79,5 (1)</b>
<b>N009 (tpy)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00B (tpy)</b>	<b>79,5 (1)</b>
<b>N00A (tpy)</b>	<b>Ru01</b>	<b>N00B (tpy)</b>	<b>159,0 (1)</b>

Observando inicialmente os valores dos ângulos de ligação, a distorção causada pelos ligantes volumosos que foi citada anteriormente no **Capítulo 1** e no item de espectroscopia de emissão deste capítulo pode ser claramente observada. No caso de um complexo octaédrico perfeito, o ângulo entre dois átomos com posição cis deve ser de 90° e 180° para átomos com posição trans, porém quando se analisa os ângulos obtidos para o complexo Ru-NO<sub>2</sub>,



especialmente quando se analisa o ângulo entre duas ligações do centro metálico para átomos diferentes do mesmo ligante, nota-se que alguns dos valores apresentam uma variação significativa de um octaedro perfeito. Os ângulos de ligação envolvendo o átomo de **Ru** e os átomos de **N** da tpy, por exemplo, apresentam os valores de  $79,5^\circ$  para posições cis e  $159^\circ$  para os dois **N** em posição trans. Esses valores elucidam a distorção de geometria causada pela tpy, gerando uma diferença de  $10,5^\circ$  do valor esperado para um octaedro perfeito, no caso das posições cis, e  $21^\circ$  de diferença no caso das posições trans. Um valor próximo também é obtido para o ângulo envolvendo os dois átomos de **N** do ligante dppz, de  $78,5^\circ$ , mostrando como ligantes volumosos realmente causam essa distorção na geometria do complexo, gerando os efeitos discutidos anteriormente (BESSAS et al., 2021; DE LIMA et al., 2017; JURIS et al., 1988).

Além dos ângulos de ligação, os valores de distância de ligação do átomo de Ru para cada átomo ligante também revelam informações sobre a força dessas ligações. Quando menor for a distância da ligação, mais forte essa ligação é. O destaque a ser feito é de que os valores das distâncias de ligação são relativamente próximos e que, portanto, as forças dessas ligações também são próximas. A ligação mais curta foi entre o átomo de **Ru** e um dos **N** da tpy, e as duas mais longas foram para os átomos de **N** da dppz. Nota-se que a distância da ligação do centro metálico com o ligante  $\text{NO}_2^-$  apresenta um valor intermediário dentre as outras ligações de coordenação nesse composto, o que indica que sua força está próxima das ligações com os ligantes polidentados. Isso significa que o ligante  $\text{NO}_2^-$  apresenta uma afinidade pelo centro metálico próxima àquela apresentada pelos outros ligantes, o que pode ser explicado pelo fato desse ligante apresentar um caráter  $\sigma$ -doador forte que estabiliza o centro metálico, conforme discutido anteriormente também neste capítulo (CONRADIE; GHOSH, 2006).

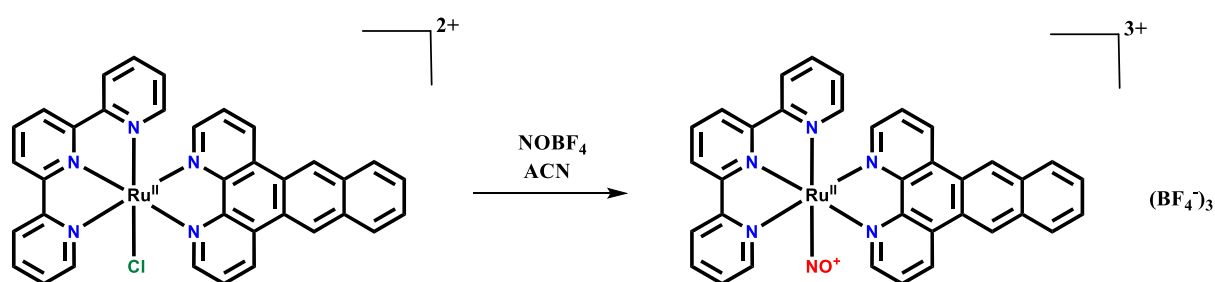
## ***CAPÍTULO 3: A INSTABILIDADE DO COMPLEXO ALVO EM SOLUÇÃO***

# 1. Resultados obtidos nas tentativas de síntese do Ru-NO

## 1.1 A instabilidade em solução devido à presença de moléculas de H<sub>2</sub>O

Como já citado anteriormente, realizou-se duas tentativas de obter o composto Ru-NO a partir de rotas sintéticas diferente e nenhuma delas foi efetiva. A primeira rota realizada foi utilizando o composto NOBF<sub>4</sub>, esperando-se que a reação ocorra conforme demonstra a **Figura 42**.

**Figura 42:** Esquema representando a reação esperada do Ru-Cl com o reagente NOBF<sub>4</sub>.



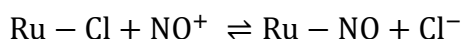
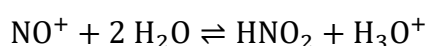
**Fonte:** o próprio autor.

Após a adição do reagente em excesso, observou-se uma mudança de coloração imediata, indo da cor violeta característica do composto Ru-Cl para uma coloração amarelada, que normalmente é observada para nitrosilos de rutênio (MERKLE; MCQUARTERS; LEHNERT, 2012; POELHSITZ et al., 2007; SILVA et al., 2018; VON POELHSITZ et al., 2005, 2007). Devido à essa observação, foi assumido que a reação havia ocorrido instantaneamente. A solução amarela formada foi gotejada em éter para forçar a precipitação do composto Ru-NO, e um sólido de coloração amarelada característica de nitrosilos foi obtido nesse processo. Contudo, quando a solução de éter foi filtrada, esse sólido amarelo claro adquiriu coloração amarelo escuro, revelando que o sólido amarelo claro só existe em solução de éter e, portanto, não pôde ser isolado.

A primeira observação desse sólido foi de que, quando solubilizado em acetonitrila, a solução resultante apresentava a mesma coloração amarela observada na síntese, porém muda de cor rapidamente mesmo quando armazenada no escuro. Nesse ponto, destaca-se que a existência da espécie Ru-NO em solução depende da presença de um excesso do íon livre NO<sup>+</sup>, visto que a formação do sólido amarelo só foi observada na síntese envolvendo excesso do sal NOBF<sub>4</sub>, enquanto a rota sintética que envolve a conversão do Ru-NO<sub>2</sub> para o Ru-NO não leva à uma solução amarelada, indicando que o composto Ru-NO não é formado a partir dessa

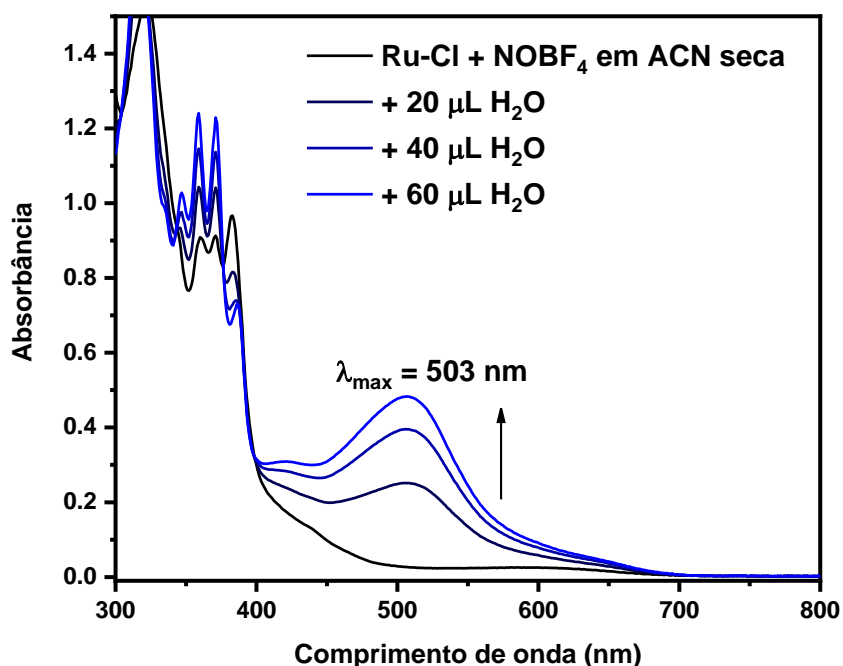
reação. Além disso, a necessidade do excesso do íon  $\text{NO}^+$  em solução para a existência do composto Ru-NO explica outras observações à cerca do sólido amarelo escuro obtido, que consiste no composto Ru-NO juntamente com impurezas (principalmente do precursor, que pode vir a precipitar junto no éter) que, devido ao seu comportamento mencionado acima, não pôde ser submetido a nenhum processo de purificação.

Voltando à observação mencionada anteriormente, uma solução do Ru-NO em ACN apresenta uma mudança espontânea de coloração do amarelo característico de nitrosilos para uma violeta que, com auxílio da espectroscopia eletrônica, foi atribuída como o precursor Ru-Cl (**Figura 43**). Essa mudança também era observada em uma solução de ACN seca, porém a coloração se mantinha por um tempo levemente maior. Essa observação levou a conclusão discutida acima, de que o Ru-NO necessita de excesso de  $\text{NO}^+$  livre no meio para existir em solução. Nesse caso, a água seria um problema para a existência desse complexo em solução, já que a espécie  $\text{NO}^+$  é altamente reativa em água formando ácido nitroso em solução, conforme ilustra a primeira reação abaixo, e essa reação poderia deslocar o equilíbrio entre o precursor Ru-Cl e o produto Ru-NO (segunda reação abaixo) no sentido dos reagentes, causando a mudança de coloração observada (CONNELLY; GEIGER, 1996; HAYTON; LEGZDINS; SHARP, 2002). Esses equilíbrios explicam o motivo da observação do sólido amarelo claro na síntese apenas quando precipitado em éter (um meio anidro), sendo que no momento da filtração, a presença de moléculas de água no ar levou à conversão de parte das moléculas de Ru-NO para Ru-Cl, gerando um sólido que apresentasse a mistura entre esses dois compostos.



Para verificar a influência da água na estabilidade do Ru-NO em solução, foi realizado um experimento simples: em uma solução de ACN previamente seca utilizando peneira molecular, o sólido de Ru-NO foi dissolvido, gerando uma solução amarelada. Foi registrado o espectro eletrônico da solução imediatamente após a dissolução do sólido e após três adições sucessivas de 20 $\mu\text{L}$  de água deionizada, sem nenhum tempo adicional.

**Figura 43:** Espectros eletrônicos da mistura Ru-Cl e NOBF<sub>4</sub> em acetonitrila seca após sucessivas adições de água deionizada.



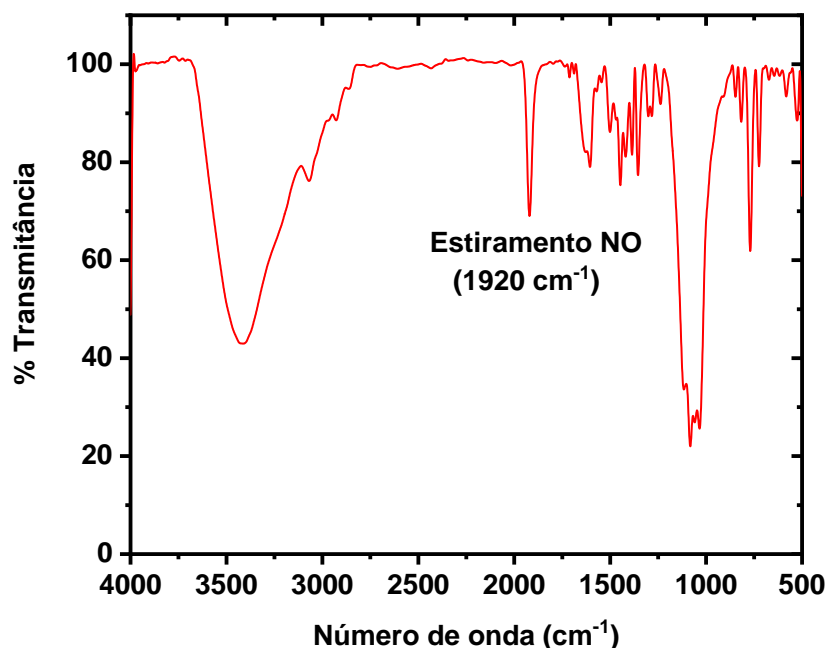
Fonte: o próprio autor.

Como observado nos espectros eletrônicos, a adição da água realmente desloca o equilíbrio para a formação do composto Ru-Cl, visto que o espectro eletrônico obtido após essas adições se assemelha ao espectro eletrônico apresentado na **Figura 26**. Destaca-se aqui que esse mesmo comportamento é observado mesmo sem a adição de H<sub>2</sub>O, porém leva um pouco mais de tempo. Isso ocorre, como destacado anteriormente, devido à presença das poucas moléculas de água presente no solvente e até na umidade do ar, o que mostra que o equilíbrio realmente é muito deslocado para a formação do Ru-Cl, o primeiro indício de que o Ru-NO apresenta uma alta instabilidade termodinâmica.

## 1.2 Espectroscopia vibracional e a ligação Ru(II)-NO<sup>+</sup>

Dada a instabilidade da solução do sólido obtido na síntese, a única maneira de obter informações a respeito desse sólido de maneira confiável é utilizando técnicas que não necessitem de uma solução. Naturalmente, a espectroscopia vibracional, realizada utilizando pastilhas de KBr é uma ótima escolha para esse caso. Foi registrado o espectro vibracional do sólido Ru-NO em uma pastilha com 200 mg de KBr (grau espectroscópico) e 2 mg do composto.

**Figura 44:** Espectro vibracional do sólido obtido a partir da reação do Ru-Cl com NOBF<sub>4</sub> em pastilha de KBr.



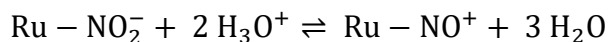
Fonte: o próprio autor.

Comparando-se com os espectros vibracionais obtidos para os outros compostos, o surgimento de um novo estiramento em 1920 cm<sup>-1</sup> sugere a coordenação do NO ao complexo, visto que é a única alteração relevante no espectro (com exceção da alteração da banda em 845 cm<sup>-1</sup> referente ao contra-íon PF<sub>6</sub><sup>-</sup> para uma banda em 1082 cm<sup>-1</sup> referente ao novo contra-íon, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>) e que está em uma região característica desse tipo de estiramento em complexos de coordenação (GIRI et al., 2020a, 2020b). Com essa informação, é possível confirmar a existência da espécie Ru-NO em fase sólida.

### 1.3 Uma rota alternativa para a síntese do Ru-NO

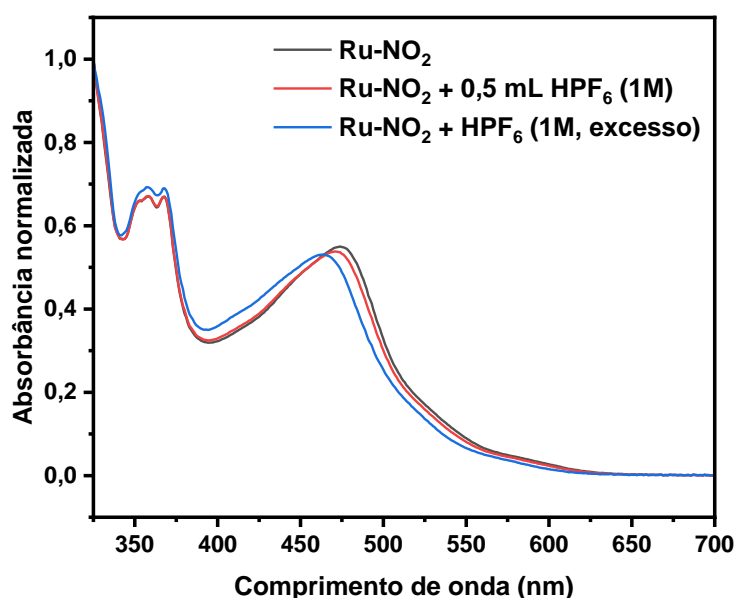
A partir das observações citadas nos itens anteriores, concluiu-se que a rota sintética utilizando o sal NOBF<sub>4</sub> não resultaria em um sólido capaz de ser purificado ou analisado por quaisquer técnicas que envolvessem a necessidade de uma solução. Por isso, como uma alternativa para a síntese do Ru-NO, uma rota mais clássica da literatura foi escolhida, utilizando o reagente NaNO<sub>2</sub> seguido de uma redução utilizando HPF<sub>6</sub>, como detalhado no item 1.2.5 do **Capítulo 2** (GODWIN; MEYER, 1971a).

O reagente  $\text{NaNO}_2$  é utilizado para a coordenação do íon  $\text{NO}_2^-$  no complexo, de maneira que após coordenado, esse ligante reage com íons hidrônio para formar  $\text{NO}^+$  a partir do abaixamento do pH da solução com o uso do  $\text{HPF}_6$  (ROSE; MASCHARAK, 2008).



Visto que a conversão do  $\text{NO}_2^-$  para  $\text{NO}^+$  consome íons hidrônio, essa reação é favorecida em meio ácido, onde os íons hidrônio estão presentes em maior quantidade, deslocando o equilíbrio para a formação do  $\text{NO}^+$ . No entanto, a tentativa da síntese do Ru-NO utilizando esse método não foi bem-sucedida, pois após a coordenação do íon  $\text{NO}_2^-$ , a adição de  $\text{HPF}_6$  nas quantidades descritas na rota sintética não causaram nenhuma alteração no espectro eletrônico, indicando que a espécie se manteve com o íon  $\text{NO}_2^-$  coordenado. O mesmo ocorreu após a adição de ainda mais  $\text{HPF}_6$ , indicando que a espécie Ru- $\text{NO}_2^-$  não se converte para a espécie Ru-NO mesmo com adição de ácido em excesso (**Figura 45**). O leve deslocamento observado no máximo da banda MLCT se deve ao efeito solvatocrômico, visto que o  $\text{HPF}_6$  é armazenado em uma solução aquosa (esse efeito será discutido no **Capítulo 4**). Após todas essas observações, a conclusão obtida foi de que o composto Ru-NO é uma espécie termodinamicamente instável. Visando explicar essa instabilidade, o próximo passo do trabalho foi realizar experimentos e pesquisar informações na literatura que possam explicar o motivo dessa alta instabilidade do composto alvo deste trabalho.

**Figura 45:** Acompanhamento espectrofotométrico da reatividade do composto Ru- $\text{NO}_2$  com  $\text{HPF}_6$ .



Fonte: o próprio autor.

## 2. A densidade eletrônica do centro metálico

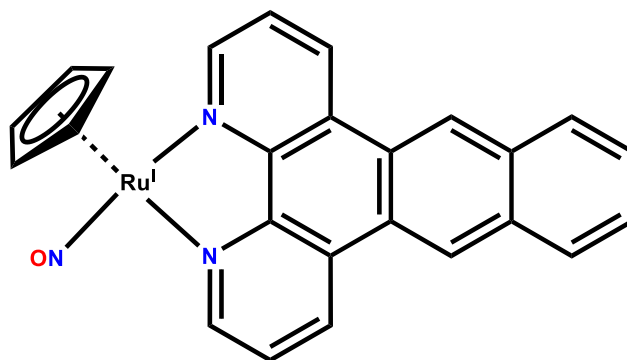
Após uma pesquisa bibliográfica e alguns experimentos realizados, foi concluído que o principal problema do composto Ru-NO é uma baixa densidade eletrônica de seu centro metálico. Isso pode ser explicado com base na natureza dos ligantes juntamente com o efeito quelato, apresentado no item 2.2 do **Capítulo 2**.

Observando a estrutura dos ligantes, conclui-se que todos são  $\pi$ -aceptores, pois apresentam orbitais  $\pi$  antiligantes vazios que interagem com o centro metálico e, portanto, retiram densidade eletrônica do metal. Sendo assim, a coordenação de um ligante que é fortemente  $\pi$ -aceptor, como o  $\text{NO}^+$ , se torna termodinamicamente desfavorável, visto que causaria uma deficiência eletrônica muito elevada no metal, aumentando severamente a energia do complexo como um todo e, por consequência, tornando-o instável. Sendo assim, caso ocorra a coordenação do ligante  $\text{NO}^+$ , visto que este não apresenta nenhum efeito quelato que estabilize o sistema como um todo, ocorre também a saída do ligante devido à alta energia que o complexo como um todo apresenta. Essa hipótese foi comprovada baseando-se tanto em dados da literatura quanto nos experimentos realizados.

### 2.1 Informações da literatura a respeito do problema encontrado

O primeiro passo foi realizar uma pesquisa bibliográfica com o intuito de encontrar informações a respeito desse tipo de sistema ou de problemas parecidos. A primeira observação é a falta da descrição de compostos que apresentem o ligante dppz e o NO coordenados ao mesmo centro metálico. Na pesquisa realizada, o único composto observado que apresenta essa combinação foi descrito por Schoch et al. (SCHOCH et al., 1996), representado na **Figura 46**.

**Figura 46:** Representação do composto estudado por Schoch et al.



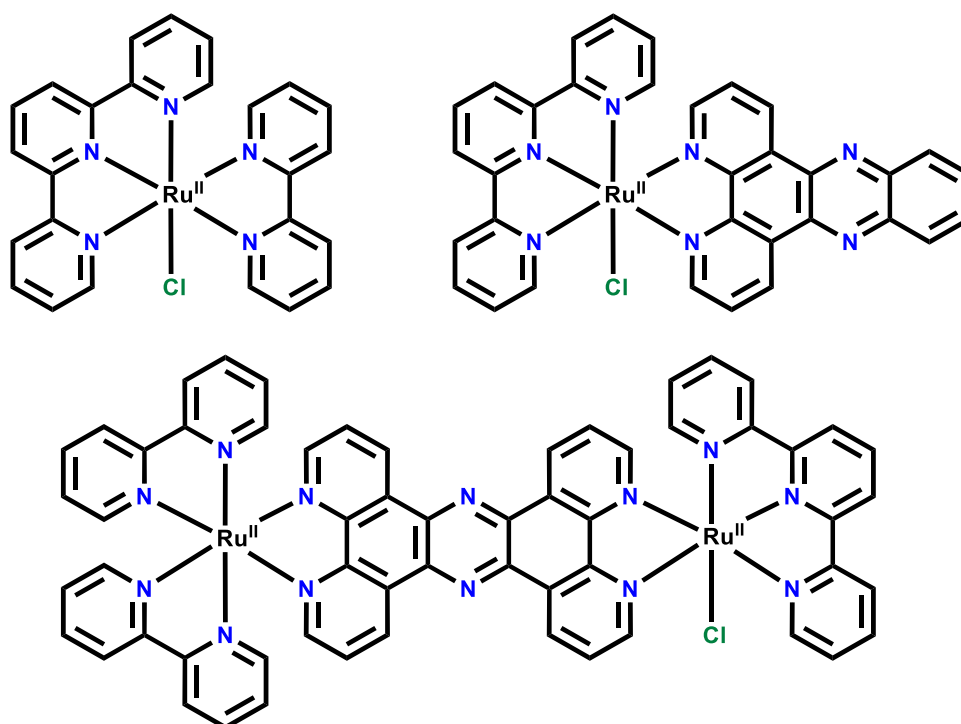
Fonte: o próprio autor.



O destaque para esse composto é de que ele apresenta apenas 4 sítios de coordenação, sendo que um de seus ligantes é um anel ciclopentadienil coordenado pelo anel. Essa coordenação é possível de ocorrer apenas para centros metálicos com uma alta densidade eletrônica (como é o caso, visto que o Ru apresenta NOX 1+), caracterizando o composto como um organometálico. Essa primeira observação é um passo adiante para a confirmação da hipótese levantada, visto que a combinação dos ligantes dppz e NO foi descrita apenas para um composto com uma maior densidade eletrônica concentrada no centro metálico.

Além desse estudo, outra publicação recente que apresentou um resultado que corrobora com a hipótese da densidade eletrônica consiste na avaliação da influência da extensão da  $\pi$ -conjugação dos ligantes na estabilidade do ligante monodentado  $\text{Cl}^-$  em uma série de compostos (AMTHOR et al., 2021).

**Figura 47:** Estrutura de alguns compostos estudados por Amthor et al.



Fonte: o próprio autor.

Um dos compostos estudados nesse trabalho foi justamente o composto Ru-Cl, o que ajuda ainda mais no entendimento desse sistema. Amthor et al. utilizaram espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN para estudar a cinética da troca do ligante  $\text{Cl}^-$  por  $\text{D}_2\text{O}$  e determinaram que um aumento na conjugação  $\pi$  do ligante faz com que a troca do ligante ocorra de maneira mais

lenta. Após o cálculo da constante de equilíbrio da troca desse ligante a partir dos experimentos, foi observado pelos autores que o aumento da conjugação  $\pi$  de um dos ligantes estabiliza o complexo. Apesar de não ser evidenciado dessa maneira no trabalho, esse fato pode ser racionalizado com o fato do ligante  $\text{Cl}^-$  ser um ligante  $\pi$ -doador. Observando os sistemas estudados, tem-se que um aumento na conjugação  $\pi$  de um ligante acaba tornando-o mais  $\pi$ -aceptor, retirando mais densidade do centro metálico. Por ser um ligante  $\pi$ -doador, o  $\text{Cl}^-$  estabiliza esse tipo de sistema pois doa densidade eletrônica para o centro metálico, compensando o efeito retirador de elétrons dos outros ligantes e reduzindo a energia do sistema como um todo, tornando-o mais estável.

O motivo para ligantes com uma maior conjugação  $\pi$  serem mais  $\pi$ -aceptores está no comportamento dos orbitais moleculares de uma molécula orgânica conjugada frente ao aumento de sua conjugação. Uma maneira de compreender os orbitais dessas moléculas é utilizando a aproximação de Hückel. Essa aproximação diz que, como as propriedades de simetria das ligações  $\sigma$  e  $\pi$ , o Hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) do sistema pode ser aproximado como a soma entre um Hamiltoniano das ligações  $\sigma$  e outro das ligações  $\pi$ .

$$\hat{H} = \hat{H}_{\sigma} + \hat{H}_{\pi} \quad \text{Equação XIV}$$

A interpretação dessa aproximação é que os principais responsáveis pelas propriedades químicas de sistemas conjugados são os orbitais  $\pi$ , visto que as energias dos orbitais  $\pi$  ligantes são maiores que as dos  $\sigma$  ligantes e as energias dos orbitais  $\pi$  antiligantes apresentam energia menor do que os  $\sigma$  antiligantes. Sendo assim, apenas os orbitais  $\pi$  são tratados explicitamente. A aproximação também diz que a integral de sobreposição ( $S_{ij}$ ) entre dois orbitais  $2p_z$  é 1 para orbitais iguais e 0 para orbitais diferentes e que a integral  $H_{ij}$  tem o valor  $\alpha$  para o mesmo carbono,  $\beta$  para carbonos vizinhos e 0 para quaisquer outras combinações de carbonos (DONALD A. MCQUARRIE; JOHN D. SIMON, 1997). Para exemplificar, o determinante de Slater para o eteno pode ser escrito como:

$$\begin{vmatrix} \alpha - E & \beta \\ \beta & \alpha - E \end{vmatrix} = 0$$

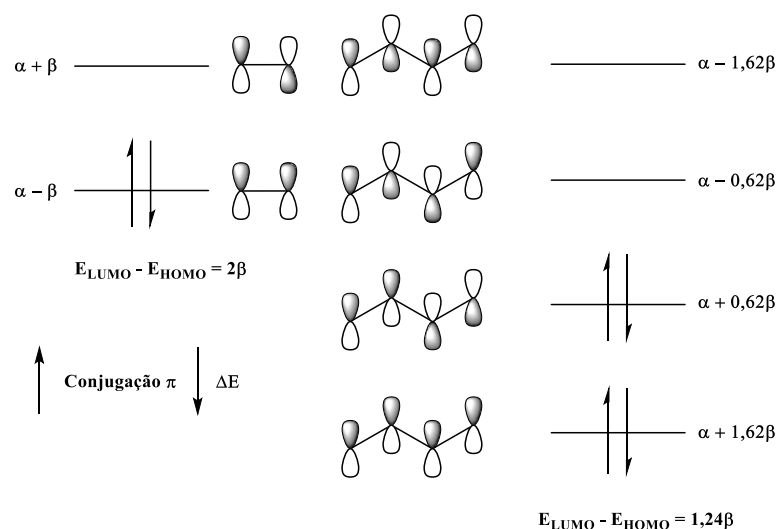
Para o butadieno:

$$\begin{vmatrix} \alpha - E & \beta & 0 & 0 \\ \beta & \alpha - E & \beta & 0 \\ 0 & \beta & \alpha - E & \beta \\ 0 & 0 & \beta & \alpha - E \end{vmatrix} = 0$$

Resolvendo ambos os determinantes, obtém-se a energia para os orbitais dessas duas moléculas pela aproximação de Hückel. A **Figura 48** ilustra esses orbitais para as duas moléculas.

Uma das consequências da aproximação de Hückel, como observado na figura, é de que o aumento da conjugação  $\pi$  do sistema resulta em uma diminuição na diferença de energia entre o nível desocupado de menor energia (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO*) e o nível ocupado de maior energia (*Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO*), ou seja, a energia dos orbitais  $\pi$  antiligantes abaixa e a dos orbitais  $\pi$  ligantes aumenta (DONALD A. MCQUARRIE; JOHN D. SIMON, 1997; JONATHAN CLAYDEN; NICK GREEVES; STUART WARREN, 2012).

**Figura 48:** Representação dos orbitais moleculares do eteno e do butadieno pela aproximação de Hückel.



**Fonte:** o próprio autor.

A primeira metade dessa conclusão é de extrema importância para compreender o resultado obtido por Amthor et al. Seguindo essa lógica, um ligante com uma maior conjugação  $\pi$  em sua estrutura irá apresentar orbitais  $\pi$  antiligantes de menor energia, se aproximando, portanto, da energia dos orbitais d preenchidos do metal e tornando a interação mais forte. Na

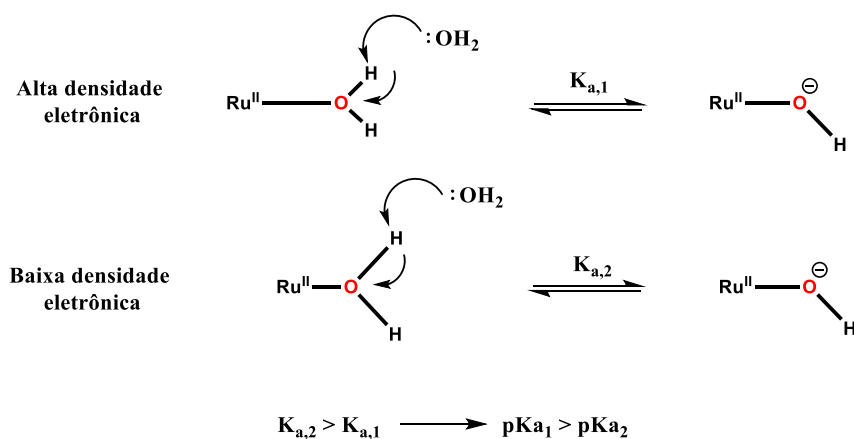
prática, essa interação significa que haverá uma maior doação de densidade eletrônica por parte do metal para o ligante, aumentando assim o caráter  $\pi$ -ácido deste último. Essa doação irá diminuir consideravelmente a densidade eletrônica do centro metálico e, por consequência, a introdução de um ligante  $\pi$ -doador como o  $\text{Cl}^-$  irá estabilizar esse centro metálico, resultando no efeito observado. O mesmo raciocínio é válido para a introdução de um ligante  $\pi$ -aceptor, porém, nesse caso a entrada do ligante será desfavorecida devida à baixa densidade eletrônica do centro metálico.

A partir dessas informações obtidas na literatura, a hipótese da densidade eletrônica se provou uma explicação válida para a instabilidade do complexo Ru-NO em solução. No entanto, mais experimentos foram realizados para confirmar se realmente o composto apresentaria uma densidade eletrônica reduzida no centro metálico.

## 2.2 Determinação do pKa do Ru-H<sub>2</sub>O

Uma forma indireta de determinar variações na densidade eletrônica do centro metálico é através da determinação do pKa de um de seus ligantes. Neste trabalho, o composto Ru-H<sub>2</sub>O foi sintetizado com a finalidade da determinação de seu pKa. Utilizando como referência o trabalho de Wasylenko et al. (WASYLENKO et al., 2010), um experimento foi planejado para determinação do pKa do Ru-H<sub>2</sub>O. Essa é uma maneira de determinar indiretamente alterações na densidade eletrônica do centro metálico devido à força relativa da ligação entre o centro metálico e o oxigênio da H<sub>2</sub>O coordenada.

**Figura 49:** Esquema demonstrando a relação entre a densidade eletrônica do centro metálico com o pKa da H<sub>2</sub>O coordenada.

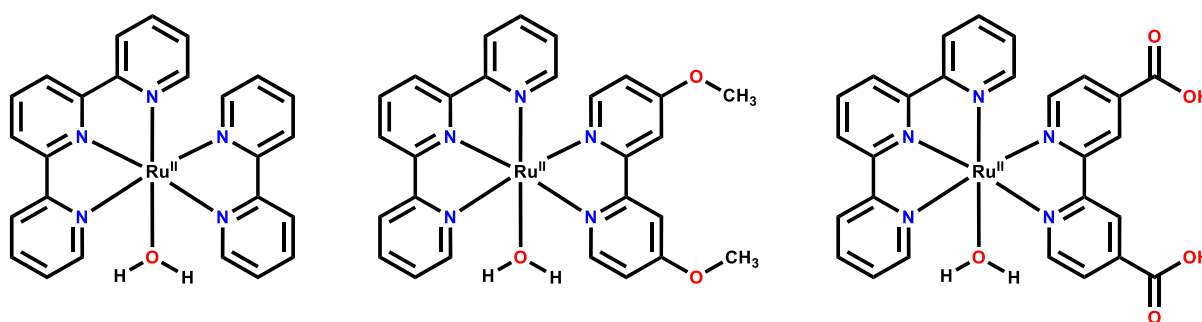


**Fonte:** o próprio autor.

De maneira simplificada, pode-se considerar a coordenação de uma ligante ao centro metálico como uma reação ácido-base de Lewis, na qual o par de elétrons do ligante ataca o centro metálico, formando a ligação (TOMA, 2016). Sendo assim, quanto menor for a densidade eletrônica do centro metálico, mais forte ele será como um ácido de Lewis, maior será a constante de formação da ligação e mais curta essa ligação será. Por consequência, a nuvem eletrônica do átomo de O é mais deslocada para o centro metálico, enfraquecendo assim as ligações O-H e tornando esses hidrogênios mais ácidos.

Partindo desse pressuposto, o trabalho de Wasylenko et al. mediu o pKa da molécula de água coordenada em três compostos de coordenação, representados na **Figura 50**.

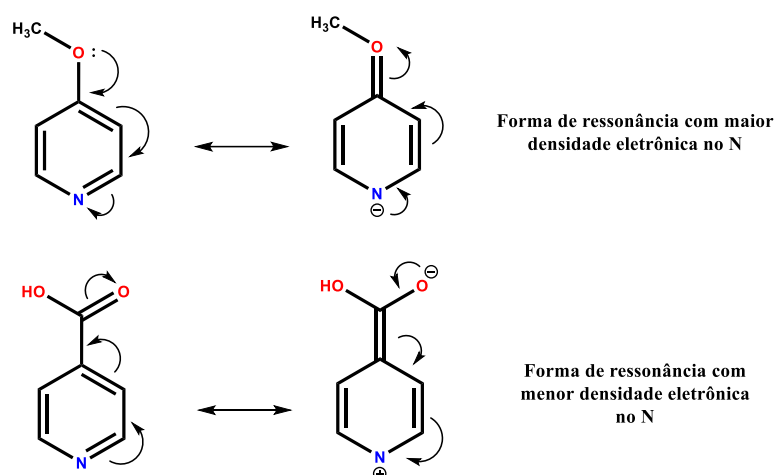
**Figura 50:** Estruturas dos compostos estudados por Wasylenko et al.



**Fonte:** o próprio autor.

A escolha das estrutura foi feita com base nos efeitos mesoméricos dos substituintes, visando um sistema com substituintes doadores de densidade de eletrônica (grupos metoxila) e um sistema com substituintes retiradores de densidade eletrônica (grupos carboxila). Esses efeitos são descritos na **Figura 51**. Um efeito mesomérico doador de densidade eletrônica faz com que uma das formas de ressonância apresenta uma carga negativa no átomo de N, enquanto um efeito retirador cria uma forma de ressonância com uma carga positiva no átomo de N. Quando carregado negativamente, do ponto de vista da coordenação no centro metálico, o átomo de N se torna uma base de Lewis mais efetiva, e o inverso é verdadeiro quando apresenta uma carga positiva.

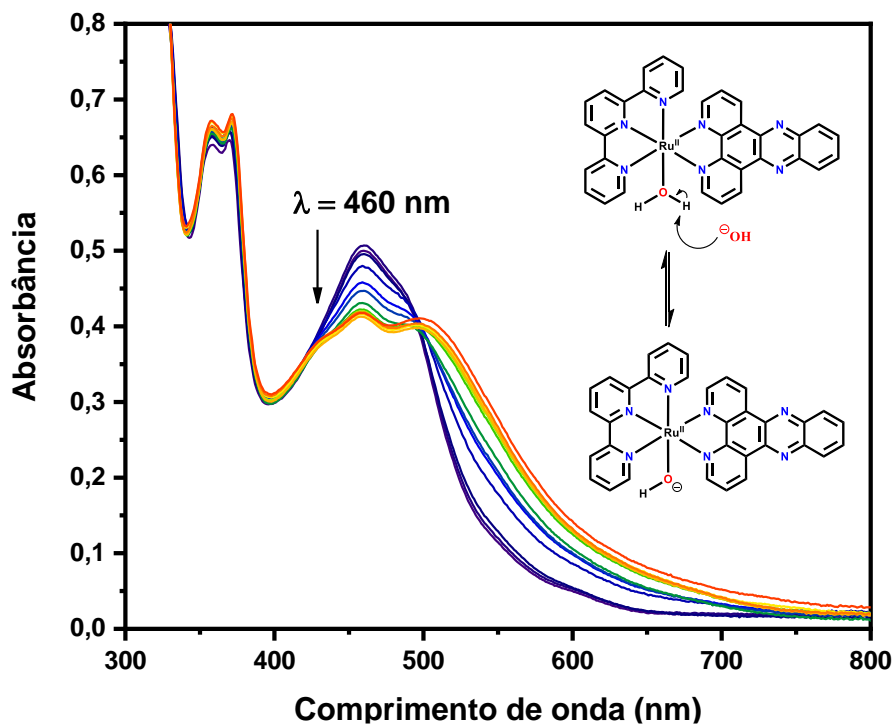
**Figura 51:** Formas de ressonância mostrando o caráter doador e retirador de densidade eletrônica dos ligantes metoxila e carboxila, respectivamente.



Fonte: o próprio autor.

O experimento de determinação do pKa dos compostos do trabalho consiste basicamente no registro do espectro eletrônico de uma solução 10  $\mu\text{M}$  de cada composto em diversos valores de pH, monitorando a absorção em um comprimento de onda específico. Foi realizado o mesmo experimento para o composto Ru-H<sub>2</sub>O.

**Figura 52:** Espectros eletrônicos de uma solução do complexo Ru-H<sub>2</sub>O (10 $\mu\text{M}$ ) com o aumento do pH.



Fonte: o próprio autor.

Com esse experimento, é possível determinar o pKa do composto utilizando alguns conceitos básicos de equilíbrio químico e a equação de Henderson-Hasselbalch (SKOOG et al., 2008):

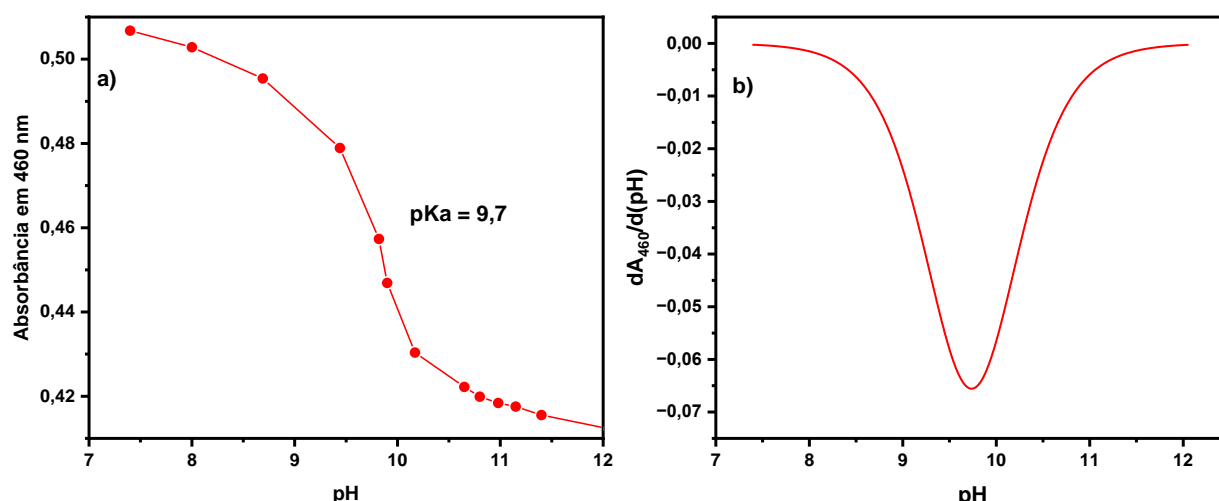
$$pH = pKa + \log \frac{[B^-]}{[HB]} \quad \text{Equação XV}$$

Onde HB é o ácido a ser dissociado e B<sup>-</sup> a base conjugada desse ácido. Tem-se que, exatamente no ponto de equilíbrio entre HB e B<sup>-</sup>, suas concentrações são iguais, e:

$$pH = pKa + \log 1 \rightarrow pH = pKa \quad \text{Equação XVI}$$

Dessa maneira, a determinação do pKa é feita analisando o pH no ponto de inflexão de uma curva sigmoide representando a queda na absorção no comprimento de onda máximo da espécie Ru-H<sub>2</sub>O. Essa curva e o valor do ponto de inflexão, calculado a partir da primeira derivada da curva obtida, estão representados na **Figura 53**.

**Figura 53:** Curva obtida após a titulação espectrofotométrica do Ru-H<sub>2</sub>O (a) e sua primeira derivada utilizada para o cálculo do pKa (b).



Fonte: o próprio autor.

Para efeitos de comparação, a tabela reúne os valores encontrados para todos os complexos estudados por Wasylenko et al. juntamente com o Ru-H<sub>2</sub>O.

**Tabela 10:** Valores de pKa para os complexos estudados por Wasylenko et al. em comparação com o complexo Ru-H<sub>2</sub>O.

Composto	pKa	K <sub>a</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )
[Ru(tpy)(bpy)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2+</sup>	10,5 <sup>a</sup>	3,2.10 <sup>-11</sup>
[Ru(tpy)(bpy-OMe)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2+</sup>	11,2 <sup>a</sup>	6,3.10 <sup>-12</sup>
[Ru(tpy)(bpy-CO <sub>2</sub> H)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2+</sup>	10,4 <sup>a</sup>	4,0.10 <sup>-11</sup>
[Ru(tpy)(dppz)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2+</sup>	9,7	2,0.10 <sup>-10</sup>

<sup>a</sup>(WASYLENKO et al., 2010).

Comparando os valores de pKa com as estruturas, o efeito já esperado é obtido. A introdução do grupo metoxila no ligante bpy aumenta o pKa da molécula de água coordenada, indicando que realmente houve um aumento na densidade eletrônica do centro metálico. Analogamente, a introdução do grupo carboxila reduz de maneira pouco acentuada o pKa, porém a redução ocorre devido ao efeito retirador do elétrons desse substituinte. Destaca-se aqui a dimensão desses valores: visto que o pKa é uma escala logarítmica, essas alterações que a primeira vista parecem pouco significativas, quando convertidos para constantes de acidez, apresentam uma variação considerável para uma mudança sutil na estrutura do complexo como um todo. Dito isso, a presença do ligante dppz faz com que o pKa dessa água apresente um valor de 9,7, refletindo em uma constante de acidez 10 vezes maior do que o composto [Ru(tpy)(bpy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, indicando que a coordenação desse ligante realmente apresenta um efeito π-ácido acentuado, conforme o esperado.

### 2.3 O teste de Griess

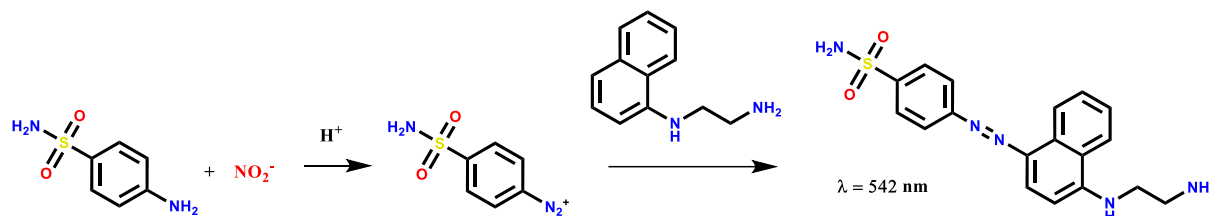
Com as informações obtidas na literatura e o experimento de determinação do pKa, fica claro que o centro metálico apresenta uma baixa densidade eletrônica nos complexos estudados neste trabalho. No entanto, uma dúvida levantada foi se o problema encontrado para o composto Ru-NO apresenta natureza termodinâmica ou cinética. Sendo assim, um último experimento foi realizado para verificar esse aspecto.

O teste de Griess é um experimento de detecção colorimétrica de íons NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em solução, realizada através da formação de um diazocomposto que apresenta uma absorção intensa em



540 nm em uma faixa de pH de 2,0 a 2,5, devido á reação de sulfanilamida com os íons  $\text{NO}_2^-$  em meio ácido (**Figura 54**) (MOORCROFT, 2001).

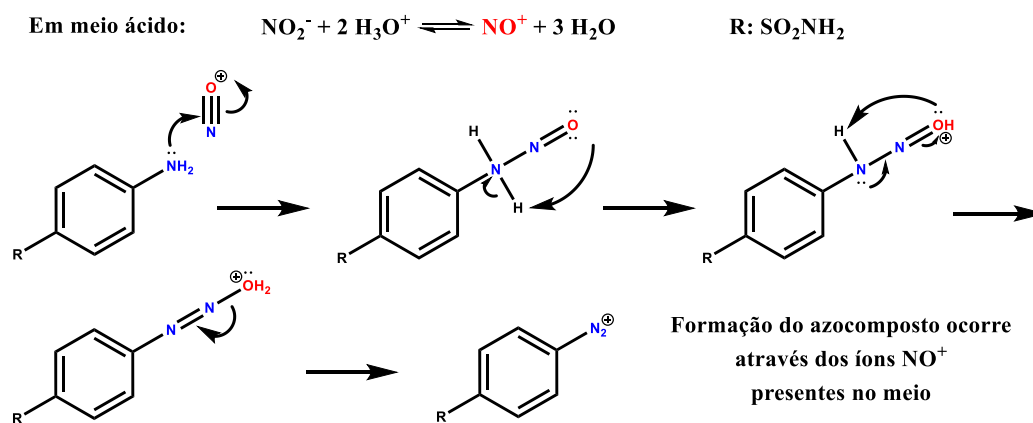
**Figura 54:** Esquema representando as reações químicas envolvidas no teste de Griess.



Fonte: o próprio autor.

No contexto deste trabalho, é necessária a apresentação do mecanismo da reação de formação do diazocomposto para um melhor entendimento das espécies envolvidas, conforme ilustra a **Figura 55**.

**Figura 55:** Mecanismo de formação do azocomposto responsável por reagir com os íons  $\text{NO}_2^-$  no teste de Griess.



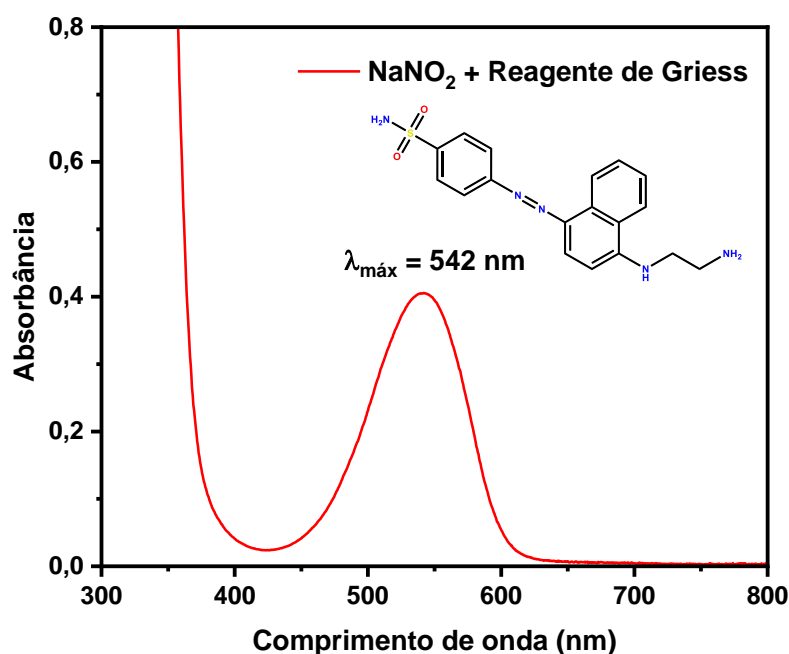
Fonte: o próprio autor.

Analisando o mecanismo, fica evidente que o teste de Griess é uma forma de confirmar se a espécie  $\text{Ru-NO}$  é termodinamicamente instável ou se o ligante  $\text{NO}^+$  é lábil. Em meio ácido, os íons  $\text{NO}_2^-$  existem como  $\text{NO}^+$ , revelando que, apesar do teste de Griess ser utilizado como um método de detecção de íons  $\text{NO}_2^-$ , o que ele realmente detecta são íons  $\text{NO}^+$  em solução. Sabendo disso, no caso do complexo  $\text{Ru-NO}$  ser termodinamicamente instável, a conversão  $\text{Ru-NO}_2 \rightarrow \text{Ru-NO}$  não ocorreria mesmo no meio ácido e o teste apresentaria um resultado negativo, visto que o ligante  $\text{NO}_2^-$  também não é lábil sem a ação da luz (BARBOSA et al., 2017; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2023a). Já no caso da formação do  $\text{Ru-NO}$  ocorrer

e o ligante  $\text{NO}^+$  ser lábil, isso promoveria um resultado positivo no teste de Griess, devido à presença de íons  $\text{NO}^+$  em solução.

O preparo do reagente de Griess foi realizado adicionando 1 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% em 8 mL de água destilada. A essa solução foram adicionados 100 mg de sulfanilamida e 10 mg de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina. O volume foi completado para 10 mL e estocado em um frasco âmbar no refrigerador. A detecção dos íons nitrito é realizada misturando 1 mL da solução reagente com 1 mL da amostra a ser analisada sob agitação. Para efeitos de comparação, o teste foi realizado também utilizando uma solução de  $\text{NaNO}_2$  como um controle positivo.

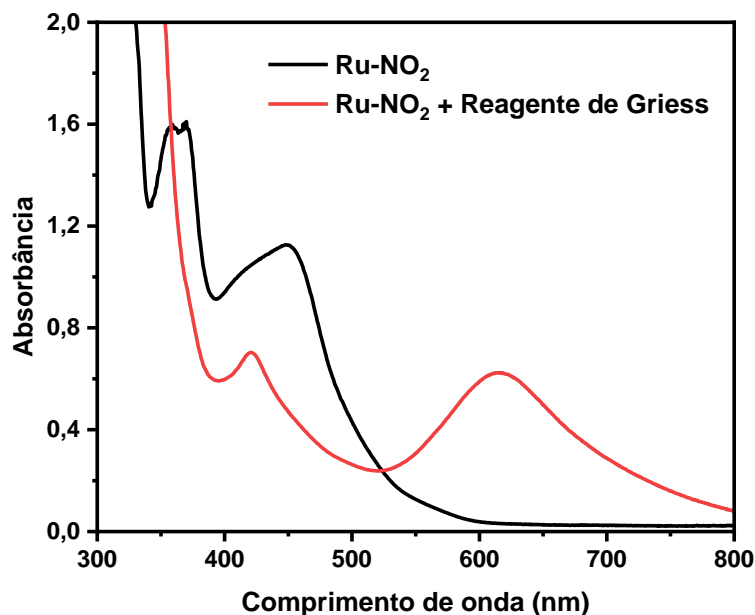
**Figura 56:** Espectro eletrônico do produto formado no controle positivo do teste de Griess.



Fonte: o próprio autor.

Após verificar a formação do produto no controle positivo, o mesmo teste foi realizado com o composto Ru- $\text{NO}_2$ .

**Figura 57:** Espectros eletrônicos referentes ao teste de Griess realizado com o composto Ru-NO<sub>2</sub>.



**Fonte:** o próprio autor.

Como observado na **Figura 57**, a adição de uma solução do complexo Ru-NO<sub>2</sub> ao reagente de Griess não formou o diazocomposto esperado, devido à ausência da banda observada na **Figura 56**, mostrando que mesmo nesse pH ácido, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> continua coordenado ao complexo. A alteração das bandas observadas no espectro se deve basicamente à protonação do ligante dppz, devido ao pH ácido do meio (MCGOVERN et al., 2005). Levando em conta o raciocínio discutido anteriormente, conclui-se então que a espécie Ru-NO é termodinamicamente instável devido à baixa densidade eletrônica do centro metálico.

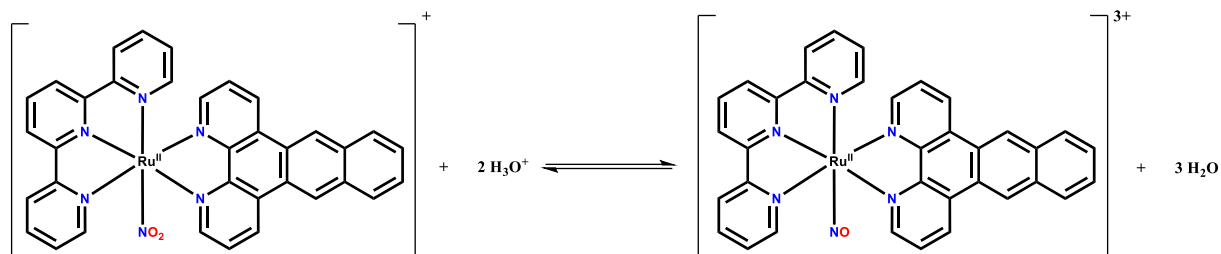
Com os experimentos realizados nesse item, conclui-se que o composto Ru-NO<sub>2</sub> é a espécie que existe mesmo em meios mais ácidos, tornando a aplicação biológica do Ru-NO inviável.

## 2.4 Modelagem Molecular

Por fim, outra maneira de comprovar a instabilidade do complexo Ru-NO, quando aliada aos experimentos já realizados, é a modelagem molecular. Os cálculos foram realizados utilizando o programa ORCA (NEESE, 2018), com o método B97 (BECKE, 1997) e utilizando as bases def2-SVP e def2-TZVP (WEIGEND; AHLRICHS, 2005). Os cálculos foram realizados levando em conta o equilíbrio Ru-NO<sub>2</sub> ⇌ Ru-NO em fase gasosa e utilizando o método CPCM (BARONE; COSSI, 1998) para o equilíbrio em acetonitrila. Foram realizados

cálculos de otimização de geometria e de frequência vibracional para todas as moléculas envolvidas no equilíbrio, de maneira que a constante de equilíbrio foi calculada a partir da variação de energia livre da reação ( $\Delta G$ ) obtida através dos cálculos.

**Figura 58:** Esquema mostrando o equilíbrio  $\text{Ru-NO}_2 \rightleftharpoons \text{Ru-NO}$  cuja constante foi calculada *in silico*.



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 11:** Valores de  $\Delta G$  e  $K_{\text{eq}}$  calculados *in silico* para o equilíbrio  $\text{Ru-NO}_2 \rightleftharpoons \text{Ru-NO}$ .

Método e Base Utilizados	$\Delta G$ (kJ/mol)	$K_{\text{eq}}$ ( $\text{M}^{-1}$ )
<b>B97 e def2-SVP</b>	2301,30	~ 0
<b>B97 e def2-TZVP em ACN (CPCM)</b>	103,34	$7,85 \cdot 10^{-19}$

Observando os valores da **Tabela 11**, percebe-se que o complexo Ru-NO é realmente termodinamicamente instável, o que é refletido nos valores muito pequenos nas constantes de equilíbrio calculadas. Em fase gasosa, a constante calculada foi aproximadamente 0, pois além da justificativa da densidade eletrônica discutida anteriormente, o composto Ru-NO apresenta uma carga 3+, uma espécie que, em fase gasosa, apresenta uma energia muito alta devido à falta de moléculas de solvente para estabilização da carga. Quando o cálculo é realizado levando em conta o solvente ACN, o valor da constante de equilíbrio continua muito baixo, indicando que o equilíbrio está totalmente deslocado para o composto Ru-NO<sub>2</sub>, porém ainda é maior do que em fase gasosa devido à estabilização de cargas proporcionada pelo solvente.

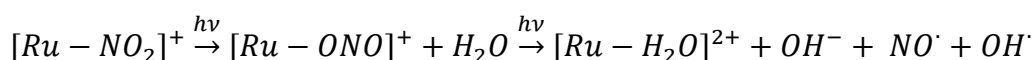
Por fim, destaca-se que cálculos mais refinados podem e serão realizados para determinação da densidade eletrônica ao redor da ligação Ru-NO<sub>2</sub> e Ru-NO, podendo confirmar a hipótese da densidade eletrônica também de maneira *in silico* para explicar a instabilidade do complexo Ru-NO.

### 3. O complexo Ru-NO<sub>2</sub> como um novo candidato à metalofármaco

Após os resultados obtidos e discutidos nesse capítulo, fica claro que o estudo do composto Ru-NO para as finalidades propostas nesse trabalho se torna inviável dada sua instabilidade em solução. No entanto, ainda é possível dar seguimento ao trabalho estudando o complexo Ru-NO<sub>2</sub> como um substituto viável para o Ru-NO.

A presença dos ligantes tpy e dppz garante que as mesmas propriedades pretendidas para o composto Ru-NO podem ser mantidas e o composto Ru-NO<sub>2</sub> continua um candidato a fotossensibilizador e intercalador de DNA. Tendo em vista que este projeto foi planejado para o desenvolvimento de uma nova NORM, essa troca pode parecer pouco promissora. No entanto, existem algumas vantagens de trabalhar com o composto Ru-NO<sub>2</sub> em relação ao Ru-NO.

O primeiro e mais importante destaque a ser feito é de que nitritos de rutênio também já são estudados como candidatos a photoNORMs. Existem trabalhos mostrando que esse tipo de composto pode sim liberar NO quando irradiado com luz a partir de um mecanismo específico que envolve a isomerização do ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> seguido de sua quebra e liberação do radical NO em solução. A motivação para o estudo desse tipo de composto ao invés de nitrosilos de rutênio é o simples fato de que, em pH fisiológico, muitas espécies apresentam o equilíbrio deslocado para a formação da espécie que apresenta o ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em sua estrutura (DA SILVA et al., 2020c; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2023b).



Sendo assim, a fotoliberação ainda é possível para o composto Ru-NO<sub>2</sub>, o que faz com que o complexo mantenha as propriedades desejadas anteriormente.

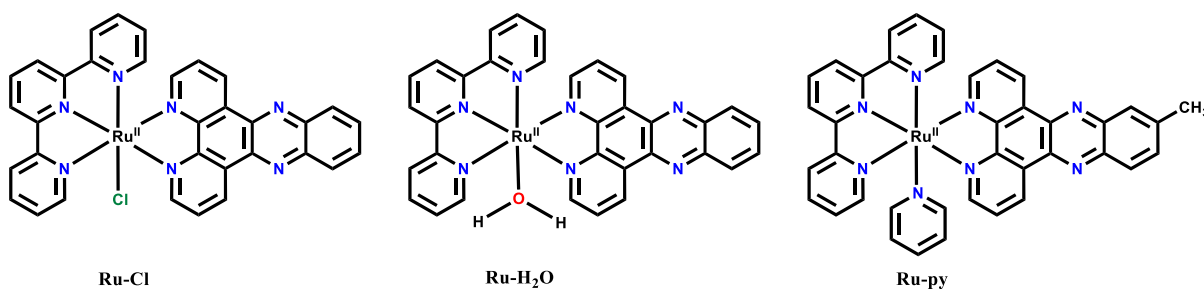
Levando em conta que, como apresentado no item 1.4 do **Capítulo 1**, a ação do NO no organismo é benéfica apenas até determinada concentração, a utilização de um composto que apresenta o ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pode ser algo vantajoso do ponto de vista dessa aplicação. Espera-se que o rendimento quântico de liberação do NO de um nitrosilo de rutênio seja maior do que de um nitrito de rutênio, justamente pelo fato do nitrito de rutênio necessitar de uma reação envolvendo mais etapas para liberação dessa molécula. Dessa maneira, nitritos de rutênio podem apresentar um rendimento quântico de liberação de NO menor e, por consequência, fazer com que a concentração dessa molécula no organismo permaneça em concentrações terapêuticas, sem causar danos por excesso.

Sabendo disso, o trabalho irá continuar com os mesmos objetivos iniciais, porém com a troca do complexo Ru-NO para o complexo Ru-NO<sub>2</sub>, esperando que as mesmas propriedades planejadas para o primeiro também estejam presentes no segundo.

## ***CAPÍTULO 4: O EFEITO SOLVATOCRÔMICO***

Este capítulo se dedica à um estudo do efeito solvatocrômico através de uma análise multiparamétrica em uma série de três estruturas, duas delas tendo sido sintetizadas ao longo deste projeto, ilustradas na **Figura 59**. Além disso, o mesmo estudo também foi realizado com o ligante dppz livre.

**Figura 59:** Estruturas dos compostos utilizados para o estudo do efeito solvatocrômico.



**Fonte:** o próprio autor.

Os três compostos apresentam poucas variações em sua estrutura, sendo o ligante monodentado a principal delas. A escolha dos três ligantes foi realizada com base na capacidade de cada um doar ou receber ligações de hidrogênios com o solvente, gerando resultados interessantes a respeito de como essas interações fracas afetam a estrutura eletrônica desses compostos em solução. Destaca-se que o complexo Ru-py, até agora não discutido neste trabalho, foi sintetizado em um projeto de iniciação científica da aluna Amanda de Camargo Tardio e apresentado na forma de poster na 45<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (45<sup>a</sup> RASBQ) (RENAN R. BERTOLONI et al., 2022).

## 1. O efeito solvatocrômico dentro da química de coordenação

Antes de iniciar o estudo como um todo, é necessária uma breve revisão sobre o efeito solvatocrômico e suas importâncias e aplicações na química de coordenação.

### 1.1 O solvatocromismo

Uma das ações mais executadas de um químico é a dissolução de um sólido em um solvente apropriado. Apesar de simples, essa ação envolve interações complexas entre solvente e soluto que, no caso de compostos solúveis, apresenta uma variação de energia livre de Gibbs negativa para o processo ( $\Delta G < 0$ ). Para que essa variação seja negativa, espera-se ao menos uma das condições abaixo sejam verdadeiras:



- I. O valor da entalpia de solvatação é negativo ( $\Delta H < 0$ );
- II. O valor da entropia de solvatação é positivo ( $\Delta S > 0$ ).

A mudança nesses parâmetros termodinâmicos afeta diretamente a energia livre de solvatação e, por consequência, a energia do composto dissolvido (quando solúvel). É de se esperar que, com a mudança do solvente, os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  também sejam alterados, já que moléculas diferentes estão participando do processo. Além dessa mudança determinar solventes nos quais uma amostra pode ou não ser solubilizada, elas também geram diferenças na energia desse sistema, afetando diretamente os orbitais moleculares do composto dissolvido, por exemplo (PETER ATKINS; LORETTA JONES, 2012). A mudança na energia dos orbitais HOMO e LUMO de um composto afeta, por consequência, a energia de transição desse composto. Define-se como efeito solvatocrômico, portanto, a variação da energia de uma transição em função do solvente no qual a espécie está dissolvida. (MARINI et al., 2010; REICHARDT, 1994).

## **1.2 Compostos de coordenação solvatocrômicos**

O estudo do efeito solvatocrômico em uma molécula permite investigar desde propriedades eletrônicas da mesma até possíveis aplicações na engenharia ou na medicina (LOVING; SAINLOS; IMPERIALI, 2010; SUN et al., 2013a; XU et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

Dentro da química de coordenação, um dos motivos do estudo do efeito solvatocrômico em moléculas é verificar a influência da troca de ligantes na estrutura eletrônica do composto em questão, visto que as propriedades químicas desse composto estão diretamente ligadas a essa estrutura. Dadas todas as possíveis transições eletrônicas passíveis de ocorrer em um complexo de coordenação, as transições de transferência de carga são especialmente sensíveis à mudança do solvente, visto que essas transições essencialmente geram uma separação de cargas no composto de coordenação, tornando a energia dos estados envolvidos na transição muito dependente da polaridade do ambiente químico ao qual se encontram (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014; CIONCOLONI et al., 2016; PEREZ et al., 2021).

## **2. As vantagens da utilização de uma análise multiparamétrica**

A coleta dos dados para um estudo do efeito solvatocrômico é extremamente simples, consistindo apenas no registro do espectro eletrônicos dos alvos do estudo no máximo de

solventes disponível para o experimentador. Ao se analisar os resultados obtidos, no entanto, existem diversos caminhos a serem seguidos. O caminho mais simples e que era seguido no início desse tipo de estudo é a comparação do valor encontrado para a energia da transição em função de um parâmetro de polaridade do solvente,  $E_T(30)$  (CERÓN-CARRASCO et al., 2014; REICHARDT, 1994; SPANGE et al., 2021). Porém, como é de se esperar, uma interação entre um soluto e um solvente, especialmente quando se trata de dois estados de energia de uma mesma molécula, é extremamente complexa e depende de diversos parâmetros do solvente além de sua polaridade. Pensando nisso, é de extrema importância recorrer à métodos multiparamétricos de análise dos resultados, obtendo assim uma relação ainda linear, porém dependente de vários parâmetros de cada solvente disponível. Diversos métodos foram criados com essa finalidade, de maneira que nesse trabalho os resultados serão analisados utilizando dois deles, descritos a seguir.

## 2.1 O método de Kamlet-Taft

O primeiro método a ser discutido e utilizado nesse trabalho é o método multiparamétrico de Kamlet-Taft (KAMLET et al., 1983). Neste método, a energia de uma transição em um determinado solvente, expressa em centímetros recíprocos, é descrita pela equação:

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0 + a\alpha + b\beta + c\pi^* \quad \text{Equação XVII}$$

Onde  $a$ ,  $b$  e  $c$  são parâmetros específicos de cada transição e representam a contribuição dos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  para o efeito solvatocrômico,  $\tilde{\nu}_0$  é a energia daquela transição no vácuo e  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  são os parâmetros de Kamlet-Taft para os solventes. Esses três parâmetros de solvente indicam, respectivamente, a capacidade de doar de prótons em ligações de hidrogênio (HBD), a capacidade de receber prótons em ligações de hidrogênio (HBA) e a polaridade e polarizabilidade do solvente juntas em apenas um parâmetro. Destaca-se aqui que a utilização do conceito de doador e receptor de ligações de hidrogênio no lugar de acidez e basicidade para expandir os conceitos para solventes apróticos, englobando o máximo de solventes possível nesses parâmetros. Visto que os valores de cada parâmetros são obtidos a partir de escalas empíricas, é importante destacar como é feita a construção dessas escalas.

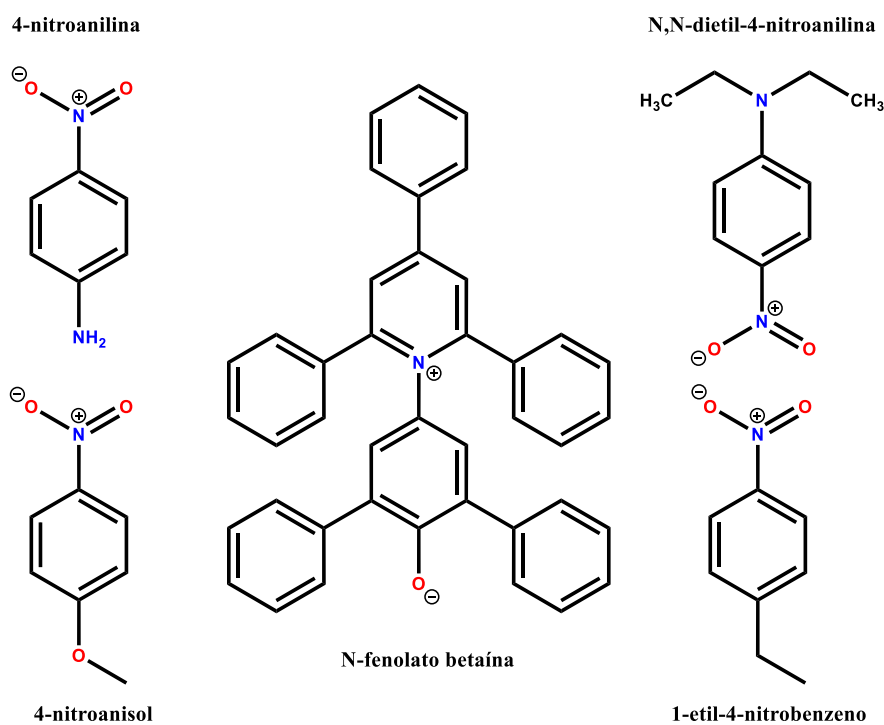
A construção dessas escalas é feita comparando o valor do desvio solvatocrômico ( $\Delta\Delta\tilde{\nu}$ ) de duas sondas em diferentes solventes. O método retorna uma equação da reta por meio de uma regressão linear entre os números de onda de absorção de cada sonda em cada solvente

analisado. Dessa maneira, calcula-se o desvio solvatocrômico como sendo a diferença entre a frequência calculada e a frequência observada. Após isso, o solvente que apresentou um maior desvio solvatocrômico é usado como referência, tornando o parâmetro para aquele solvente como 1. Na **Figura 60** estão as estruturas de algumas sondas utilizadas, de maneira que os trabalhos de Kamlet-Taft foram também revisados e as escalas aprimoradas com a utilização de novas sondas. (KAMLET et al., 1983; KAMLET; ABOUD; TAFT, 1977; KAMLET; TAFT, 1976a, 1976b). Além disso, a **Tabela 12** mostra os solventes de referência para cada parâmetro do método.

**Tabela 12:** Solventes de referência para cada parâmetro do método de Kamlet-Taft.

Parâmetro	Solvente de referência
$\alpha$	Metanol
$\beta$	Hexametilfosforamida (HMPA)
$\pi^*$	Ciclohexano ( $\pi^* = 0$ ), DMSO ( $\pi^* = 1$ )

**Figura 60:** Estruturas de algumas sondas utilizadas na construção das escalas dos parâmetros de solvente de Kamlet-Taft.



Fonte: o próprio autor.

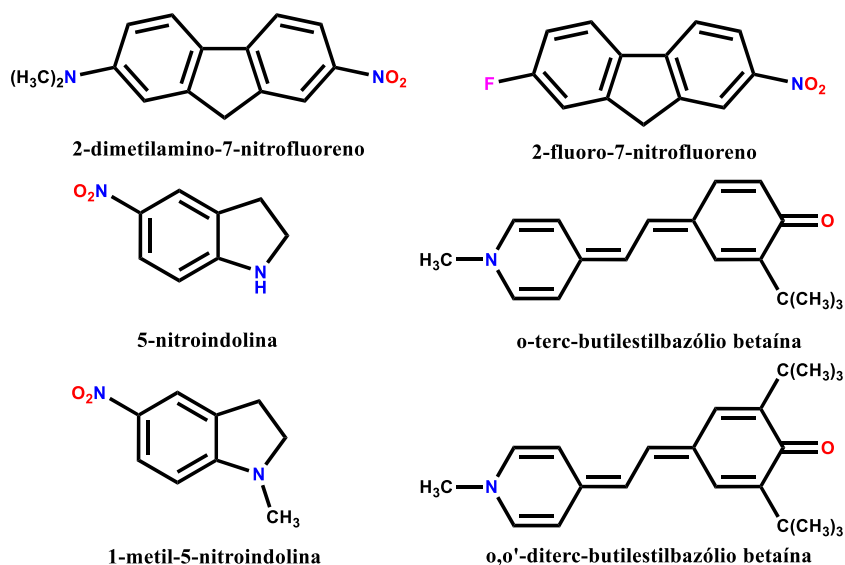
## 2.2 Método de Catalán

Um avanço em relação ao método de Kamlet-Taft é o método de Catalán, que utiliza 4 parâmetros de solvente para descrição completa da transição eletrônica (CATALÁN, 2009; CATALÁN et al., 1995):

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0 + aSA + bSB + cSdP + dSP \quad \text{Equação XVIII}$$

Nesse método, os parâmetros SA e SB foram construídos analogamente aos parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. No entanto, os parâmetros SdP e SP foram criados no intuito de separar as contribuições de polaridade e polarizabilidade do solvente, sendo que o parâmetro SdP se relaciona à polaridade e SP à polarizabilidade. A construção dessas escalas é feita de maneira análoga à que Kamlet e Taft fizeram, com a utilização de sondas e regressões lineares. Algumas das sondas utilizadas para construção dessa escala e os valores dos solventes de referência estão descritos na **Figura 61** e **Tabela 13**. Destaca-se aqui que inicialmente os parâmetros foram concebidos como SA, SB e SPP, sendo que esse terceiro é um parâmetro análogo ao  $\pi^*$  de Kamlet-Taft, relacionando-se com a polaridade e polarizabilidade do solvente. Após sua construção, esse parâmetro foi então dividido nos parâmetros SdP e SP utilizados atualmente nesse método (CATALÁN, 2009; CATALÁN et al., 1995; CATALÁN; LÓPEZ; PÉREZ, 1995).

**Figura 61:** Estruturas de algumas sondas utilizadas na construção da escala dos parâmetros de solvente de Catalán.



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 13:** Solventes de referência para cada parâmetro do método de Catalán.

<b>Parâmetro</b>	<b>Solvente de referência</b>
<b>SA</b>	Etanol (SA = 0,4)
<b>SB</b>	Tetrametilguanidina (TMG)
<b>SPP</b>	Dimetilsulfóxido (DMSO)

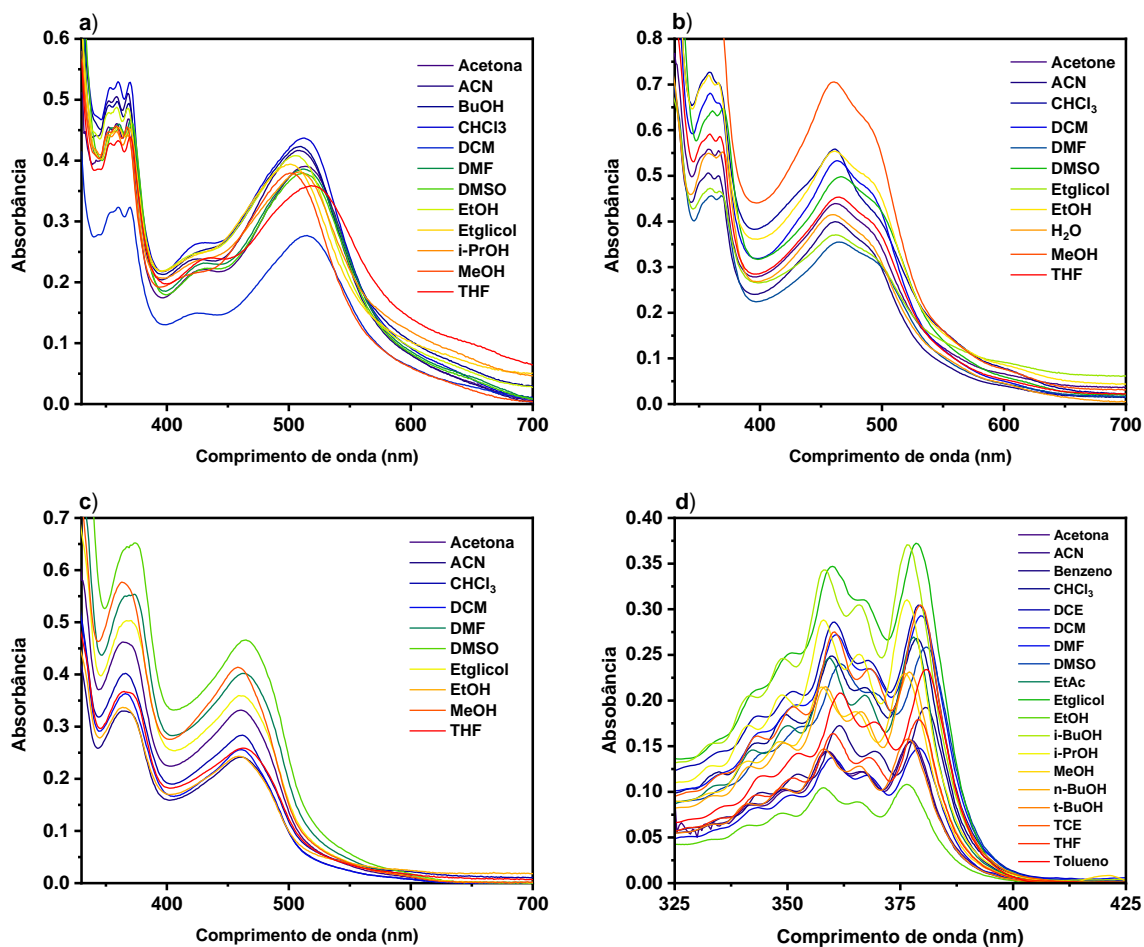
### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Resultados obtidos a partir da espectroscopia eletrônica**

Com as devidas considerações realizadas, parte-se para a análise dos resultados obtidos. A aquisição dos dados, como já discutido, é extremamente simples: consiste apenas no espectro do registro eletrônico dos compostos a serem analisados no maior número de solventes disponível ao experimentador nos quais a amostra é solúvel.

Inicialmente, observa-se que os compostos estudados não apresentam um forte efeito solvatocrômico, visto que o deslocamento no máximo da absorção MLCT é de poucos nanômetros com a mudança dos solventes. Uma explicação razoável para esse efeito é de que, dada a deslocalização eletrônica presente nos ligantes tpy e dppz, as cargas parciais que surgem devido à separação de cargas na MLCT se apresentam mais deslocalizadas no complexo como um todo, fazendo com que a mudança de solvente não afete de maneira mais significativa a energia dessa transição. A banda observada no ligante livre dppz apresenta contribuições de transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ , que devido à rigidez da molécula de dppz, é de se esperar que não apresentam um forte efeito solvatocrômico.

**Figura 62:** Espectros eletrônicos qualitativos registrados em diversos solventes para os compostos Ru-Cl (a), Ru-H<sub>2</sub>O (b), Ru-py (c) e para o ligante dppz livre (d).

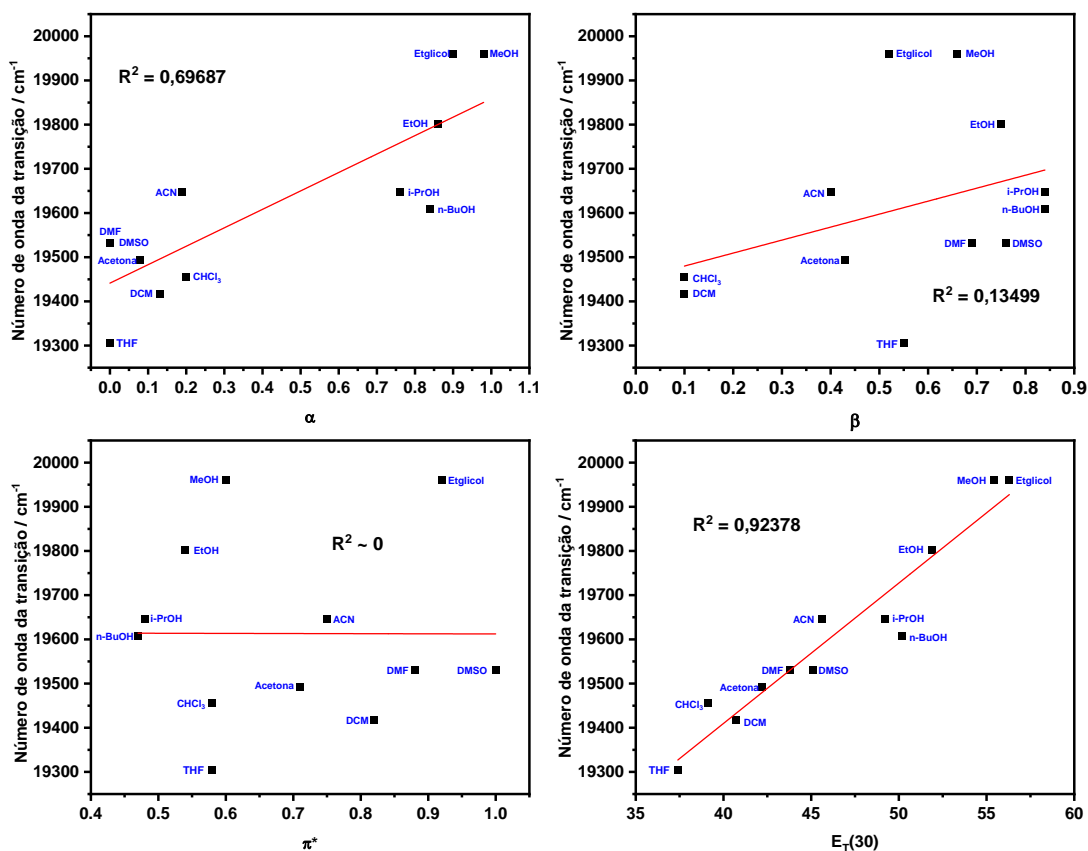


Fonte: o próprio autor.

### 3.2 A análise monoparamétrica e seus problemas

A análise desses resultados revela como a utilização de um método multiparamétrico é necessário para uma melhor compreensão do papel do solvente na energia da transição eletrônica observada. Utilizando o composto Ru-Cl como exemplo, a **Figura 63** representa uma regressão linear que relaciona a energia da MLCT com os parâmetros de solvente de Kamlet-Taft individualmente e com o parâmetro individual  $E_t(30)$ .

**Figura 63:** Relações lineares monoparamétricas entre a energia da transição MLCT do composto Ru-Cl e os parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  de Kamlet-Taft e o parâmetro  $E_T(30)$ .



Fonte: o próprio autor.

Como observado, uma relação monoparamétrica das energias observadas para a transição MLCT e quaisquer parâmetros individuais de Kamlet-Taft retornam coeficientes de correlação ( $R^2$ ) muito baixos, indicando que a relação não está bem definida. O parâmetro  $E_T(30)$ , no entanto, retorna uma boa correlação, mesmo sendo uma escala monoparamétrica. Isso ocorre pois o parâmetro  $E_T(30)$  é uma medida da polaridade do solvente e, como já discutido anteriormente, as transições MLCT, por envolverem separação de cargas na estrutura do complexo, tem suas energias diretamente afetadas pela polaridade do solvente (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014; CIONCOLONI et al., 2016). No entanto, uma análise utilizando apenas esse parâmetro não revela nenhuma informação a respeito da contribuição das outras propriedades do solvente para essa transição. A utilização da análise multiparamétrica é, portanto, uma alternativa que irá relacionar de maneira quantitativa a energia da transição com cada parâmetro do método multiparamétrico, retornando os valores das constantes a, b e c da **Equação XVII**, no caso do método de Kamlet-Taft e a,b,c e d da **Equação XVIII**, no caso do

método de Catalán, revelando assim a contribuição de cada parâmetro do solvente para a energia da transição como um todo.

### 3.3 A análise multiparamétrica de Kamlet-Taft

O emprego de uma análise multiparamétrica requer, inicialmente, a obtenção de todos os parâmetros de solvente para cada solvente utilizado. Esses valores estão reunidos na **Tabela 14** (KAMLET et al., 1983; MARCUS, 1993).

**Tabela 14:** Valores dos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  para os solventes utilizados neste trabalho.

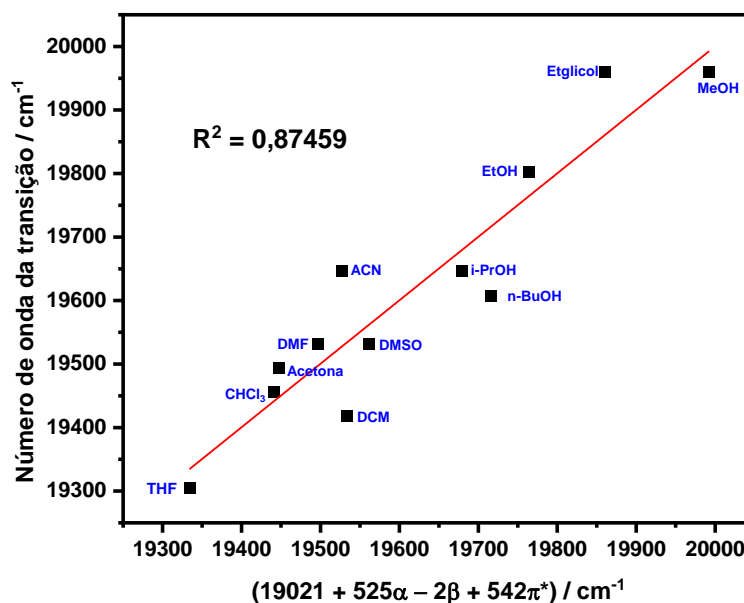
Solvente	$\alpha$	$\beta$	$\pi^*$
AC	0,080	0,430	0,710
ACN	0,190	0,400	0,750
Benzeno	0,000	0,100	0,590
CHCl <sub>3</sub>	0,200	0,100	0,580
DCE	0,000	0,100	0,810
DCM	0,130	0,100	0,820
DMF	0,000	0,690	0,880
DMSO	0,000	0,760	1,000
EtAc	0,000	0,450	0,550
Etglicol	0,900	0,520	0,920
EtOH	0,860	0,750	0,540
H <sub>2</sub> O	1,170	0,470	1,090
i-BuOH	0,790	0,840	0,400
i-PrOH	0,760	0,840	0,480
MeOH	0,980	0,660	0,600
n-BuOH	0,840	0,840	0,470
t-BuOH	0,420	0,930	0,410



TCE	0,000	0,050	0,530
THF	0,000	0,550	0,580
Tolueno	0,000	0,110	0,540

A partir desses parâmetros e dos valores das energias das transições obtidos experimentalmente, é possível traçar uma relação multiparamétrica entre os dados. Utilizando novamente o Ru-Cl como exemplo, a análise multiparamétrica foi realizada utilizando o método de Kamlet-Taft.

**Figura 64:** Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-Cl utilizando o método de Kamlet-Taft.



Fonte: o próprio autor.

Inicialmente, o método multiparamétrico permite avaliar a influência de cada propriedade do solvente no efeito solvatocrômico. O sinal de cada coeficiente na equação revela se cada parâmetro contribui com um deslocamento batocrômico ou hipsocrômico, sendo que um sinal negativo corresponde à uma redução na energia da transição, logo, um deslocamento batocrômico, e um sinal positivo significa um deslocamento hipsocrômico. Analisando o Ru-Cl, conclui-se que a acidez do solvente, ou sua capacidade de doar prótons através de ligações do hidrogênio, contribui com um deslocamento hipsocrômico da transição, indicando que estabiliza o estado fundamental e desestabiliza o excitado. O mesmo pode ser dito com relação

à polaridade/polarizabilidade do solvente e, por fim, a basicidade ou capacidade de receber prótons por ligação de hidrogênio causa um deslocamento batocrômico na transição, indicando que esse efeito desestabiliza o estado fundamental e estabiliza o estado excitado.

Além dessas conclusões, o modelo multiparamétrico permite também avaliar a contribuição individual de cada propriedade do solvente na energia da transição. Para realizar essa análise, no entanto, é necessária uma nova equação padronizada. Visto que cada escala dos parâmetros de solvente é independente, os valores retornados na equação não-padronizada não refletem o peso de cada parâmetro no deslocamento do máximo de energia da absorção. Essa padronização é realizada seguindo a **Equação XIX**, onde  $x$  é o parâmetro de cada solvente,  $\bar{x}$  é a média dos parâmetros de todos os solventes utilizados e  $\sigma$  é o desvio padrão dos valores utilizados.

$$x_{padronizado} = \frac{x - \bar{x}}{\sigma} \quad \text{Equação XIX}$$

Uma nova equação padronizada pode ser calculada para o composto Ru-Cl, representada abaixo.

$$\tilde{\nu} = (19613 + 207\alpha - 1\beta + 93\pi^*)/cm^{-1} \quad \text{Equação XX}$$

Essa equação reflete a contribuição relativa de cada parâmetro para a energia da transição, logo, a % de contribuição pode ser calculada. Destaca-se aqui que ambas as equações, padronizada e não-padronizada, são de importância equivalente para a análise multiparamétrica, sendo que a primeira permite o cálculo da energia da transição para qualquer solvente com os parâmetros conhecidos e a segunda permite o cálculo da % de contribuição de cada parâmetro para a energia da transição. Os valores da % de contribuição de cada parâmetro para todos os compostos estão descritos na **Tabela 15**, e as regressões multiparamétricas utilizando o método de Kamlet-Taft para as outras estruturas estão em **ANEXO**.

**Tabela 15:** Contribuições relativas de cada parâmetro de solvente de Kamlet-Taft para a energia da transição.

Composto	$\alpha$ (%)	$\beta$ (%)	$\pi^*$ (%)
<b>Ru-Cl</b>	<b>69</b>	0	31
<b>Ru-H<sub>2</sub>O</b>	<b>54</b>	35	11
<b>Ru-py</b>	<b>73</b>	19	8
<b>Dppz</b>	<b>59</b>	16	25

O significado de cada uma dessas contribuições está diretamente relacionado com a estrutura de cada composto analisado. No entanto, essa análise será realizada após a apresentação dos dados tratados pelo método multiparamétrico de Catalán, visto que este apresentou resultados mais coerentes para os compostos.

### 3.4 A análise multiparamétrica de Catalán

A análise como um todo é realizada exatamente da mesma forma, com a exceção de que o método de Catalán apresenta 4 parâmetros de solvente que são utilizados na regressão multiparamétrica. Os valores desses valores para todos os solventes utilizados estão registrados na **Tabela 16** (CATALÁN, 2009; CATALÁN et al., 1995; HOMOCIANU et al., 2011; MARCUS, 1993).

**Tabela 16:** Valores dos parâmetros SA, SB, SdP e SP para todos os solventes utilizados neste trabalho.

Solvente	SA	SB	SdP	SP
AC	0,000	0,475	0,907	0,651
ACN	0,044	0,286	0,974	0,645
Benzeno	0,000	0,124	0,270	0,793
CHCl <sub>3</sub>	0,047	0,071	0,614	0,783
DCE	0,030	0,126	0,742	0,771
DCM	0,040	0,178	0,769	0,761
DMF	0,031	0,613	0,977	0,759

DMSO	0,072	0,647	1,000	0,830
EtAc	0,000	0,542	0,603	0,656
Etglicol	0,717	0,534	0,910	0,777
EtOH	0,400	0,658	0,783	0,633
H <sub>2</sub> O	1,062	0,025	0,997	0,681
i-PrOH	0,283	0,830	0,808	0,633
MeOH	0,605	0,545	0,904	0,608
n-BuOH	0,341	0,809	0,655	0,674
THF	0,000	0,591	0,634	0,714
Tolueno	0,000	0,128	0,284	0,782

O mesmo tratamento então foi realizado para todos os compostos, retornando equações não-padronizadas e padronizadas. As regressões multiparamétricas de todos os compostos utilizando o método de Catalán estão em **ANEXO** neste trabalho, e a **Tabela 17** reúne as contribuições de cada parâmetros de Catalán para a energia da transição.

**Tabela 17:** Contribuições relativas dos parâmetros de Catalán para as energias de transição.

Composto	SA (%)	SB (%)	SdP (%)	SP (%)
<b>Ru-Cl</b>	<b>58</b>	9	21	12
<b>Ru-H<sub>2</sub>O</b>	28	<b>33</b>	9	30
<b>Ru-py</b>	<b>40</b>	22	5	33
<b>Dppz</b>	26	4	4	<b>66</b>

### 3.5 A influência da estrutura de um composto em suas interações com o solvente

Com as análises multiparamétricas realizadas, é possível traçar um paralelo entre os resultados obtidos e a estrutura dos compostos analisados. Inicialmente, destaca-se aqui que o raciocínio foi realizado com base nos resultados obtidos pelo método de Catalán. Apesar da lógica também ser aplicada para o método de Kamlet-Taft, os resultados de Catalán tornam essa interpretação mais evidente com base na % de contribuição de cada parâmetro para a energia da transição.

Dadas as definições dos parâmetros SA e SB, é útil procurar nas moléculas estudadas sítios capazes de doar ou receber hidrogênios em ligações de hidrogênios para entender a contribuição desses parâmetros. Analisando a **Tabela 17**, observa-se que os compostos Ru-Cl e Ru-py apresentam uma maior contribuição do parâmetro SA, enquanto o composto Ru-H<sub>2</sub>O apresenta uma maior contribuição do composto SB, apesar de apresentar uma contribuição SA significativa. Visto que a única grande mudança entre esses 3 complexos é a mudança do ligante monodentado, muito provavelmente é nesse sítio que estão ocorrendo as principais interações que acarretam a mudança das contribuições relativas.

O ligante Cl<sup>-</sup> induz um aumento na contribuição do parâmetro SA, isto é, na capacidade do solvente de doar ligações de hidrogênios para o composto Ru-Cl. Isso ocorre, pois, a formação de ligações de hidrogênio não ocorre apenas com os átomos F, O e N. Apesar de essas serem as mais comuns, existem outros tipos de ligações de hidrogênios, denominadas não convencionais, que podem ocorrer com diversas estruturas, incluindo outros haletos, como é o caso do Cl<sup>-</sup>, o que explica a contribuição mais alta desse parâmetro (ROBERTSON et al., 2018). No entanto, esse não é o único sítio da molécula capaz de receber ligações de hidrogênio do solvente, visto que o ligante dppz também apresenta átomos de N não coordenados capazes de realizarem essas interações com o solvente. Isso explica o fato de todos os compostos analisados apresentarem uma contribuição de SA relativamente alta, mesmo que não seja o parâmetro que mais contribui. No caso do composto Ru-py, o SA continua sendo o parâmetro com uma maior contribuição, visto que o ligante py não é um doador nem um receptor de ligações de hidrogênios, porém o ligante dppz ainda está presente na estrutura. O composto Ru-H<sub>2</sub>O, no entanto, apresentou uma maior contribuição do parâmetro SB, visto que a molécula de H<sub>2</sub>O é uma forte doadora de ligações de hidrogênios para as moléculas de solvente. Apesar disso, nota-se que a contribuição de SA não é muito menor, devido à presença dos nitrogênios não coordenados do dppz em sua estrutura. Por fim, o ligante livre dppz apresenta uma maior contribuição da polarizabilidade do solvente, como esperado para transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ , que ocorrem moléculas rígidas e planares. (BARYSHNIKOV et al., 2017; CATALÁN; CATALÁN, 2011; GÜMÜŞ et al., 2018).

Como já dito anteriormente, as mesmas informações são confirmadas através do método de Kamlet-Taft observando a variação do parâmetro  $\alpha$  na **Tabela 15**. No entanto, em todos os compostos, o parâmetro  $\alpha$  foi aquele que apresentou a maior contribuição. Essa diferença se deve muito provavelmente ao parâmetro  $\pi^*$ , que, por englobar tanto polaridade quando

polarizabilidade, não é um bom descritor dos efeitos do solvente na energia da transição. Quando a polaridade e a polarizabilidade são consideradas em parâmetros separados, como o SdP e o SP de Catalán, o modelo se torna mais completo e o resultado mais próximo da realidade.

#### **4. Considerações finais a respeito do estudo do efeito solvatocrômico**

Encerra-se este capítulo com uma breve conclusão a respeito do estudo realizado. Inicialmente, visto que os compostos observados não apresentam um efeito solvatocrômico acentuado, o estudo desse efeito pode parecer desanimador. No entanto, ao se analisar os resultados, observa-se como uma análise multiparamétrica apresenta resultados que descrevem melhor a interação de cada composto com o solvente em relação à uma análise monoparamétrica simples e que, mesmo com deslocamentos pequenos do comprimento de onda da transição, pode-se observar como uma variação pequena na estrutura dos complexos como um todo afeta na maneira com que interagem com o solvente. Levando em conta que os dados necessários para uma análise mono e multiparamétrica são os mesmos, encoraja-se que sempre que possível, a análise multiparamétrica seja utilizada no estudo do efeito solvatocrômico, dando um passo a mais no entendimento da estrutura eletrônica dos analitos e de sua interação com cada solvente. Futuramente, a modelagem molecular será uma ótima maneira de verificar melhor essas interações soluto-solvente de cada composto e explicar um pouco mais a % de contribuição relativa de cada parâmetro.

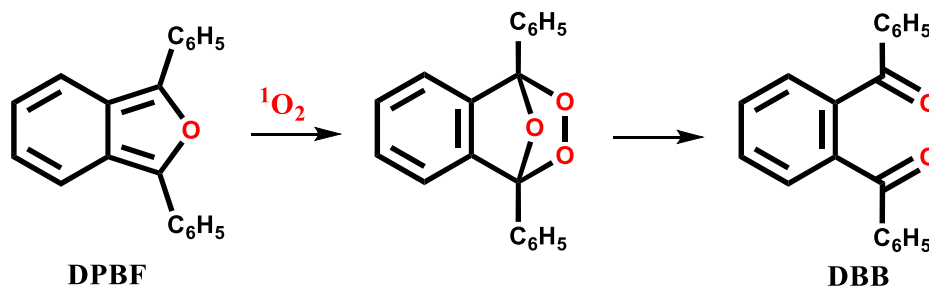
## ***CAPÍTULO 5: APLICAÇÕES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS***

Após a síntese e a caracterização de todos os compostos ser realizada e da substituição do Ru-NO por Ru-NO<sub>2</sub> ter sido explicada, o próximo passo do trabalho é verificar se os compostos estudados realmente apresentam todas as propriedades e aplicações biológicas desejadas para os mesmos e exemplificadas ao longo de todo o **Capítulo 1**. A descrição das técnicas utilizadas e do preparo das soluções, além dos resultados observados para cada experimento, estão descritos nos respectivos itens.

## 1. Determinação do rendimento quântico de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

### 1.1 O princípio da técnica

Como discutido no **Capítulo 1**, a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> é uma das principais aplicações biológicas esperadas para os compostos estudados nesse trabalho, tendo em vista os ligantes polipiridínicos coordenados ao centro metálico. Para medir o quanto os compostos são capazes de gerar essa molécula, é utilizada a técnica de espectroscopia eletrônica com a sonda 1,2-difenilisbenzofurano (DPBF), uma molécula que reage fortemente com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> seguindo a reação ilustrada na **Figura 65**.



Fonte: o próprio autor.

Nessa reação, o DPBF reage fortemente com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formando um peróxido que rapidamente se decompõe na espécie 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB) (ENTRADAS; WALDRON; VOLK, 2020). O importante a se notar nessa reação é que a sonda DPBF apresenta um alto nível de conjugação em seu sistema, envolvendo os anéis centrais e ambos os substituintes fenil em sua estrutura. Após o término dessa reação, a molécula DBB apresenta uma conjugação muito menor, sem se estender para os substituintes. Utilizando o mesmo raciocínio dos orbitais de Hückel do **Capítulo 3**, espera-se que, com a quebra dessa conjugação, a molécula de DBB apresente uma energia de transição muito maior com relação ao DPBF, e é justamente essa diferença que faz com que a detecção do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> seja possível. Utilizando a



espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, detecta-se uma absorção referente ao reagente DPBF. Caso o analito consiga gerar  $^1\text{O}_2$ , o DPBF é consumido, formando uma espécie que não absorve na região do UV-Vis e, portanto, é observado apenas um abaixamento na absorção do DPBF, indicando que houve o consumo desse reagente. A partir desse abaixamento, é possível traçar uma curva cinética de primeira ordem para determinação do rendimento quântico de geração do  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ).

De maneira análoga ao cálculo do rendimento quântico de emissão apresentado no **Capítulo 2**, o cálculo do rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  é realizado com a utilização de um padrão cujo valor de rendimento quântico já seja conhecido. Esse cálculo é então realizado utilizando a relação abaixo.

$$\Phi_\Delta = \Phi_\Delta^{\text{padrão}} \frac{k}{k^{\text{padrão}}} \frac{1-10^{A_{\text{padrão}}}}{1-10^A} \quad \text{Equação XXI}$$

Onde  $\Phi_\Delta^{\text{padrão}}$  é o rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  do padrão utilizado,  $k$  e  $k^{\text{padrão}}$  são as constantes cinéticas de fotodegradação da amostra e do padrão, respectivamente, e  $A_{\text{padrão}}$  e  $A$  são os valores de absorbância no máximo de absorção para o padrão e a amostra, respectivamente (SILVEIRA et al., 2020).

## 1.2 Metodologia

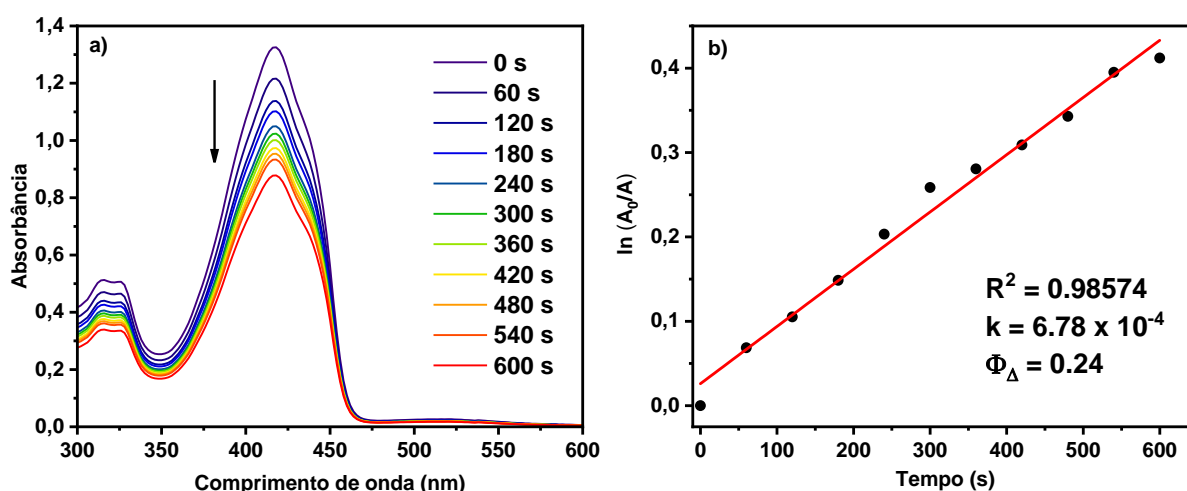
O experimento foi realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foi seguido o procedimento padrão para esse tipo de determinação (PIVETTA et al., 2017). A um volume máximo de 1,0 mL de uma solução 100  $\mu\text{M}$  de DPBF em DMSO foi adicionado 0,5 mL de uma solução 20  $\mu\text{M}$  dos compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub> em DMSO. O frasco foi então preenchido com 2,0 mL de DMSO para um volume final de 3,5 mL. A fim de medir a geração de oxigênio singlete, os espectros UV-vis de absorção de cada solução foram registrados em diferentes tempos de exposição (0-600s) com uma luz LED ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ). O padrão utilizado foi o  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ , cujo valor de  $\Phi_\Delta$  determinado foi de 0,26 em DMSO.

## 1.3 Resultados e Discussão

Após a realização dos experimentos, foi realizado o tratamento cinético de primeira ordem para determinar as constantes de fotodegradação para os compostos estudados e, por consequência, o rendimento quântico da geração de  $^1\text{O}_2$ . Os espectros eletrônicos registrados e

a curva cinética de fotodegradação do DPBF para o composto Ru-NO<sub>2</sub> estão representados na **Figura 66**.

**Figura 66:** Espectros eletrônicos de uma mistura da sonda DPBF (30 μM) com o complexo Ru-NO<sub>2</sub> (3 μM) em DMSO com exposição à luz em diferentes períodos (a) e curva cinética de primeira ordem para a fotodegradação do DPBF (b).



Fonte: o próprio autor.

Como esperado, o composto Ru-NO<sub>2</sub> foi capaz de gerar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quando exposto à luz, assim como os outros dois compostos estudados nesse trabalho. A **Tabela 18** reúne os valores para as constantes de fotodegradação e rendimentos quânticos de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> calculados para todos os compostos.

**Tabela 18:** Valores calculados de constantes de fotodegradação e rendimento quântico de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Composto	k (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )	Φ <sub>Δ</sub>
Ru-Cl	1,17	0,04
Ru-H <sub>2</sub> O	4,23	0,15
Ru-NO <sub>2</sub>	6,78	0,24

Como observado, o composto Ru-NO<sub>2</sub> foi o que apresentou o maior rendimento quântico de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, seguido pelo Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-Cl, respectivamente. Esses dados refletem aquilo que já era esperado após a verificação do rendimento quântico de emissão e dos

tempos de vida dos estados excitados no **Capítulo 2**. Quanto maior o tempo de vida de um estado excitado, maiores as chances desse estado passar por algum outro processo que não seja o decaimento não-radiativo, aumentando assim as chances tanto da emissão radiativa do composto quanto da transferência de energia para o  $^3\text{O}_2$  ocorrer.

Para efeitos de comparação, o complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , um dos precursores da classe dos rutênio-polipiridinas e provavelmente o mais estudado nessa classe (DONGARE et al., 2017; JURIS et al., 1988), apresentou um rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  de 0,57 em acetonitrila em um estudo realizado por Abdel-Shafi et al. (ABDEL-SHAFI et al., 2000). Nesse mesmo estudo, outros complexos de rutênio contendo ligantes derivados da bpy (2,2'-bipiridina) apresentaram rendimentos quânticos de geração de  $^1\text{O}_2$  variando entre 0,18 e 0,60 ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ). Recentemente, uma das estratégias empregadas no desenvolvimento de novos candidatos a fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica é aumentar os valores de rendimento quântico ao mesmo tempo que o valor do comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) da MLCT dos compostos seja maior, de maneira que a amostra é irradiada com uma radiação de menor energia, visando a janela terapêutica. Zhou et al. estudaram uma série contendo 3 complexos de rutênio-polipiridinas,  $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dpb})(\text{dppn})]^{2+}$  (dpb = 2,3-bis(2-piridil)benzoquinoxalina; dppn = 4,5,9,16-tetraazadibenzo[a,c]naftaceno),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpb})]^{2+}$  e  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})]^{2+}$ , cujos valores de rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  foram 0,43, 0,22 e 0,79, respectivamente. Apesar do composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dpb})(\text{dppn})]^{2+}$  apresentar um máximo de absorção de 548 nm, seu rendimento quântico não foi o maior da série. Em contraste, o composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})]^{2+}$ , que conseguiu gerar  $^1\text{O}_2$  com um alto rendimento, apresenta um máximo de absorção de apenas 442 nm (ZHOU et al., 2010). Um estudo recente publicado por Schmidt et al. sintetiza um complexo de fórmula  $[\text{Ru}(\text{tbbpy})(2\text{-(perileno-3-il)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]-fenantrolina)}](\text{PF}_6)_2$  que apresenta um rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  de 0,80, comparável com o valor do TLD1433 (0,77), um complexo promissor de rutênio que se encontra no momento em testes clínicos para aplicação em terapia fotodinâmica (MONRO et al., 2019; SCHMID et al., 2022).

Destaca-se aqui que, apesar dos valores do rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  serem relativamente baixos para esses compostos quando comparados aos citados acima, o design de sua estrutura não foi realizado pensando apenas nessa aplicação, portanto era de se esperar que sua capacidade de gerar  $^1\text{O}_2$  não seja tão alta quanto os valores reportados para compostos que foram estudados pensando apenas nessa aplicação. Do ponto de vista de uma sinergia entre

todas as aplicações propostas para o composto Ru-NO<sub>2</sub>, o valor de 0,24 pode ser um sinal promissor de que essa estrutura é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e de que, com poucas alterações na estrutura de seus ligantes, é possível chegar em uma espécie que consiga gerar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e ainda apresentar todas as outras propriedades que virão a ser discutidas ao longo deste capítulo. Além disso, apesar do rendimento quântico de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> relativamente pequeno, o simples fato do composto ser capaz de gerar essa espécie cria a possibilidade de o composto apresentar uma citotoxicidade apreciável, mesmo que em concentrações um pouco maiores (CASTRO et al., 2022). Esse efeito aliado às outras propriedades biológicas do composto Ru-NO<sub>2</sub> pode torná-lo como um bom ponto de partida para criação de outras estruturas que consigam apresentar resultados cada vez melhores.

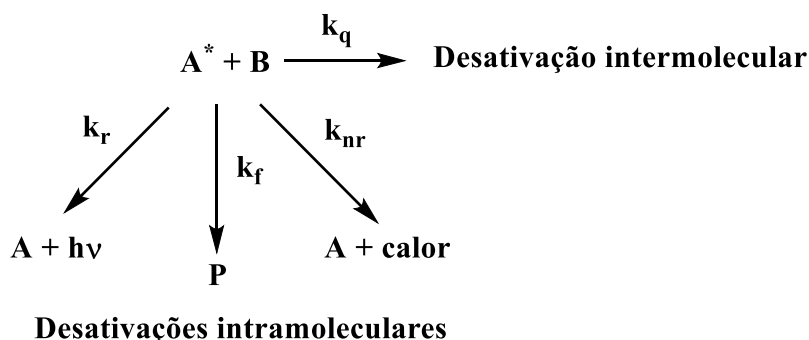
## **2. Supressão de fluorescência da HSA e do DNA pelo método de Stern-Volmer**

Os itens 2 a 5 deste capítulo visam estudar a interação dos compostos com as biomoléculas alvo deste trabalho (HSA e DNA). O primeiro método de estudo é utilizando o tratamento de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência das moléculas alvo causada pelos compostos estudados. Esse método normalmente é utilizado como um primeiro passo para a verificação dessas interações, seguido de métodos mais diretos que serão apresentados ao longo deste capítulo.

### **2.1 A supressão de fluorescência bimolecular e a equação de Stern-Volmer**

Para entender um pouco melhor o método de Stern-Volmer, é necessário compreender um processo importante pelo qual um estado excitado de uma molécula pode passar: a desativação intermolecular. No **Capítulo 1**, a maioria dos processos envolvendo estados excitados de moléculas foram discutidos no item referente à espectroscopia de emissão eletrônica. No entanto, todos os processos apresentados levavam em conta apenas mecanismos intramoleculares, isto é, envolvendo apenas a molécula que se encontra no estado excitado. Sabendo que, em uma solução, existem diversas outras moléculas presentes no meio, é necessário considerar processos que envolvem a interação do estado excitado de uma molécula com as outras moléculas presentes no meio (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014).

**Figura 67:** Processos que podem desativar um estado excitado de uma molécula A.



**Fonte:** o próprio autor, adaptado de Balzani et al (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014).

Analisando os processos de desativação intramolecular, a diminuição da concentração de  $A^*$  pode ser considerada como uma reação de primeira ordem com relação às constantes  $k_r$ ,  $k_f$  e  $k_{nr}$ , que indicam respectivamente, processos radiativos, processos fotoquímicos e processos não-radiativos de decaimento, visto que todos esses processos dependem apenas da molécula  $A^*$ .

$$-\frac{d[A^*]_{intra}}{dt} = (k_r + k_f + k_{nr})[A^*] = \frac{1}{\tau_0} [A^*]$$

Visto que as constantes cinéticas apresentam uma unidade de  $s^{-1}$ , fica evidente que o inverso da soma dessas constantes apresenta uma unidade temporal. Esse tempo  $\tau_0$  é definido como tempo de vida de  $A^*$  na ausência da molécula B. Com relação aos processos intermoleculares, a lei cinética deve ser de segunda ordem, visto que o processo agora depende do choque de  $A^*$  com B para ocorrer.

$$-\frac{d[A^*]_{inter}}{dt} = k_q[B][A^*]$$

Nessa equação,  $k_q$  representa a constante de velocidade dos processos de desativação intermoleculares. Somando as duas contribuições para o decaimento de  $A^*$ :

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_r + k_f + k_{nr} + k_q[B])[A^*] = \frac{1}{\tau} [A^*]$$

Onde  $\tau$  é o tempo de vida de  $A^*$  na presença da molécula B. Sendo assim, a razão entre o tempo de vida de  $A^*$  na ausência e na presença de B é dada por:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{(k_r + k_f + k_{nr} + k_q[B])}{(k_r + k_f + k_{nr})} = 1 + \frac{k_q[B]}{(k_r + k_f + k_{nr})} = 1 + \tau_0 k_q[B]$$

O produto  $\tau_0 k_q$  é denominado de constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ). A razão  $\tau_0/\tau$ , em condições experimentais adequadas, pode ser substituída pela intensidade da emissão de fluorescência de uma molécula A na ausência ( $F^0$ ) e na presença ( $F$ ) da molécula supressora B. Essas condições incluem que o comprimento de onda de excitação e de emissão devem ser escolhidos visando evitar qualquer tipo de absorção por parte do supressor (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014). Nesse caso, tem-se que:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[B] \quad \text{Equação XXII}$$

A **Equação XXII** é denominada equação de Stern-Volmer e será utilizada para determinar o valor de  $K_{SV}$  da interação dos compostos Ru-NO<sub>2</sub>, Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O (moléculas “B”) com a HSA e com o DNA (moléculas “A”).

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Preparação do tampão Tris-HCl

Todos os experimentos deste trabalho que necessitam de uma solução tamponada foram realizados utilizando o tampão Tris-HCl. Sua preparação é realizada dissolvendo 1,2123 g de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base) em 100 mL de água deionizada. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,4 a partir da adição de uma solução diluída de HCl. O volume da solução é então completado para 200 mL, formando uma solução tampão Tris-HCl 50 mM. Para os experimentos com DNA, o tampão é preparado com 5 mM de NaCl, e sua preparação é realizada da mesma forma, porém adicionando 58 mg do sal aos 200 mL de tampão.

### 2.2.2 Supressão de fluorescência da HSA

Para a solução estoque de HSA, uma massa de 0,0660 g de HSA foi dissolvida em 10 mL do tampão Tris-HCl, produzindo uma solução de HSA 100  $\mu$ M. Essa concentração pode ser verificada através da espectroscopia eletrônica, na qual o valor da absorvidade molar da HSA em 278 nm é de 35219 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (PACE et al., 1995). Essa solução então é diluída 100 vezes em um balão de 5 mL, dando origem a uma solução 1  $\mu$ M de HSA. Foi preparada também uma solução 1,5 mM do complexo Ru-NO<sub>2</sub> em ACN. O espectro de emissão eletrônica da solução 1  $\mu$ M da HSA (3 mL) foi registrado utilizando  $\lambda_{exc} = 280$  nm de 295 a 450 nm, com aberturas de fendas fixadas em 5 nm. Após o registro, foram adicionados 4  $\mu$ L da solução de

Ru-NO<sub>2</sub> e a solução final foi mantida sob agitação por 5 minutos. Após esse tempo, um novo espectro foi registrado e o processo foi repetido mais 9 vezes. Ao final, a solução apresenta 40 µL de ACN em 3040 µL do tampão, garantindo que a % de cossolvente orgânico esteja abaixo dos 2%. O experimento foi realizado em 3 temperaturas diferentes (25, 32 e 37 °C). O mesmo experimento foi realizado para os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O (CACITA; NIKOLAOU, 2016).

### 2.2.3 Supressão de fluorescência do DNA

Uma solução estoque de fs-DNA é preparada pesando 10 mg de fs-DNA e diluindo essa massa em 10 mL do tampão Tris-HCl. A nova solução apresenta uma concentração de 4,7 mM do DNA. Essa solução é então diluída em tampão Tris-HCl para uma solução 10 µM de fs-DNA em um balão de 10 mL. A verificação da concentração da solução também pode ser realizada verificando a absorção do fs-DNA em 258 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (FELSENFELD; HIRSCHMAN, 1965). A razão  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  garante que o DNA está desnovelado e as análises podem ser realizadas (MANCHESTER, 1996). Uma solução 1 mM de EtBr é preparada dissolvendo 2,0 mg em 5 mL de água deionizada. Por fim, prepara-se uma solução 7,5mM do composto Ru-NO<sub>2</sub> em ACN. Inicialmente, adiciona-se 3 µL da solução de EtBr em 2997 µL da solução de fs-DNA, formando uma solução 10 µM de fs-DNA e 1 µM de EtBr. Essa solução é incubada à 25 °C durante 1 hora. Após esse tempo, é registrado o espectro eletrônico de emissão da solução utilizando um  $\lambda_{\text{exc}} = 526 \text{ nm}$  de 545 a 700 nm, com aberturas de fendas fixas em 5 nm e mantendo a temperatura da solução à 25 °C. Após o registro, são adicionados 4 µL da solução de Ru-NO<sub>2</sub> e a solução é homogeneizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. O espectro dessa nova solução é então registrado e o mesmo procedimento é repetido 9 vezes. O mesmo experimento é realizado para os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O (POSSATO et al., 2020).

## 2.3. Resultados e Discussão

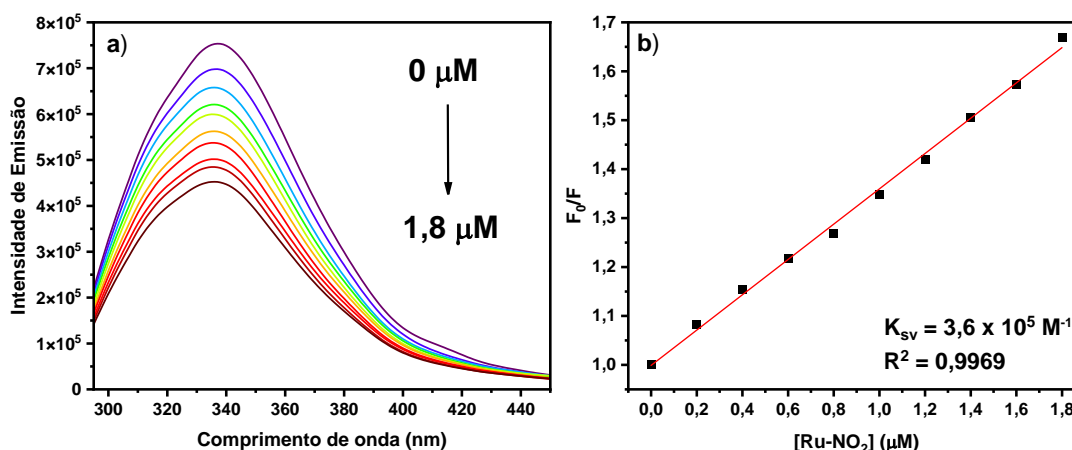
### 2.3.1 Supressão de fluorescência da HSA

Inicialmente, destaca-se que o experimento foi realizado utilizando uma solução de HSA 1 µM e as adições dos complexos foram realizadas de maneira que a concentração do composto em cada adição esteja em uma janela entre 2 e 20 µM. No entanto, o ligante dppz apresenta uma absorção com máximo de 280 nm coincidente com o máximo de absorção da HSA., diminuindo assim a emissão observada no equipamento, porém em grande parte devido à absorção dos fótons pelos compostos de rutênio. Visando contornar esse problema, optou-se

por reduzir as concentrações dos compostos na titulação, de maneira que o valor da absorção da banda IL em 280 nm se mantenha menor que 0,1 até o último ponto da titulação. Por esse motivo, as novas concentrações que retornaram resultados satisfatórios estiveram em uma janela de 0,2 a 1,8  $\mu\text{M}$ . Sabendo disso, os resultados apresentados em mais detalhes serão para o composto Ru-NO<sub>2</sub> e todos os espectros das titulações e curvas obtidas para todos os compostos estão em **ANEXO** neste trabalho.

Como observado na **Figura 68**, o primeiro experimento foi realizado à 27 °C. Foi observada a supressão de fluorescência da HSA por parte do complexo Ru-NO<sub>2</sub>, e visto que o complexo está em concentrações baixas o suficiente para o efeito filtro poder ser desconsiderado, conclui-se que essa supressão está ocorrendo devido à interação do complexo com a biomolécula.

**Figura 68:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ , fendas fixadas em 5 nm) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-NO<sub>2</sub> à 27°C (a) e regressão linear de Stern-Volmer para esse experimento (b).



Fonte: o próprio autor.

A constante calculada apresenta um valor de  $3,6 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , que pode ser considerada relativamente alta e que, portanto, o composto Ru-NO<sub>2</sub> interage de maneira eficiente com a biomolécula (BESSAS et al., 2021; LAMMERS et al., 2013; MOREIRA et al., 2014; ŽIVEC et al., 2012). Para avaliar melhor a natureza dessa interação, após o cálculo de  $k_q$  demonstrar que o mecanismo da interação é estático (**Tabela 19**), a medida dessa constante foi realizada em diversas temperaturas e a equação de Van't Hoff (**Equação XXIII**) foi utilizada para determinação desses parâmetros. O valor da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) também pode ser determinada para cada temperatura para verificação da espontaneidade dessa interação.

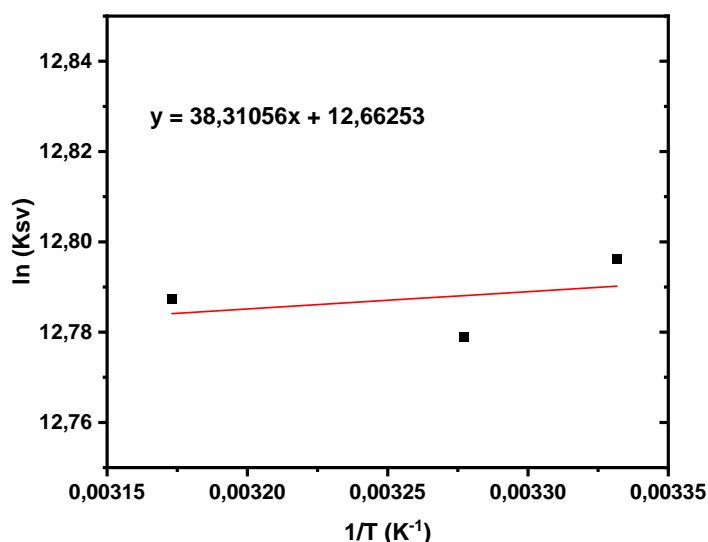


$$\ln K_{SV} = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação XXIII}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_{SV} \quad \text{Equação XXIV}$$

Após a realização do experimento em mais temperaturas, o gráfico de Van't Hoff pode ser construído. Destaca-se que inicialmente o experimento foi planejado para ser realizado nas temperaturas de 27, 32 e 37 °C. No entanto, o ponto em 37 °C se encontrava muito fora da reta de Van't Hoff, portanto para o caso específico do Ru-NO<sub>2</sub>, o experimento em 42 °C também foi realizado, gerando a curva representada na **Figura 69**.

**Figura 69:** Reta de Van't Hoff para a interação do complexo Ru-NO<sub>2</sub> com a HSA.



**Fonte:** o próprio autor.

Comparando os coeficientes angular e linear da reta obtida pelo gráfico de Van't Hoff, é possível obter os parâmetros termodinâmicos da interação do complexo com o DNA. Os valores calculados para todos os complexos estão representados na **Tabela 19**.

Inicialmente, destaca-se que a interação de todos os complexos com a HSA é espontânea em todas as temperaturas estudadas, visto que o valor da energia livre de Gibbs encontrado foi negativo em todos os casos. Além disso, a troca do ligante monodentado não afeta de maneira significativa o valor da constante de interação, indicando que esse ligante não apresenta um papel de destaque na natureza da interação. Apesar da constante do composto Ru-H<sub>2</sub>O ser um pouco menor, sua ordem de grandeza ainda é a mesma dos outros compostos e, além disso, o Ru-H<sub>2</sub>O apresenta uma carga 2+, diferentemente da carga 1+ dos outros, o que pode afetar o valor da constante, causando essa pequena variação, porém ainda não muito significativa.

Os valores de  $k_q$  calculados (**Tabela 19**) são 3 ordens de grandeza superiores ao valor da constante de difusão ( $7,40 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  em 298 K, de acordo com a teoria de Smoluchowski-Stokes-Einstein), indicando que a interação entre os complexos e o HSA ocorre através de um mecanismo estático, isto é, um aduto composto: HSA é formado enquanto a biomolécula ainda está no estado fundamental (BALZANI; CERONI; JURIS, 2014; MARCO MONTALTI et al., 2006) e, portanto, a equação de Van't Hoff pode ser aplicada para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos. O sinal de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  pode indicar a natureza da interação dos compostos com a HSA, seguindo a lógica abaixo (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981):

- $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ : interações hidrofóbicas
- $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ : interações de van der Waals
- $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$ : interações eletrostáticas

Observando os valores encontrados e comparando com essa lógica, conclui-se que a interação apresenta uma maior contribuição eletrostática para os compostos Ru-NO<sub>2</sub> e Ru-Cl, enquanto apresenta uma maior contribuição de forças de van der Waals para o composto Ru-H<sub>2</sub>O. Nenhum desses resultados condiz com o esperado inicialmente, visto que os ligantes grandes e com baixa polaridade tpy e dppz deveriam fazer com que essas interações tenham uma maior contribuição hidrofóbica. Além disso, o composto Ru-H<sub>2</sub>O apresenta uma carga maior, de maneira que o esperado seria uma contribuição maior de interações eletrostáticas com relação aos outros dois compostos, no entanto, foi o único composto que apresentou predominantemente interações de van der Waals. No entanto, a magnitude da variação de entropia da interação é muito baixa, e a inversão no sinal desse valor indicaria uma interação eletrostática, sendo assim pode-se assumir que também existe uma contribuição relativamente significativa dessa natureza para essa interação. Isso ainda não explica o fato de a contribuição eletrostática ser a mais significativa para esses compostos. Visto que não existe na literatura trabalhos mostrando que a HSA interage fortemente com complexos que apresentam o ligante dppz (como existe para o DNA), é plausível de se imaginar que esse ligante não interage da mesma maneira com a HSA. Portanto, os compostos apesar de interagirem de maneira relativamente forte com essa biomolécula, não apresentam esse efeito devido ao ligante dppz e a contribuição hidrofóbica para a interação não é muito relevante.

**Tabela 19:** Valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) e dos parâmetros termodinâmicos calculados para a interação da HSA com os complexos Ru-NO<sub>2</sub>, Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O em todas as temperaturas.

<b>Interação</b>		<b>Ru-NO<sub>2</sub>:HSA</b>			
<b>Temperatura</b> (°C)	<b>K<sub>sv</sub></b> (10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )	<b>k<sub>q</sub></b> (10 <sup>12</sup> M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	<b>ΔH</b> (kJ.mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔS</b> (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	<b>ΔG</b> (kJ.mol <sup>-1</sup> )
27	3,61	3,61			-31,9
32	3,55	3,55	-2,7	97,5	-32,4
42	3,58	3,58			-33,5
<b>Interação</b>		<b>Ru-Cl:HSA</b>			
<b>Temperatura</b> (°C)	<b>K<sub>sv</sub></b> (10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )	<b>k<sub>q</sub></b> (10 <sup>12</sup> M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	<b>ΔH</b> (kJ.mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔS</b> (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	<b>ΔG</b> (kJ.mol <sup>-1</sup> )
27	3,75	3,75			-32,0
32	3,31	3,31	-25,6	21,5	-32,2
37	2,69	2,69			-32,2
<b>Interação</b>		<b>Ru-H<sub>2</sub>O:HSA</b>			
<b>Temperatura</b> (°C)	<b>K<sub>sv</sub></b> (10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )	<b>k<sub>q</sub></b> (10 <sup>12</sup> M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	<b>ΔH</b> (kJ.mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔS</b> (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	<b>ΔG</b> (kJ.mol <sup>-1</sup> )
27	2,48	2,48			-31,0
32	2,12	2,12	-31,6	-2,1	-31,1
37	1,65	1,65			-31,0

### 2.3.2 Supressão de fluorescência do DNA por deslocamento de sonda

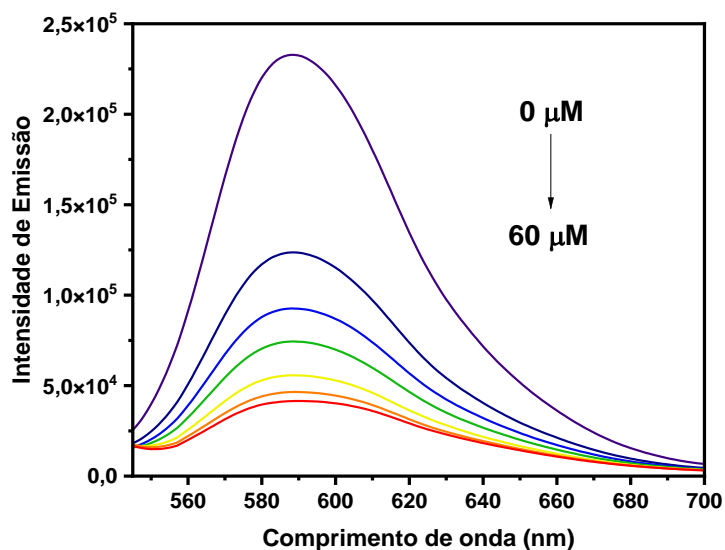
O experimento da supressão de fluorescência para o DNA é realizado de uma maneira diferente do experimento com HSA. A molécula de DNA por si só não apresenta nenhuma emissão na região do UV-Vis, sendo assim, inicialmente não seria possível de realizar esse experimento com o DNA. No entanto, adutos envolvendo outras moléculas com o DNA podem apresentar uma emissão considerável, permitindo a análise por supressão de fluorescência. Essas moléculas que se ligam ao DNA formando um aduto emissivo, nesse contexto, são as sondas. Existem diversas sondas que são utilizadas para diferentes interpretações e análises nos experimentos, porém nesse trabalho a sonda utilizada será o brometo de etídio (EtBr). Essa é uma sonda intercaladora, ou seja, interage com o DNA através da intercalação, da mesma maneira que o ligante dppz interage (GALINDO-MURILLO; CHEATHAM, 2021). Essa característica já explica o motivo da escolha dessa sonda para a realização do experimento. Com a adição de uma solução dos compostos de rutênio à uma solução contendo DNA e EtBr, espera-se que haja competição entre as moléculas dos complexos com as moléculas de EtBr para interagir com o DNA por meio da intercalação, e visto que o aduto complexo:DNA não emite, será observada uma diminuição na intensidade de emissão da solução inicial, indicando que o EtBr (que é emissivo apenas em um ambiente confinado, dentro da estrutura do DNA) foi substituído pelo complexo em questão. Quanto mais favorável for essa interação, maior a quantidade de EtBr que será substituída e maior será a queda na emissão registrada. Além do próprio modelo de Stern-Volmer, a determinação de  $K_{app}$  é feita através da equação simplificada (DENG et al., 2018):

$$K_{EtBr}[EtBr] = K_{app}[Complexo] \quad \text{Equação XXV}$$

Onde  $K_{EtBr} = 1.10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $[EtBr] = 5 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $K_{app}$  é a constante de ligação aparente do complexo em questão e  $[Complexo]$  é a concentração desse complexo que suprime 50% da emissão do aduto EtBr:DNA. Dito isso, o experimento pode ser realizado.

Como observado na **Figura 70**, a adição do composto Ru-NO<sub>2</sub> realmente causou uma supressão da fluorescência do aduto EtBr:fs-DNA, o que era esperado, dada a presença do ligante dppz no complexo, o que torna o complexo um intercalador. A partir dessa observação, é possível calcular os valores de  $K_{app}$  e  $K_{sv}$ . Os espectros das titulações com os outros complexos e as regressões traçadas estão apresentados em **ANEXO** neste trabalho. A **Tabela 20** reúne as constantes obtidas com esses experimentos.

**Figura 70:** Titulação de supressão de fluorescência do fs-DNA ( $\lambda_{exc} = 526$  nm, fendas fixadas em 5 nm) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4 e NaCl 5 mM) com o complexo Ru-NO<sub>2</sub> (298K).



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 20:** Valores de  $K_{app}$  e  $K_{sv}$  calculados para a interação do fs-DNA com os complexos estudados nesse trabalho (298 K).

Composto	$K_{app}$ ( $10^6 M^{-1}$ )	$K_{sv}$ ( $10^4 M^{-1}$ )
Ru-NO <sub>2</sub>	3,1	6,2
Ru-Cl	3,8	7,5
Ru-H <sub>2</sub> O	4,1	8,2

Observando os valores das constantes, nota-se que o complexo pode ser considerado um bom intercalador, devido ao alto valor de  $K_{sv}$ , chegando próximo de uma ordem de grandeza 5, que é obtida para intercaladores eficientes (DENG et al., 2018; ICSEL; YILMAZ, 2013). Além disso, os valores de  $K_{app}$  também se apresentam altos, visto que estão próximos do valor para o EtBr, mostrando que esses complexos apresentam uma eficiência próxima dessa sonda para intercalarem com o DNA. Além disso, é observada novamente o fato de que a mudança do ligante monodentado não afeta de maneira significativa o valor das constantes de interação, mostrando que também para o DNA, esse ligante não apresenta um papel relevante para a intercalação. A interação dos complexos com o DNA será estudada com uma maior

profundidade a partir de métodos mais diretos, resultando em dados mais concretos a respeito da interação de cada complexo com o DNA.

### 3. Espectroscopia de dicroísmo circular

#### 3.1 O princípio da técnica

Visto que essa técnica não foi introduzida no **Capítulo 1**, um breve resumo de seus princípios será descrito aqui. Sabe-se que moléculas quirais, isto é, moléculas que não podem ser sobrepostas à sua imagem especular, interagem com luz polarizada, desviando o caminho dessa luz (JONATHAN CLAYDEN; NICK GREEVES; STUART WARREN, 2012). No caso da espectroscopia de dicroísmo circular, a luz é circularmente polarizada, ou seja, o campo eletromagnético da luz tem uma magnitude constante e está rotacionando em um plano perpendicular à direção da onda eletromagnética. Moléculas quirais, portanto, interagem com essa luz, e a variação da absorbância da luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita é o parâmetro medido pela espectroscopia de dicroísmo circular.

$$CD = \Delta A = A_{esquerda} - A_{direita} \quad \text{Equação XXVI}$$

Uma das maiores utilizações da espectroscopia de dicroísmo circular é no estudo da conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições, incluindo o DNA e a HSA. Nesses casos, a região do UV-Vis é a mais explorada nessa espectroscopia em especial devido à absorção dos grupos amidas existentes nas ligações peptídicas, que apresentam um comportamento quiral e cuja absorção acontece justamente nessa faixa da radiação eletromagnética, sendo extremamente úteis para caracterização da estrutura secundária das proteínas (G.D. FASMAN, 1996).

#### 3.2 Metodologia

##### 3.2.1 Espectroscopia de dicroísmo circular da HSA

O experimento foi realizado utilizando um espectropolarímetro Jasco J-810 disponível na divisão de Bioquímica do Departamento de Química da FFCLRP no laboratório do Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira, com a ajuda do técnico Dr. André Justino. Inicialmente, foi preparada uma solução de HSA (1  $\mu$ M) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com um volume total de 3 mL. Foi preparada também uma solução do composto Ru-NO<sub>2</sub> (1,5 mM) em ACN. Foi registrado o espectro de CD da solução de HSA pura entre 200 e 260 nm. Após o registro, uma alíquota de 4  $\mu$ L da solução de Ru-NO<sub>2</sub> foi adicionada à solução de

HSA. A nova solução contendo HSA e Ru-NO<sub>2</sub> foi deixada sob agitação por 5 minutos e, após esse tempo, um novo espectro foi registrado. Repetiu-se esse processo 9 vezes para garantir que o último ponto apresentasse um excesso de 20 vezes do complexo com relação à HSA e garantindo que a % de ACN na solução não passe de 2%. O mesmo experimento foi realizado com os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O.

### 3.2.2 Espectroscopia de dicroísmo circular do DNA

O experimento foi realizado no mesmo equipamento do item anterior. Foi preparada uma solução de fs-DNA (200 μM) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) em um volume total de 3 mL. Foi preparada também uma solução do composto Ru-NO<sub>2</sub> (7,5 mM) em ACN. Foi registrado o espectro de CD da solução de fs-DNA pura entre 210 e 400 nm. Após o registro, uma alíquota de 4 μL da solução de Ru-NO<sub>2</sub> foi adicionada à solução de HSA. Um novo espectro da nova solução contendo fs-DNA e Ru-NO<sub>2</sub> foi registrado e o processo foi repetido por mais 3 vezes. O mesmo experimento foi realizado com os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 HSA

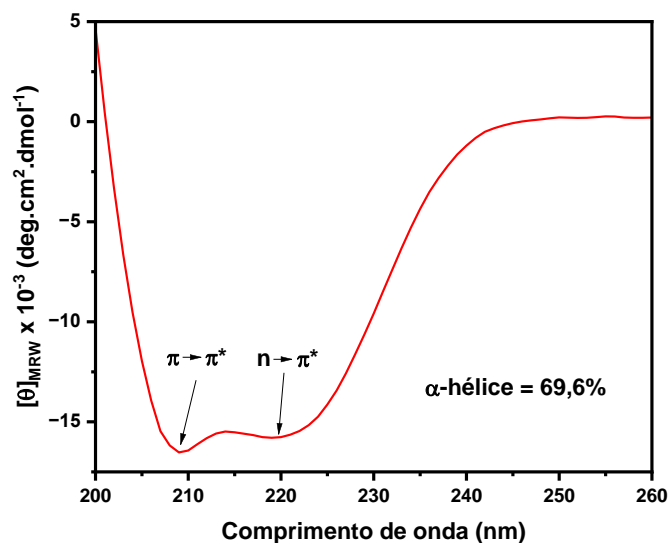
A análise do espectro de CD da HSA é realizada com base nas informações já obtidas para essa biomolécula. Sua estrutura secundária é constituída por 67% de α-hélice e ela apresenta duas bandas negativas na espectroscopia de CD, uma em 222 nm referente à transição  $n \rightarrow \pi^*$  dos grupos amidas e outra em 208 nm referente à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  desses mesmos grupos (H. A. HAVEL, 1996). Inicialmente, foi registrado o espectro da CD da HSA pura, confirmando a presença das duas bandas e calculando a % de α-hélice através da equação:

$$\% \alpha - \text{hélice} = \frac{\theta_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad \text{Equação XXVII}$$

Onde  $\theta_{208}$  é o valor da elipsidade molecular em 208 nm observada no espectro de CD, 33000 se refere à elipsidade para 100% da estrutura α-hélice e 4000 se refere à elipsidade para 0% da estrutura α-hélice na proteína.

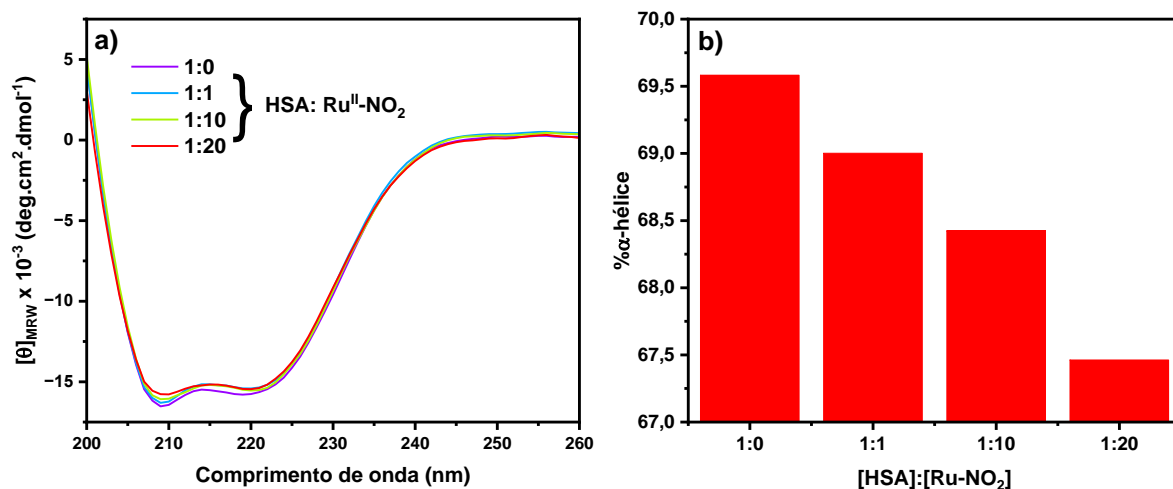
O espectro de CD registrado (**Figura 71**) apresenta as duas bandas esperadas para a HSA e o valor da %α-hélice encontrado também está próximo do esperado. Dessa maneira, o experimento pode ser realizado.

**Figura 71:** Espectro de CD da solução de HSA pura (1  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4, 298 K).



Fonte: o próprio autor.

**Figura 72:** Espectros de CD da HSA (1  $\mu\text{M}$ , tampão Tris-HCl 50mM pH = 7,4, 298 K) na presença do complexo Ru-NO<sub>2</sub> em diferentes proporções (a) e valor da % $\alpha$ -hélice em cada espectro (b).



Fonte: o próprio autor.

Como observado, a adição do complexo Ru-NO<sub>2</sub> causou uma alteração pouco significativa no espectro de CD da HSA, mesmo sendo capaz de suprimir sua fluorescência. Uma variação de apenas 2% na quantidade de  $\alpha$ -hélice não pode ser avaliada como uma interação com a estrutura secundária da proteína, indicando que a interação do complexo com a HSA ocorre de maneira inespecífica ou que é uma interação de superfície (FRANCISCATO;



DE SOUZA, 2016; PARVEEN et al., 2021; SANTOS; SANCHES; DE OLIVEIRA SILVA, 2015; SARMENTO et al., 2022).

As titulações realizadas para os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O estão descritas em **ANEXO** neste trabalho e apresentaram o mesmo comportamento observado para o Ru-NO<sub>2</sub>, modificando de maneira pouco significativa a % $\alpha$ -hélice. A **Tabela 21** mostra os valores de % $\alpha$ -hélice calculados para os pontos selecionados nas titulações de CD da HSA com cada composto estudado nesse trabalho.

**Tabela 21:** Valores de % $\alpha$ -hélice calculados para os pontos selecionadas das titulações de CD dos compostos com a HSA.

<b>Composto</b>	<b>[HSA:Composto]</b>	<b>%<math>\alpha</math>-hélice</b>
<b>Ru-NO<sub>2</sub></b>	1:0	69,6
	1:1	69,0
	1:10	68,4
	1:20	67,5
<b>Ru-Cl</b>	1:0	78,9
	1:1	78,2
	1:10	77,1
	1:20	76,5
<b>Ru-H<sub>2</sub>O</b>	1:0	72,3
	1:1	72,6
	1:10	70,7
	1:20	70,9

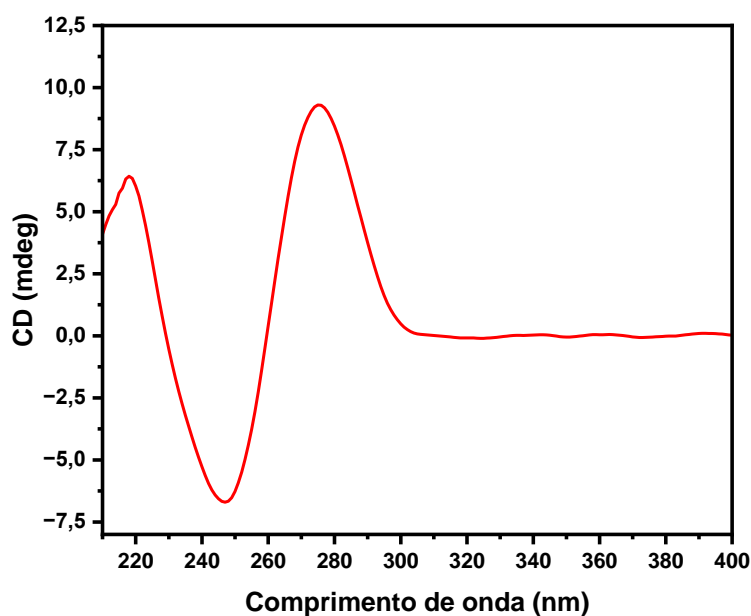
Percebe-se que o valor observado inicialmente para a % $\alpha$ -hélice da HSA pode variar a depender da titulação, apesar do experimento ter sido realizado com a mesma solução de HSA nas três titulações. Isso ocorre devido a variações intrínsecas do próprio equipamento, que pode alterar levemente o valor da elipsidade e, por consequência, o valor da % $\alpha$ -hélice calculado. No entanto, nos três casos, observa-se a mesma tendência de alterar pouco significativamente esse valor, levando às mesmas conclusões do caso do Ru-NO<sub>2</sub>. Conclui-se então que, para todos os compostos, a interação com a HSA não ocorre de maneira específica, dificultando o

entendimento dessa interação. Ao longo deste capítulo, ainda será realizada uma última análise como forma de tentativa de um melhor entendimento dessa interação.

### 3.3.2 DNA

No caso do DNA, será realizada uma análise qualitativa das variações nos espectros de CD obtidos para verificar se existe ou não uma alteração na estrutura secundária do DNA, indicando uma interação por intercalação, dado o mecanismo dessa interação. Inicialmente, destaca-se o espectro de CD da solução de DNA pura.

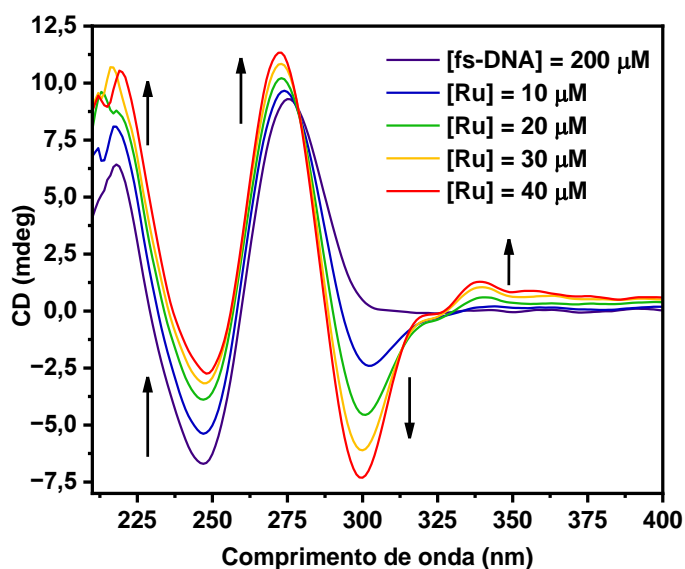
**Figura 73:** Espectro de CD da solução de fs-DNA pura (200  $\mu$ M) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4, 298 K).



Fonte: o próprio autor.

Observando o espectro da **Figura 73**, nota-se 3 bandas, presentes em 218, 247 e 276 nm, de acordo com o esperado. A banda em 218 nm se refere novamente às amidas da ligação peptídica, em uma região próxima à mesma transição observada na HSA, enquanto as transições em 247 e 276 nm se referem às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos aminoácidos aromáticos do DNA (DODERO, 2011; KYPR et al., 2009). A verificação dessas bandas indica que o experimento pode ser realizado.

**Figura 74:** Titulação de CD de uma solução de fs-DNA (200  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com o composto Ru-NO<sub>2</sub> (298 K).



Fonte: o próprio autor.

A **Figura 74** confirma a interação do complexo Ru-NO<sub>2</sub> com a estrutura secundária do DNA, visto que sua adição alterou drasticamente as bandas observadas no espectro de CD da solução pura de DNA, causando tanto um deslocamento no máximo da transição observada quanto um hiper ou hipocromismo. Além disso, foi observado o surgimento de duas novas bandas, referentes ao desvio da luz gerado pelo novo aduto Ru-NO<sub>2</sub>:fs-DNA formado (DEVEREUX et al., 2020; HIORT; LINCOLN; NORDEN, 1993).

O mesmo perfil foi observado na literatura, inclusive a formação de uma nova banda semelhante para um aduto complexo:DNA, para outros complexos de rutênio apresentando ligantes intercaladores (BHAT et al., 2017; TAN et al., 2019; YUN et al., 2003). O mesmo comportamento foi observado também para os outros compostos (espectros das titulações em **ANEXO**), sem muitas alterações significativas com relação ao Ru-Cl indicando que a interação com a estrutura secundária ocorre devido a algo que existe em comum entre os dois compostos, muito provavelmente a presença do ligante dppz, que, como discutido anteriormente, garante a propriedade de intercalador aos complexos.

#### 4. Determinação da temperatura de desnaturação do DNA

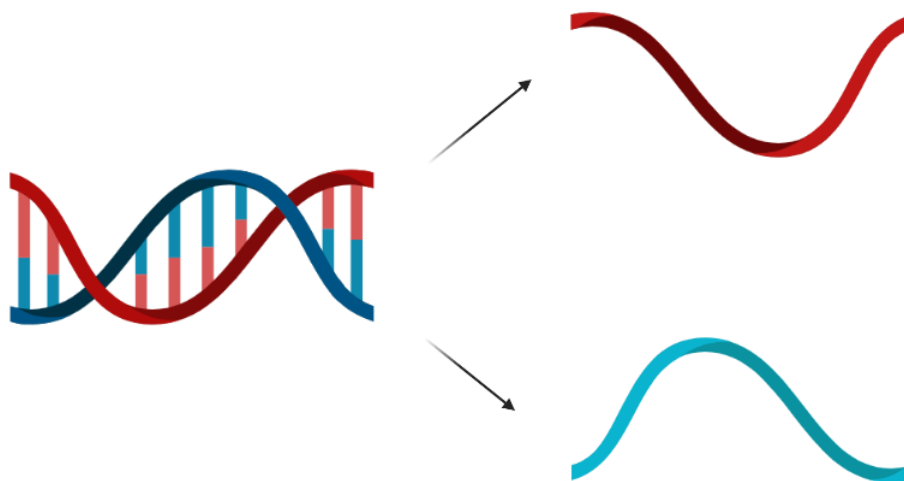
Um experimento que pode ser realizado para identificar a intercalação dos compostos com o DNA de maneira direta é a determinação de sua temperatura de desnaturação. Esses

experimentos foram realizados na *Ohio State University* (OSU), no laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Turro, como parte do projeto BEPE do autor desse trabalho.

#### 4.1 A temperatura de desnaturação do DNA

Como já é conhecido, a estrutura do DNA é composta por uma dupla hélice, que consiste na união de duas cadeias polinucleotídicas a partir de interações fracas (CALLADINE; DREW, 2004). Essas interações, no entanto, podem ser quebradas, transformando a dupla hélice do DNA em duas fitas simples. Esse processo, esquematizado na **Figura 75**, é denominado de desnaturação do DNA. A quebra dessas interações requer uma certa quantidade de energia, que normalmente é associada à temperatura à qual o DNA está submetido. A partir desse conceito, define-se então como a temperatura de desnaturação do DNA (ou *melting temperature*,  $T_m$ ), a temperatura na qual metade da dupla hélice do DNA se dissociou em duas fitas simples. Essa temperatura depende de diversos fatores, como o comprimento do DNA, a sequência de seus nucleotídeos, e a força iônica do meio. De maneira geral, essa temperatura pode variar de 50 a 100 °C (KHANDELWAL; BHYRAVABHOTLA, 2010).

**Figura 75:** Esquema representado a desnaturação da dupla hélice do DNA.



**Fonte:** o próprio autor, criado com Biorender.com.

A determinação da  $T_m$  do DNA é um experimento importante a ser realizado quando se quer determinar se algum analito está interagindo com essa biomolécula, especialmente quando se trata da intercalação. No caso do trabalho em questão, foi verificado através da espectroscopia de dicroísmo circular que os compostos Ru-NO<sub>2</sub>, Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O interagem com o DNA, alterando sua estrutura secundária. No caso da intercalação, isso ocorre, pois, o

ligante dppz está sendo inserido na dupla hélice. Caso essa interação esteja ocorrendo realmente dessa maneira, o que se espera é que a presença da dppz na dupla hélice acabe dificultando a quebra da dupla hélice, pois aumenta as interações entre as fitas (DI PIETRO et al., 2021). Sendo assim, a temperatura de desnaturação do DNA deve aumentar na presença dos compostos. O experimento então foi conduzido para verificar se essa hipótese se confirma.

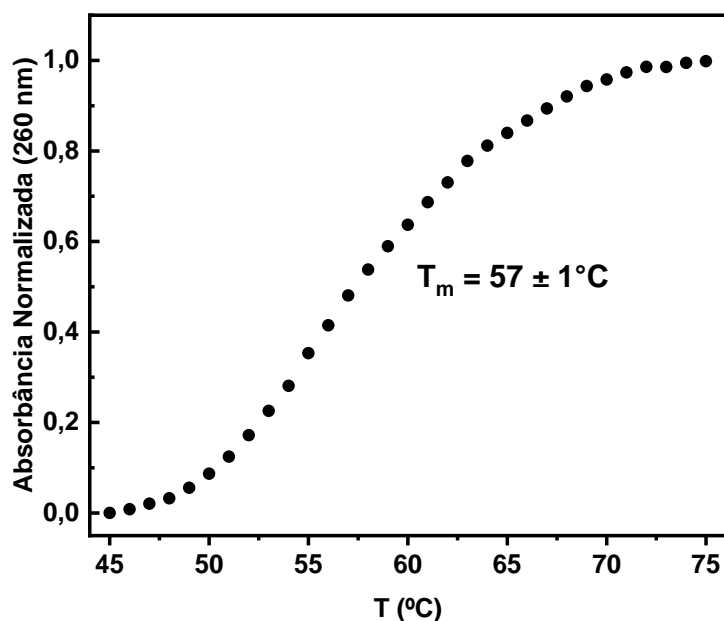
## 4.2 Metodologia

Os espectros eletrônicos foram registrados em espectrômetro Hewlett-Packard 8454 com arranjo de diodos. Foi preparada uma solução de ct-DNA (50  $\mu\text{M}$ ) em tampão  $\text{PO}_4^{3-}$  (1 mM, pH = 7,0, NaCl 1 mM). Foi registrado o espectro eletrônico de absorção dessa solução em uma faixa de 45 a 80  $^{\circ}\text{C}$ , com intervalos de 1  $^{\circ}\text{C}$ , deixando a solução estabilizar na mesma temperatura por 2 minutos. O mesmo experimento foi repetido para uma solução contendo cada composto em uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ , utilizando 2% de DMSO como co-solvente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (CUSUMANO; DI PIETRO; GIANNETTO, 1999).

## 4.3 Resultados e Discussão

Inicialmente, destaca-se aqui que, nesse método, a espectroscopia eletrônica é o método mais simples no qual esse experimento pode ser realizado, já que a absorção em 260 nm característica do DNA ocorre apenas em sua forma de dupla hélice. A desnaturação do DNA gera um hipocromismo nessa banda, tornando possível monitorar essa absorção em função da temperatura. O ponto de inversão da sigmoide é obtido quando se analisa a absorção da solução em 260 nm em função da temperatura. A **Figura 76** mostra a média dos pontos obtidos em triplicata para o experimento realizado com a solução de ct-DNA puro. Como observado, o ponto de inversão da sigmoide representa a  $T_m$  obtida. Espera-se que, caso haja a intercalação dos compostos com o DNA, esse valor aumente para as soluções contendo os compostos.

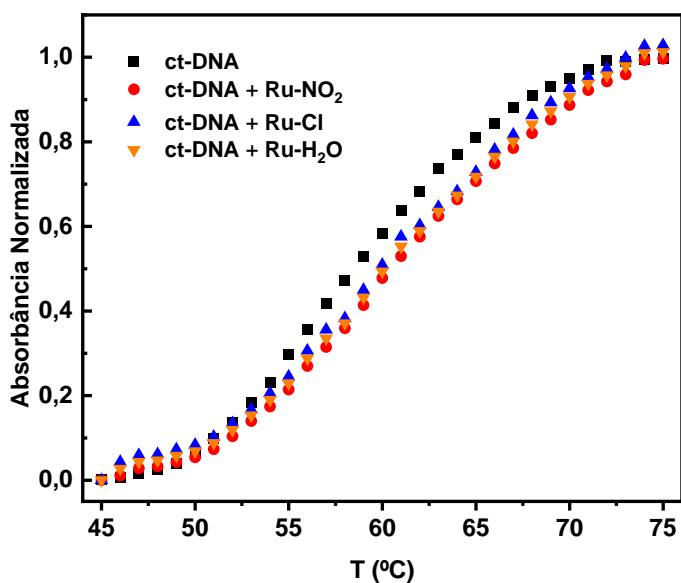
**Figura 76:** Determinação da  $T_m$  de uma solução 50  $\mu\text{M}$  de ct-DNA em tampão  $\text{PO}_4^{3-}$  (1 mM,  $\text{pH} = 7,0$ ,  $\text{NaCl}$  1 mM).



Fonte: o próprio autor.

O mesmo experimento foi realizado para as soluções contendo os compostos  $\text{Ru-NO}_2$ ,  $\text{Ru-Cl}$  e  $\text{Ru-H}_2\text{O}$  e os resultados obtidos estão representados na **Figura 77** e na **Tabela 22**.

**Figura 77:** Determinação da  $T_m$  das soluções de ct-DNA puro (50  $\mu\text{M}$ , tampão  $\text{PO}_4^{3-}$  1 mM,  $\text{pH} = 7,0$ ,  $\text{NaCl}$  1 mM) e com adição dos compostos  $\text{Ru-NO}_2$ ,  $\text{Ru-Cl}$  e  $\text{Ru-H}_2\text{O}$  (5  $\mu\text{M}$ ).



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 22:** Valores de  $T_m$  determinados para as soluções de ct-DNA puro e contendo cada composto estudado.

Solução	$T_m$ ( $\pm 1$ °C)
ct-DNA	57
ct-DNA + Ru-NO <sub>2</sub>	62
ct-DNA + Ru-Cl	61
ct-DNA + Ru-H <sub>2</sub> O	61

Após a realização dos experimentos, conclui-se que a adição dos compostos nas soluções de ct-DNA realmente aumentou a temperatura de desnaturação da biomolécula, indicando que os compostos estão se intercalando com a dupla hélice do DNA. Essa é mais uma comprovação que o sistema Ru-dppz apresenta a capacidade de se intercalar com o DNA, visto que todos os três compostos causaram esse aumento observado na  $T_m$  da biomolécula. Destaca-se que, apesar de complexos metálicos com o ligante dppz apresentarem variações indo de 5 até 20°C (ANGELES-BOZA et al., 2004; KNOLL; TURRO, 2015b; SHI et al., 2010), os valores medidos nesse experimento de 4 e 5°C já são considerados altos o suficiente para indicar uma interação por intercalação dos complexos com o DNA (AROUNAGUIRI et al., 2000; CUSUMANO; DI PIETRO; GIANNETTO, 1999; TAN et al., 2019). Visto que uma razão DNA/composto utilizada foi menor para garantir uma menor solubilidade dos compostos sem que o meio apresente mais de 2% de co-solvente, existem menos moléculas intercaladoras disponíveis no meio, fazendo com que a mudança observada não seja tão acentuada, porém ainda assim conseguindo mostrar que mesmo em concentrações menores, o efeito da intercalação dos compostos no DNA pode ser observado.

Com esses experimentos realizados entre os itens **2 a 4** desse capítulo, é possível garantir que existe uma interação favorável entre os compostos estudados e a molécula de DNA, mostrando que um dos principais objetivos do projeto inicial pôde ser alcançado, criando uma molécula inédita capaz de se intercalar com o DNA enquanto gera <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, como demonstrado no item **1** desse capítulo.

## 5. Docking Molecular

Por fim, um último estudo que pode ser feito para verificar a interação dos compostos com biomoléculas em geral é o *docking* (ou ancoragem) molecular, uma ferramenta *in silico*<sup>22</sup> que permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação de biomoléculas e elucidar essas interações moleculares (MENG et al., 2011). Aliado aos experimentos já realizados, o *docking* é um importante passo no entendimento de como os compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub> interagem com a HSA e como as diferenças em suas estruturas podem afetar essa interação, visto que os resultados obtidos através do método de Stern-Volmer e do dicroísmo circular não são suficientes para o entendimento dessa interação. O estudo foi realizado pelo Dr. Otávio Augusto Chaves, da Universidade de Coimbra, Portugal.

### 5.1 Metodologia

A estrutura cristalográfica da HSA foi obtida do Protein Data Bank com código de acesso 3JRY (HEIN et al., 2010). A estrutura química do composto Ru-NO<sub>2</sub> foi obtida experimentalmente por meio de dados de DRX, enquanto os compostos Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O foram construídos usando o Ru-NO<sub>2</sub> como base e tiveram sua energia minimizada pelo método semiempírico (PM7), disponível no software Spartan'18 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA). Os cálculos de docking molecular foram realizados com o software GOLD 2022.3 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido). Átomos de hidrogênio foram adicionados à HSA seguindo estados tautoméricos e dados de ionização inferidos pelo software GOLD 2022.3 em pH 7,4. Para a estrutura de HSA foram definidos e explorados raios de 8 Å em torno dos três sítios de ligação principais (subdomínios IIA, IIIA e IB – conhecidos como sítios I, II e III, respectivamente) (CHAVES et al., 2023; DA SILVA et al., 2020a). O número de operações genéticas (cruzamento, migração, mutação) durante o procedimento de busca foi definido como 100.000. Os rotâmeros de cadeia lateral foram definidos de acordo com a disponibilidade da biblioteca. ChemPLP foi utilizado como função de pontuação, devido ao menor desvio média quadrática (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) obtido em trabalhos anteriores (CHAVES et al., 2020; CHAVES; MENEZES; IGLESIAS, 2019). O servidor web Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) (ADASME et al., 2021) foi usado para a identificação de interações proteína-ligante e as figuras tridimensionais foram geradas pelo

---

<sup>22</sup> Em ou através de uma simulação computacional.



software PyMOL Molecular Graphics System 1.0 (software Delano Scientific LLC, Schrödinger, Nova York, NY, EUA).

## 5.2 Resultados e Discussão

A fim de oferecer um ponto de vista molecular sobre a interação entre os compostos Ru-NO<sub>2</sub>, Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O com a HSA, cálculos *in silico* via *docking* molecular foram realizados em condições fisiológicas. A **Tabela 23** resume o valor da pontuações do *docking* (adimensional) para os principais sítios de ligação da HSA. Como cada pose obtida pelo software GOLD 2022.3 é considerada como o valor negativo da soma dos termos de energia do componente do tipo mecânico-molecular, que inclui tensões intramoleculares no ligante e interações intermoleculares na associação biomacromolécula-ligante, um valor mais positivo indica uma melhor interação. Assim, de acordo com os cálculos *in silico*, dentre o subdomínio IIA (sítio I) localizado em um bolso de ligação hidrofóbico, subdomínio IIIA (sítio II) também localizado em um bolso de ligação hidrofóbico e subdomínio IB (sítio III) localizado em uma superfície da albumina (CHAVES et al., 2020, 2023; CHAVES; MENEZES; IGLESIAS, 2019; HEIN et al., 2010), o sítio III é a principal região para acomodar os complexos inorgânicos provavelmente devido ao alto impedimento estérico aos ligantes volumosos presentes nos compostos.

**Tabela 23:** Valores de pontuação de *docking* molecular (adimensionais) para a interação entre HSA e os complexos nos sítios de ligação avaliados.

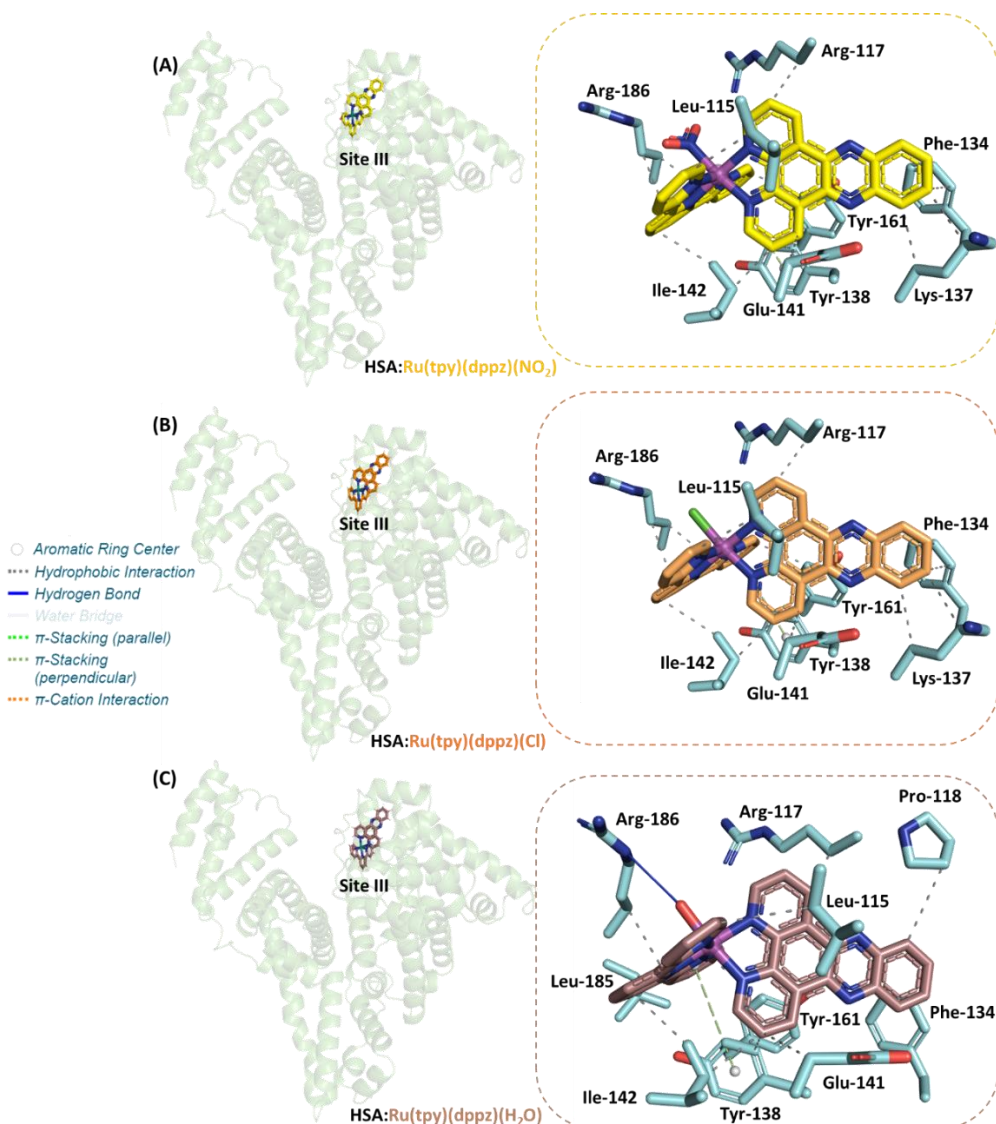
Composto	Sítio I	Sítio II	Sítio III
Ru-NO <sub>2</sub>	27,5	-	73,0
Ru-Cl	28,9	-	73,4
Ru-H <sub>2</sub> O	44,2	-	73,9

Os resultados do *docking* molecular sugeriram principalmente interações hidrofóbicas como as principais forças intermoleculares responsáveis pela estabilidade dos complexos no subdomínio IB (**Tabela 24** e **Figura 78**), no entanto, ligação de hidrogênio também foi detectada apenas entre Arg-186 e o Ru-H<sub>2</sub>O a uma distância de 3,34 Å, provavelmente devido à presença do ligante H<sub>2</sub>O em sua estrutura, que pode realizar ligações de hidrogênio.

**Tabela 24:** Resultados do *docking* molecular para a interação dos compostos com HSA no subdomínio IB (sítio III).

Sistema	Resíduo de Aminoácido	Interação	Distância (Å)
<b>HSA:Ru-NO<sub>2</sub></b>	Leu-115	Hidrofóbica	3,56
	Arg-117	Hidrofóbica	3,12
	Phe-134	Hidrofóbica	3,69
	Lys-137	Hidrofóbica	3,26
	Tyr-138	Hidrofóbica	3,51
	Glu-141	Hidrofóbica	3,68
	Ile-142	Hidrofóbica	2,92
	Tyr-161	Hidrofóbica	3,33
	Arg-186	Hidrofóbica	3,82
<b>HSA:Ru-Cl</b>	Leu-115	Hidrofóbica	3,54
	Arg-117	Hidrofóbica	3,07
	Phe-134	Hidrofóbica	3,69
	Lys-137	Hidrofóbica	3,28
	Tyr-138	Hidrofóbica	3,55
	Glu-141	Hidrofóbica	3,67
	Ile-142	Hidrofóbica	2,93
	Tyr-161	Hidrofóbica	3,36
	Arg-186	Hidrofóbica	3,76
<b>HSA:Ru-H<sub>2</sub>O</b>	Leu-115	Hidrofóbica	3,95
	Arg-117	Hidrofóbica	2,87
	Pro-118	Hidrofóbica	3,98
	Phe-134	Hidrofóbica	3,62
	Tyr-138	Hidrofóbica	3,67
	Glu-141	Hidrofóbica	3,73
	Ile-142	Hidrofóbica	3,11
	Tyr-161	Hidrofóbica	3,54
	Leu-185	Hidrofóbica	3,75
	Arg-186	Hidrofóbica	3,89
	Arg-186	Ligação de H	3,34

**Figura 78:** Melhor posição de ancoragem para a interação (A) HSA:Ru-NO<sub>2</sub>, (B) HSA:Ru-Cl e (C) HSA:Ru-H<sub>2</sub>O no subdomínio IB. Resíduos de aminoácidos selecionados, Ru-NO<sub>2</sub>, Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O estão representados em ciano, amarelo, laranja e marrom, respectivamente. Cores dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro e Ru(II): magenta.



Fonte: o próprio autor.

### 5.3 A comparação dos cálculos *in silico* com os experimentos realizados

Quando se analisa os resultados obtidos pelo *docking* molecular, é necessária uma comparação com os dados obtidos experimentalmente. Os resultados da interação dos compostos com a HSA não são conclusivos para determinar a natureza dessa interação, visto que os resultados apontaram para interações hidrofóbicas, ao contrário das interações eletrostáticas encontradas utilizando o modelo de Stern-Volmer. Essa diferença pode ocorrer

devido à alguns fatores. Os primeiros a serem levados em conta são as aproximações utilizadas para o cálculo do *docking*, sendo a mais impactante delas a de que o cálculo não leva em conta a hidratação da molécula que está interagindo com a biomolécula, o que pode influenciar diretamente nos resultados observados pelo método de Stern-Volmer, visto que a hidratação está relacionada diretamente com a carga das moléculas. O resultado do *docking* é obtido através da estrutura das moléculas, portanto, os ligantes volumosos e pouco polares fazem com que os resultados apontem como interações hidrofóbicas predominantes. Para um cálculo mais refinado, deve-se levar em conta a termodinâmica do processo, inserindo a hidratação como um fenômeno importante no cálculo. Destaca-se também que outro fator a se pensar é de que o modelo de Stern-Volmer pode não ser o mais adequado para esse sistema, visto que inicialmente o método foi desenvolvido para a análise da supressão de fluorescência de moléculas orgânicas pequenas e que a HSA é uma biomacromolécula que apresenta uma dimensão e comportamento muito diferentes de moléculas orgânicas menores.

No entanto, apesar da natureza das interações não poder ser totalmente elucidada com esses resultados, outros resultados obtidos experimentalmente a respeito da interação dos compostos com a HSA podem ser mais bem explicados com o *docking*. O primeiro é de que as constantes de Stern-Volmer obtidas para os três compostos estão na mesma ordem de grandeza, indicando que a alteração do ligante monodentado não afeta de maneira relevante essa interação. Levando em conta que o sítio que apresentou a maior pontuação de *docking* é o subdomínio IB da HSA, as pontuações dos três compostos nesse sítio foram muito próximas, confirmando o fato de que os três interagem de maneira semelhante com a biomolécula. Além disso, o subdomínio IB se localiza em uma superfície da HSA, o que corrobora com os resultados observados no dicroísmo circular, de maneira que uma interação com a superfície da HSA não altera significativamente sua estrutura secundária e, portanto, não apresenta uma alteração significativa no espectro de CD e na % de  $\alpha$ -hélice da HSA.

## **6. Fotoliberação de NO por cronoamperometria**

Visto que o composto Ru-NO<sub>2</sub> é capaz tanto de gerar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quanto de intercalar com o DNA, a última aplicação discutida no **Capítulo 1** é a capacidade desse composto de liberar NO a partir de um estímulo luminoso. Por ser o único composto da série com esse potencial, o estudo será realizado apenas para o Ru-NO<sub>2</sub>.

## 6.1 O princípio da técnica

Como o próprio nome diz, a cronoamperometria é uma técnica que visa medir a corrente de uma solução em função do tempo utilizando um eletrodo de trabalho com potencial constante (ALLEN J. BARD; LARRY R. FAULKNER, 2000).

No caso do experimento realizado nesse composto, visto que o objetivo é detectar a presença do radical NO na solução, é utilizado um eletrodo sensível ao NO, de maneira que qualquer aumento na corrente registrada deve ocorrer exclusivamente devido à presença dessas moléculas na solução. A seletividade de NO é obtida através de uma membrana seletiva para algumas moléculas de gases. Após passar por essa membrana, o NO reage com a superfície do eletrodo de trabalho, resultando em uma corrente elétrica que é registrada. Sendo assim, a solução de Ru-NO<sub>2</sub> é preparada protegendo-a da luz, e após a introdução do eletrodo na solução, sua corrente é medida em função do tempo até que o eletrodo estabilize e a corrente se mantenha contínua. Após essa estabilização, a solução é irradiada com um laser em um comprimento de onda específico e é verificado se houve ou não um aumento da corrente da solução, indicando, portanto, se moléculas de NO realmente foram liberadas pelo composto.

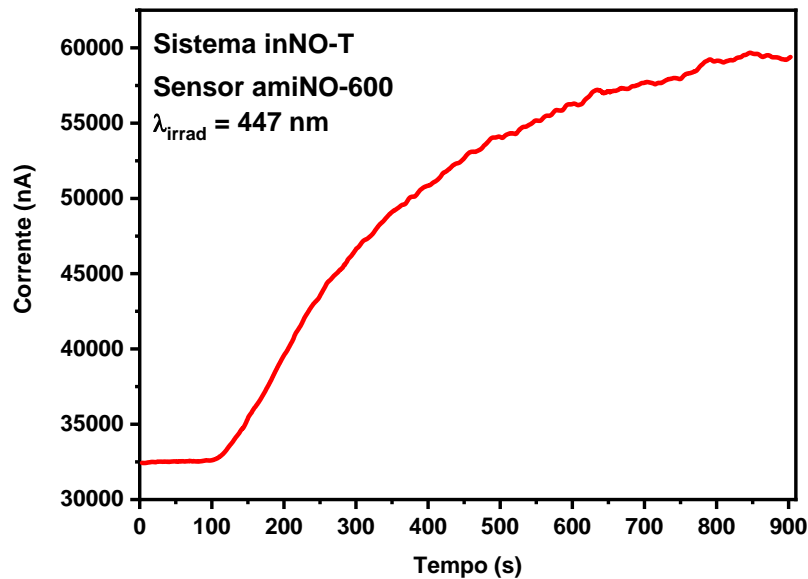
## 6.2 Metodologia

O experimento foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, pela técnica Dr.<sup>a</sup> Juliana C. Biazotto. Sob a proteção da luz, foi preparada uma solução aquosa com 2% de DMSO do composto Ru-NO<sub>2</sub> em uma concentração de 5 µM. O equipamento utilizado foi o *Nitric Oxide Measuring System with Temperature Recording and Compensation* (inNO-T) com o sensor amiNO-600 para detecção do NO. Após o preparo da solução e estabilização da corrente, a solução foi irradiada com um laser de 447 nm até que a corrente se estabilize novamente. O mesmo experimento foi realizado utilizando um laser de 377 nm (CARNEIRO et al., 2014).

## 6.3 Resultados e Discussão

Como descrito no item anterior, o experimento foi realizado utilizando dois comprimentos de onda diferentes e apenas o ácido ascórbico sem a utilização da luz. Inicialmente, o experimento utilizando um laser de 447 nm apresentou resultados satisfatórios no que se diz respeito à fotoliberação de NO do complexo Ru-NO<sub>2</sub> (**Figura 79**).

**Figura 79:** Cronoamperograma da fotoliberação de NO de uma solução aquosa com 2% de DMSO do composto Ru-NO<sub>2</sub> (5 μM).

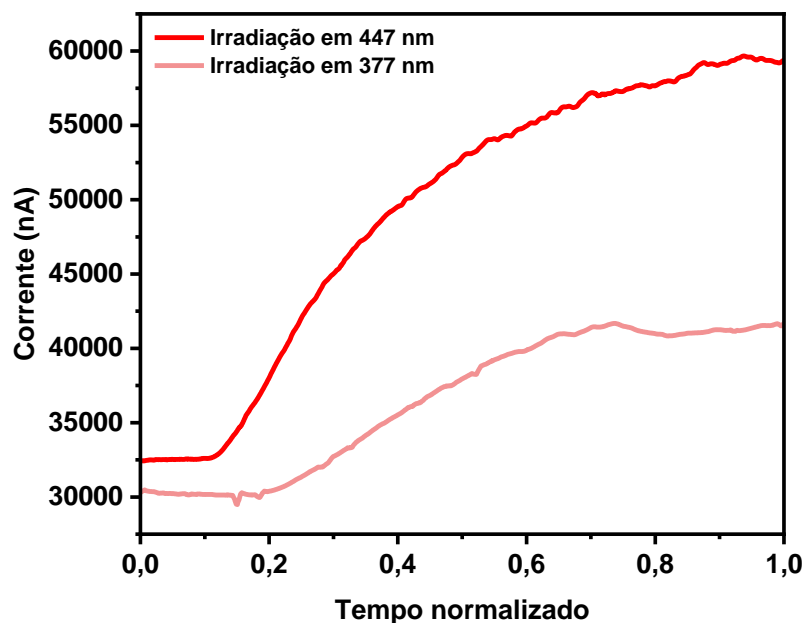


**Fonte:** o próprio autor.

Irradiando a solução em 447 nm, foi observado um aumento significativo da corrente da solução do Ru-NO<sub>2</sub>, indicando que a liberação de NO ocorreu a partir do estímulo luminoso. Esse resultado comprova mais uma vez a capacidade dos nitritos de rutênio serem capazes de liberar NO mediados pela luz. Um destaque que se faz para esse tipo de experimento é de que essa liberação não pode ser quantizada apenas com o uso do cronograma, visto que a espécie NO em solução é extremamente reativa tanto com água quanto com oxigênio (THOMAS et al., 2001). Visto que o experimento é realizado em solução aquosa em atmosfera comum, essas reações paralelas ocorrem e, portanto, nem todo NO que é liberado pelo composto pode ser detectado pelo eletrodo seletivo.

No entanto, uma vantagem da utilização desse método é a comparação qualitativa da fotoliberação de NO nas diferentes condições aplicadas ao experimento. A comparação das curvas de fotoliberação de NO nas três condições nas quais o experimento foi realizado, normalizando a escala de tempo, está ilustrado na **Figura 80**.

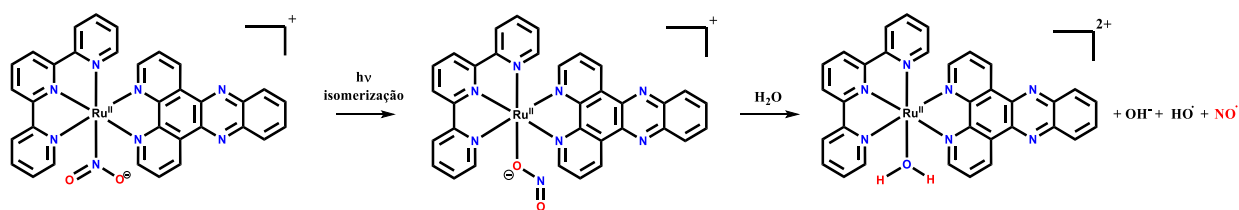
**Figura 80:** Comparação dos cronoamperogramas de fotoliberação de NO do composto Ru-NO<sub>2</sub> nas três condições nas quais o experimento foi realizado.



Fonte: o próprio autor.

Conforme observado, a liberação de NO quando o composto foi irradiado em 447 nm é maior do que quando irradiado em 377 nm. O mecanismo proposto para essa reação, conforme a reação já apresentada no final do **Capítulo 3**, envolve a isomerização do ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> seguido da entrada de uma molécula de água em seu sítio de coordenação, formando o íon hidroxila e os radicais OH e NO (SILVA et al., 2023a).

**Figura 81:** Esquema representando o mecanismo da fotoliberação do NO a partir do composto Ru-NO<sub>2</sub>.



Fonte: o próprio autor.

Comparando a liberação nos dois comprimentos de onda utilizados, é evidente que a fotoliberação é mais eficiente no comprimento de onda de 447 nm. Esse fato é explicado de maneira simples, visto que o valor da absorção do composto nesse comprimento de onda é consideravelmente maior do que em 377 nm, conforme ilustrado no espectro eletrônico da **Figura 27**.

A literatura normalmente apresenta a liberação de NO a partir de nitrosilos de rutênio que são normalmente irradiados com comprimentos de onda menores que 400 nm, chegando quase na região do UV (BARBOSA et al., 2017; DE LIMA et al., 2005). Mesmo que a natureza desse experimento não permita uma comparação quantitativa, foi observado que o composto Ru-NO<sub>2</sub> apresente uma maior eficiência de liberação de NO em 447 nm, um comprimento de onda menor e mais próximo da janela terapêutica, algo que vem sendo desejado para os nitrosilos de rutênio.(BUKHANKO et al., 2018; GIRI et al., 2020b, 2020a). Essa observação garante uma vantagem dos nitritos de rutênio com relação aos nitrosilos de rutênio: o deslocamento do comprimento de onda do máximo de absorção para uma região de menor energia. Visto que o ligante NO<sub>2</sub><sup>-</sup> apresenta um caráter π-ácido menos acentuado que o ligante NO<sup>+</sup>, a energia da transição MLCT apresenta uma energia menor nos nitritos de rutênio, tornando possível a liberação de NO com um comprimento de onda maior e, com mudanças adequadas na estrutura, até dentro da janela terapêutica, tornando sua aplicação como metalofármaco ainda mais viável.

## 7. Citotoxicidade em células pulmonares

Naturalmente, o próximo passo do trabalho, após verificar as propriedades biológicas anteriores, é avaliar a citotoxicidade dos compostos estudados nesse trabalho, portanto, o último teste realizado foi a verificação da citotoxicidade *in vitro*<sup>23</sup> dos compostos Ru-NO<sub>2</sub>, Ru-Cl e Ru-H<sub>2</sub>O. Os ensaios foram realizados pela Dr.<sup>a</sup> Amanda Blanque Becceneri, pós-doutoranda do Laboratório de Fotoquímica e Química Bioinorgânica (LaFQBio) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva.

### 7.1 Metodologia

#### 7.1.1 Diluição dos complexos

Os complexos foram solubilizados em DMSO. As concentrações utilizadas nos ensaios foram preparadas em meio de cultura sendo a concentração de 1% de DMSO a máxima utilizada.

---

<sup>23</sup> Ensaio biológico realizado fora de um organismo vivo, normalmente em células, tecidos ou órgãos isolados.



### 7.1.2 Linhagem Celular e Cultivo

As células não-tumorais pulmonares da linhagem MRC-5 e as células tumorais da linhagem A549 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2 mM) e os antibióticos penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Estas foram mantidas em incubadora úmida com temperatura constante de 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

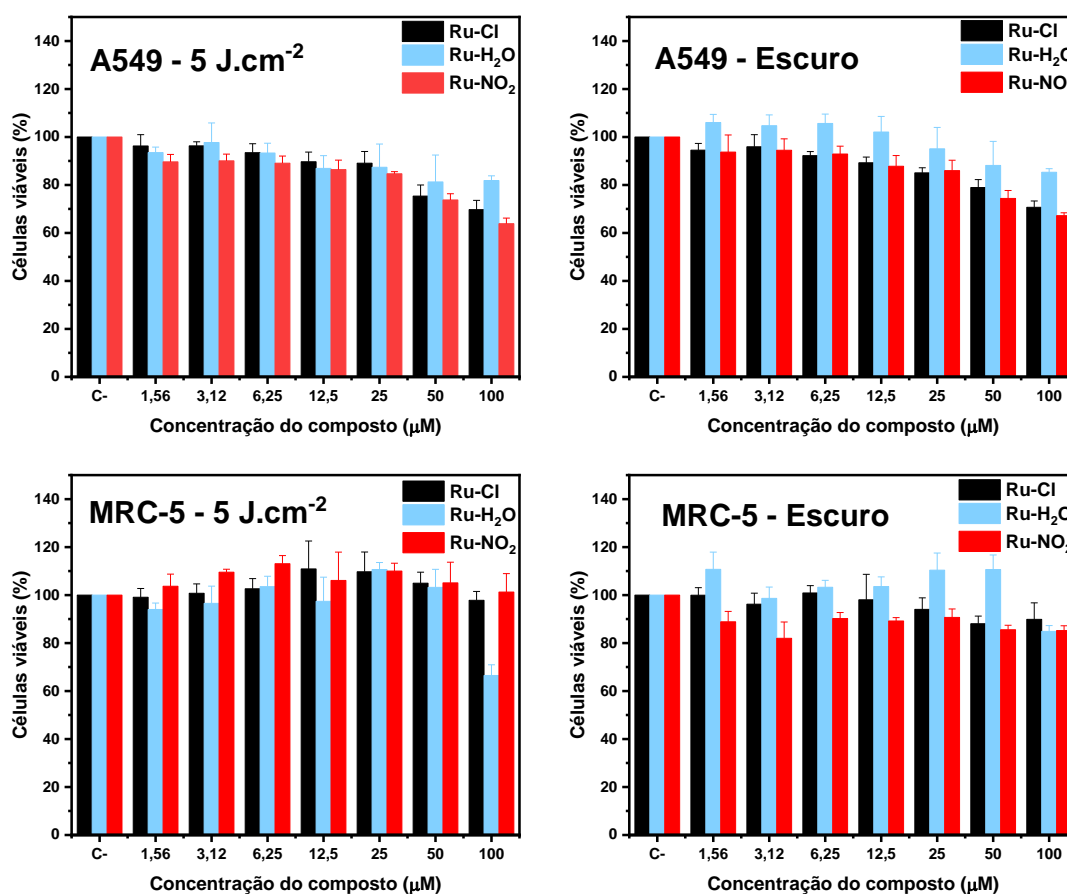
### 7.1.3 Ensaio da Viabilidade Celular

Para avaliar os efeitos dos complexos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub> na viabilidade celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços estéreis (1x10<sup>4</sup> células/poço) e mantidas em incubadora úmida (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 h. Em seguida, foram adicionadas concentrações dos complexos (de 0 a 100 µM) aos poços e as células mantidas por mais 24 h nas mesmas condições de cultivo. Após esse período, o tratamento foi removido e meio sem vermelho de fenol foi adicionado a cada poço. As células irradiadas receberam a dose de 5 J.cm<sup>-2</sup> utilizando um conjunto de LED azul com comprimento de onda de emissão de 415 nm e irradiância de 0,05026 W.cm<sup>-2</sup>, enquanto as células não irradiadas permaneceram no escuro. As células foram então incubadas nas mesmas condições anteriores por mais 20 h. Após o período, o sobrenadante foi removido e adicionada uma solução de 0,5 mg/mL de MTT por 3 horas. Os cristais de formazan formados durante o período foram solubilizados em DMSO e a absorbância foi medida em um leitor de placa de ELISA (Biotek Synergy HT) a um comprimento de onda de 540 nm (MOSMANN, 1983). O ensaio foi realizado em quadruplicata.

## 7.2 Resultados e Discussão

Após a realização dos experimentos, a **Figura 82** reúne os resultados obtidos após 24 h de incubação das células com os compostos estudados neste trabalho.

**Figura 82:** Atividade citotóxica dos complexos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub> nas células MRC-5 e A549 após 24 h de incubação.



Fonte: o próprio autor.

Analisando os resultados utilizando as estruturas de cada composto, obtém-se algumas conclusões. A primeira é de que, em geral, os compostos são citotóxicos apenas para as células da linhagem A549, ou seja, células tumorais. O único composto que apresenta uma citotoxicidade considerável para as células saudáveis é o Ru-H<sub>2</sub>O à 100 μM quando irradiado. No entanto, esse ponto não segue a tendência apresentada em todos os outros pontos e, portanto, muito provavelmente ocorreu devido à algum problema na realização do experimento.

Com relação à citotoxicidade geral observada para esses compostos, nota-se que nenhum deles conseguiu atingir a concentração necessária para que a viabilidade celular caia para 50%, impossibilitando o cálculo de seus valores de IC<sub>50</sub>. Li et al. demonstraram que a capacidade de uma série de compostos polipiridínicos são citotóxicos para células A549, com valores de IC<sub>50</sub> variando de 13,2 a 33,5 μM, e relacionam a capacidade dos compostos de inibir o crescimento das células tumorais com sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio

(ROS) (LI et al., 2014). Seguindo esse argumento, o fato de os complexos estudados neste trabalho não serem muito citotóxicos pode ser explicado devido ao rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  relativamente baixo. No entanto, visto que a citotoxicidade foi observada seletivamente para células tumorais, a estrutura desses compostos pode ser considerada promissora para a criação de novos candidatos a metalofármacos, baseando-se na estrutura geral  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{L}]^{n+}$ .

Por fim, um último detalhe é importante de ser destacado. Observando a linhagem de células saudáveis MRC-5, é observado um efeito de citoproteção do composto Ru-NO<sub>2</sub> quando a cultura de células é irradiada. Essa citoproteção ocorre devido à liberação do NO, demonstrada no item 6 desse capítulo. Visto que o complexo em questão é um nitrito de rutênio, espera-se que o rendimento quântico de liberação de NO desse composto seja menor do que para o composto análogo Ru-NO. Sendo assim, o fato de o composto liberar o NO em menor quantidade acabou tornando a concentração do NO baixa o suficiente na célula para gerar o efeito de citoproteção, que é um dos efeitos secundários do NO no organismo em pequenas concentrações (IGNARRO, 2009; KHAN et al., 2020; NICHOLS et al., 2012; YANG; ZELIKIN; CHANDRAWATI, 2018). Esse efeito demonstra uma nova vantagem para os nitritos de rutênio, que devido à seu menor rendimento de liberação de NO, pode gerar outros efeitos positivos dessa molécula no organismo quando em pequenas concentrações. Destaca-se também que o composto Ru-H<sub>2</sub>O gerou um aumento na viabilidade celular das células MRC-5 no escuro, porém esse efeito pode ser considerado como alguma interferência no experimento, visto que foi observado apenas em alguns pontos e não pode ser racionalizado com a estrutura da molécula. No entanto, é importante de se manter esse efeito destacado, para verificar se testes *in vitro* futuros com estruturas análogas podem apresentar resultados semelhantes.

Com isso, encerra-se o estudo das aplicações e propriedades biológicas dos compostos estudados nesse trabalho, concluindo-se que todos os compostos apresentam todas as propriedades esperadas e que, com as devidas alterações em suas estruturas, podem vir a se tornar candidatos ainda mais promissores a metalofármacos.

## ***CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS***

Após todos os estudos realizados neste trabalho, algumas conclusões importantes são obtidas. Foi possível realizar a síntese e caracterização do composto Ru-Cl, conforme pretendido originalmente. No entanto, o composto inédito Ru-NO apresentou problemas de instabilidade e teve que ser substituído pelo composto Ru-NO<sub>2</sub>, também inédito, que apresentava os mesmos potenciais como um candidato a metalofármaco. O composto Ru-H<sub>2</sub>O também foi introduzido como um terceiro ponto de comparação. As propriedades eletrônicas e fotofísicas desses compostos foram investigadas, juntamente com as propriedades biológicas a partir do estudo da interação dessas moléculas com o DNA e a HSA, avaliação de citotoxicidade *in vitro* e verificação da geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e da fotoliberação de NO, no caso do Ru-NO<sub>2</sub>.

A caracterização do composto inédito Ru-NO<sub>2</sub> a partir da espectrometria de massas e difração de raios-X indica que o composto foi sintetizado e apresenta a composição e estrutura esperadas. Outra confirmação de sua estrutura pôde ser obtida a partir dos deslocamentos químicos obtidos para esse composto a partir do espectro de <sup>1</sup>H-RMN, que mesmo sendo muito próximo ao do composto Ru-Cl, introduz uma mudança significativa no deslocamento dos núcleos de H mais desblindados, indicando a troca do ligante monodentado. Os espectros eletrônicos confirmaram a troca do ligante Cl<sup>-</sup> pelos ligantes H<sub>2</sub>O ou NO<sub>2</sub><sup>-</sup> devido à um deslocamento hipsocrômico do  $\lambda_{\text{máx}}$  da transição e a espectroscopia de emissão eletrônica revelou que o rendimento quântico desse processo seguiu a ordem Ru-NO<sub>2</sub> > Ru-H<sub>2</sub>O > Ru-Cl. A partir das medidas de fs-TA e TCSCP, foi confirmado que os tempos de vida dos estados excitados seguem a mesma tendência observada para o rendimento quântico de emissão, conforme esperado. A troca do ligante Cl<sup>-</sup> pelos ligantes H<sub>2</sub>O e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> também pôde ser verificada pelo surgimento de novas bandas nos espectros vibracionais dos compostos.

A instabilidade do composto Ru-NO foi justificada com base em informações obtidas na literatura, experimentos realizados no laboratório e cálculos *in silico* para confirmação da hipótese de que, nesse composto, a estrutura  $\pi$ -conjugada do ligante dppz juntamente com o ligante tpy faz com que esses ligantes sejam mais  $\pi$ -ácidos, retirando muita densidade eletrônica do centro metálico e tornando a coordenação do NO<sup>+</sup> inviável termodinamicamente, visto que esse ligante monodentado também apresenta um forte caráter  $\pi$ -ácido e, devido à falta de estabilização pelo efeito quelato, apresenta uma barreira de ativação muito alta para se coordenar ao complexo. Somado esse efeito, existe também a distorção causada pelos ligantes volumosos, que abaixa a energia dos níveis <sup>3</sup>MC do complexo, causando a liberação do ligante monodentado.

Foi realizado um estudo em paralelo a este trabalho referente ao efeito solvatocrômico da série de compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-py utilizando os métodos multiparamétricos de Kamlet-Taft e Catalán. Os métodos multiparamétricos se provaram mais eficazes para descrever a interação dos compostos com o solvente quando comparados com os métodos monoparamétricos, de maneira que o método de Catalán, por apresentar um maior número de parâmetros, retornou resultados mais satisfatórios e coerentes com as estruturas dos compostos, de maneira que o ligante monodentado afeta diretamente na contribuição relativa de cada parâmetro do solvente para a energia da transição MLCT.

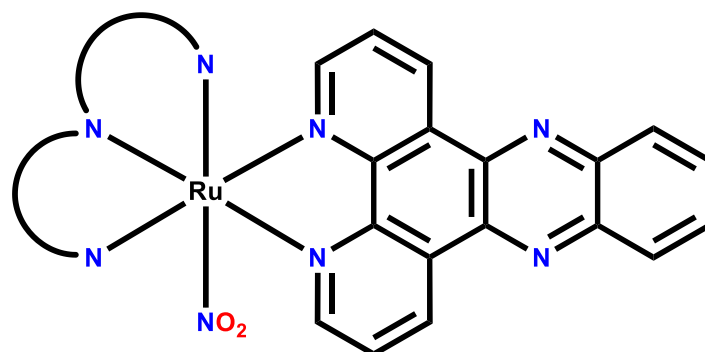
Os estudos das propriedades e aplicações biológicas foram realizados para os compostos Ru-Cl, Ru-H<sub>2</sub>O e Ru-NO<sub>2</sub>. Inicialmente, verificou-se a capacidade dos compostos de gerarem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a partir da espectroscopia eletrônica utilizando a sonda DPBF. Todos os compostos foram capazes de gerar a espécie reativa de oxigênio, e os valores de rendimento quântico observados seguiram a tendência Ru-NO<sub>2</sub> > Ru-H<sub>2</sub>O > Ru-Cl, conforme esperado pelo tempo de vida do estado excitado desses compostos, de maneira que um composto com um tempo de vida maior do estado excitado consegue realizar a transferência de energia de excitação para o <sup>3</sup>O<sub>2</sub> de maneira mais eficiente. A interação dos compostos com DNA e HSA também foi estudada a partir do método de Stern-Volmer, da espectroscopia de dicroísmo circular, temperatura de desnaturação do DNA e *docking* molecular no caso da HSA. A interação com DNA foi provada como intercaladora a partir do deslocamento observado da sonda EtBr com valores de K<sub>SV</sub> e K<sub>app</sub> altos, indicando uma forte interação. Além disso, foi observada uma alteração na estrutura secundária do DNA a partir da espectroscopia de CD e um aumento na sua temperatura de desnaturação, ambas observações que corroboram para a intercalação dos compostos com o DNA. Já no caso da HSA, o método de Stern-Volmer retornou também valores relativamente altos de K<sub>sv</sub>, indicando uma interação forte, porém com uma alta contribuição eletrostática e de forças de van der Waals, no caso do Ru-H<sub>2</sub>O. A espectroscopia de CD não apresentou mudanças significativas no valor da % $\alpha$ -hélice da proteína, um resultado que aliado aos dados de *docking*, indica que a interação dos compostos com a HSA ocorre de maneira superficial, em especial no subdomínio IB da biomolécula, porém com uma predominância de forças hidrofóbicas, o que mostra que o estudo da natureza das interações complexo:HSA ainda deve ser investigada mais a fundo para uma melhor compreensão. Também foi confirmada a capacidade do composto Ru-NO<sub>2</sub> liberar NO fotoquimicamente a partir da técnica de cronoamperometria, de maneira que a irradiação com um comprimento de onda mais próximo do  $\lambda_{\text{max}}$  da MLCT do complexo causou

uma maior liberação do NO. Por fim, foi realizado o ensaio *in vitro* da citotoxicidade dos compostos com células pulmonares tumorais e não-tumorais, revelando que os compostos apresentam uma leve citotoxicidade seletiva para células tumorais e que o complexo Ru-NO<sub>2</sub>, quando irradiado, libera NO em uma concentração adequada para gerar um efeito de citoproteção das células.

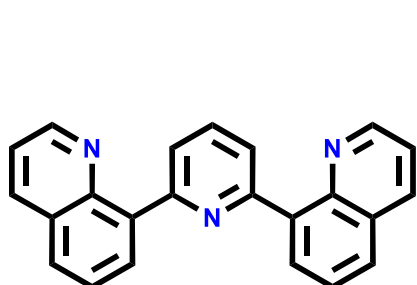
Encerra-se esse trabalho com algumas perspectivas futuras para o sistema [Ru(tpy)(dppz)L]<sup>n+</sup>. Como observado, essa série de compostos apresentou valores de tempos de vida pequenos quando comparados à compostos de rutênio contendo o ligante 2,2'-bipiridina (bpy), devido à presença da tpy em suas estruturas. No entanto, o tempo de vida foi maior do que o observado para o composto [Ru(tpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, como já discutido anteriormente, indicando que a presença do dppz em sua estrutura aumenta o tempo de vida do estado <sup>3</sup>MLCT. Esse tempo de vida reflete diretamente na fotoquímica desses complexos, afetando os valores de rendimento quântico de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (o que afeta a citotoxicidade desses complexos) e a fotoliberação de NO, no caso do Ru-NO<sub>2</sub>, visto que essa liberação também depende da população do estado excitado <sup>1</sup>MLCT do composto. Sendo assim, uma proposta interessante para dar seguimento a este trabalho é a criação de uma nova série com alterações na estrutura do ligante tridentado, de maneira que sua síntese continue facilitada pelo número de átomos coordenantes, porém que ocorra uma modulação dos níveis eletrônicos à ponto de fazer com que o tempo de vida do estado <sup>3</sup>MLCT seja maior. Espera-se que a mesma instabilidade do complexo Ru-NO seja observada para outros complexos com a estrutura parecida, portanto a criação de novos nitritos de rutênio com a estrutura baseada nos complexos estudados nesse trabalho seja uma ideia mais promissora, além de garantir que a energia da transição <sup>1</sup>MLCT continue baixa quando comparada à energia de transição dos nitrosilos de rutênio, permitindo a utilização de um comprimento de onda mais próximo da janela terapêutica para liberar NO de maneira fotoinduzida.

A **Figura 83** apresenta algumas propostas de estruturas que, baseadas nos trabalhos de Hammarström et al. e Brown et al. (BROWN et al., 2012; HAMMARSTRÖM; JOHANSSON, 2010), podem apresentar estados excitados com maiores tempos de vida e melhorar ainda mais suas propriedades biológicas. Destaca-se que é interessante de manter a presença do dppz, visto que foi comprovado neste trabalho que esses complexos podem se intercalar com o DNA.

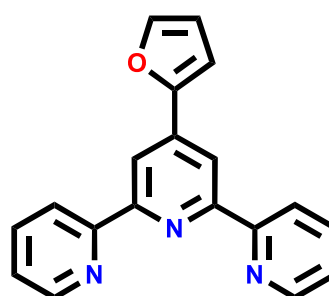
**Figura 83:** Estruturas propostas para dar seguimento aos estudos conduzidos neste trabalho.



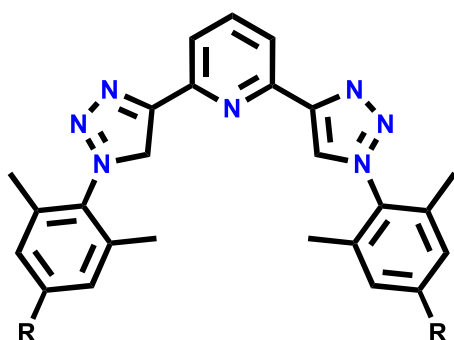
**Estrutura geral**



**2,6-di(8'-quinolinil)piridina**



**4'-(furan-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina**



**R = CH<sub>3</sub>**

**R = Br**

**R = Cl**

**Derivados do 2',6'-bis(1-mesitil-3-metil-1,2,3-triazol-4-il-5-iden)piridina (C<sup>^</sup>N<sup>^</sup>C)**

**Fonte:** o próprio autor.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDEL-SHAFI, A. A. et al. Photosensitized Generation of Singlet Oxygen from Vinyl Linked Benzo-Crown-Ether-Bipyridyl Ruthenium(II) Complexes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 104, n. 2, p. 192–202, 1 jan. 2000.

ABRAHAM, R. J.; THOMAS, W. A. The determination of the ring current and its relationship to the resonance energy in some aromatic compounds. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p. 127, 1966.

ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2 jul. 2021.

AHMAD, H. Synthesis, Characterization and DNA Binding Activity of a Potential DNA Intercalator. **Malaysian Journal of Analytical Science**, v. 20, n. 4, p. 760–769, 10 ago. 2016.

AKSAKAL, N. E. et al. A novel photosensitizer based on a ruthenium(ii) phenanthroline bis(perylene-diimide) dyad: synthesis, generation of singlet oxygen and in vitro photodynamic therapy. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 17538–17545, 2018.

ALLEN J. BARD; LARRY R. FAULKNER. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2nd. ed. New York: Wiley, 2000.

AMTHOR, S. et al. Strong Ligand Stabilization Based on  $\pi$ -Extension in a Series of Ruthenium Terpyridine Water Oxidation Catalysts. **Chemistry - A European Journal**, v. 27, n. 68, p. 16871–16878, 2021.

ANGELES-BOZA, A. M. et al. DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium(II) dppz complexes: Correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity. **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 26, p. 8510–8519, 27 dez. 2004.

AROUNAGUIRI, S. et al. Cobalt(III), nickel(II) and ruthenium(II) complexes of 1,10-phenanthroline family of ligands: DNA binding and photocleavage studies. **Journal of Chemical Sciences**, v. 112, n. 1, p. 1–17, fev. 2000.

ARREBOLA-LIÉBANAS, F. J.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO FRENICH, A. HRMS: Fundamentals and Basic Concepts. Em: **Applications in High Resolution Mass Spectrometry**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1–14.

- AURAS, B. L. et al. Synthesis, spectroscopic/electrochemical characterization and DNA interaction study of novel ferrocenyl-substituted porphyrins. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 1–12, 2018.
- BAL, W. et al. **Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates.** **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2013.
- BALZANI, V.; CERONI, P.; JURIS, A. **Photochemistry and photophysics: concepts, research, applications.** Weinheim: John Wiley & Sons, 2014.
- BAPTISTA, M. S. et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 4, p. 912–919, 27 jul. 2017.
- BARBOSA, M. I. F. et al. Reactive nitrogen/oxygen species production by nitro/nitrosyl supramolecular ruthenium porphyrin complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 338, p. 152–160, 1 abr. 2017.
- BARONE, V.; COSSI, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, n. 11, p. 1995–2001, 1 mar. 1998.
- BARYSHNIKOV, G. V. et al. Solvatochromic effect in absorption and emission spectra of star-shaped bipolar derivatives of 1,3,5-triazine and carbazole. A time-dependent density functional study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 2, 1 fev. 2017.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchange-correlation functionals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 107, n. 20, p. 8554–8560, 22 nov. 1997.
- BERERA, R.; VAN GRONDELLE, R.; KENNIS, J. T. M. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems. **Photosynthesis Research**, v. 101, n. 2–3, p. 105–118, 4 set. 2009.
- BESSAS, N. C. et al. Interaction of the nitrosyl ruthenium complex [RuII (NH.NHq-R)(tpy)NO]<sup>3+</sup> with human serum albumin: a spectroscopic and computational investigation. **Luminescence**, v. 36, n. 2, p. 391–408, 2021.

BHAT, S. S. et al. Luminescent Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Nonviral Carriers for DNA Delivery. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 12, n. 2, p. 254–264, 17 jan. 2017.

BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S.; FRANKS, N. P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin: High resolution crystal structures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38731–38738, 8 dez. 2000.

BOLT, H. M.; LAIB, R. J. Covalent binding of drug metabolites to DNA - a tool of predictive value? **Archives of Toxicology**, v. 46, n. 1–2, p. 171–180, nov. 1980.

BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 293–465, 1 jan. 2007.

BREVARD, C.; GRANGER, P. Ruthenium NMR spectroscopy: a promising structural and analytical tool. General trends and applicability to organometallic and inorganic chemistry. **Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 532–535, 1 fev. 1983.

BROWN, D. G. et al. Bis(tridentate) ruthenium-terpyridine complexes featuring microsecond excited-state lifetimes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 30, p. 12354–12357, 1 ago. 2012.

BUKHANKO, V. et al. Mechanism and oxidation state involved in the nitric oxide (NO) photorelease in a terpyridine-bipyridine-based ruthenium nitrosyl complex. **Inorganica Chimica Acta**, v. 482, p. 195–205, 1 out. 2018.

CACITA, N.; NIKOLAOU, S. Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching. **Journal of Luminescence**, v. 169, p. 115–120, jan. 2016.

CALLADINE, C. R.; DREW, H. **Understanding DNA: the molecule and how it works**. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004.

CARNEIRO, Z. A. et al. Nitric oxide photorelease from a trinuclear ruthenium nitrosyl complex and its in vitro cytotoxicity against melanoma cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 36–38, 2014.

CASTRO, K. A. D. F. et al. The Surprisingly Positive Effect of Zinc-Phthalocyanines With High Photodynamic Therapy Efficacy of Melanoma Cancer. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 14 mar. 2022.

- CATALÁN, J. et al. Progress towards a generalized solvent polarity scale: The solvatochromism of 2-(dimethylamino)-7-nitrofluorene and its homomorph 2-fluoro-7-nitrofluorene. **Liebigs Annalen**, v. 1995, n. 2, p. 241–252, 1995.
- CATALÁN, J. Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: Dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 17, p. 5951–5960, 2009.
- CATALÁN, J.; CATALÁN, J. P. On the solvatochromism of the  $n \leftrightarrow \pi^*$  electronic transitions in ketones. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 9, p. 4072–4082, 7 mar. 2011.
- CATALÁN, J.; LÓPEZ, V.; PÉREZ, P. Solvent dipolarity/polarizability (SPP) of alcoholic solvents. **Liebigs Annalen**, v. 1995, n. 5, p. 793–795, 1995.
- CERÓN-CARRASCO, J. P. et al. Solvent polarity scales: determination of new ET(30) values for 84 organic solvents. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 512–518, jun. 2014.
- CHARLES J. POUCHERT; JACQLYNN BEHNKE. **Aldrich® Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT-NMR Spectra**. [s.l.] Aldrich Chemical Co., 1993. v. 3
- CHAVES, O. A. et al. Effect of peripheral platinum(II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 301, p. 112466, mar. 2020.
- CHAVES, O. A. et al. Interaction of Two Commercial Azobenzene Food Dyes, Amaranth and New Coccine, with Human Serum Albumin: Biophysical Characterization. **ACS Food Science & Technology**, v. 3, n. 5, p. 955–968, 19 maio 2023.
- CHAVES, O. A.; MENEZES, L. B.; IGLESIAS, B. A. Multiple spectroscopic and theoretical investigation of meso-tetra-(4-pyridyl)porphyrin-ruthenium(II) complexes in HSA-binding studies. Effect of Zn(II) in protein binding. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 111581, nov. 2019.
- CHEN, W. et al. Resonance Raman Investigation of Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)<sub>2</sub> and Related Complexes in Water and in the Presence of DNA. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 35, p. 6995–7000, 1 ago. 1997.

CIONCOLONI, G. et al. The electronic and solvatochromic properties of [Co(L)(bipyridine)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (L = o-catecolato, o-benzenedithiolato) species: A combined experimental and computational study. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 39, p. 15575–15585, 2016.

CONNELLY, N. G.; GEIGER, W. E. **Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

CONRADIE, J.; GHOSH, A. Iron(III)-nitro porphyrins: Theoretical exploration of a unique class of reactive molecules. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 4902–4909, 26 jun. 2006.

COTTON, F. A.; ZINGALESI, F. **The Donor-Acceptor Properties of Isonitriles as Estimated by Infrared Study**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

CULLOTA, E.; KOSHLAND, D. E. NO News Is Good News: A startlingly simple molecule unites neuroscience, physiology, and immunology and revises scientists' understanding of how cells communicate and defend themselves. **Science**, v. 258, n. 1862, 1992.

CUSUMANO, M.; DI PIETRO, M. L.; GIANNETTO, A. Stacking surface effect in the DNA intercalation of some polypyridine platinum(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1754–1758, 1999.

DA SILVA, C. C. et al. Antibacterial Activity of 2-Amino-1,4-naphthoquinone Derivatives Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains and Their Interaction with Human Serum Albumin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020a.

DA SILVA, C. F. N. et al. The role of ancillary ligand substituents in the biological activity of triruthenium-NO complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 186, n. January, p. 197–205, 2018.

DA SILVA, C. F. N. et al. Exploring the structure of a ruthenium acetate cluster for biological purposes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 114, n. September 2019, p. 107810, 2020b.

DA SILVA, E. T. et al. A DFT study of cis-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)bpy(dye)<sub>2</sub>]<sup>n+</sup> complexes as NO donors. **Inorganica Chimica Acta**, v. 510, n. April, p. 119724, 2020c.

DA SILVA MIRANDA, F. et al. Synthesis of substituted dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxaline. **Tetrahedron**, v. 64, n. 22, p. 5410–5415, 2008.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. **Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action**. **European Journal of Pharmacology** Elsevier, , 5 out. 2014.

DAVID HALLIDAY; ROBERT RESNICK; JEARL WALKER. **Fundamentos de Física, Volume 3: Eletromagnetismo**. 10th. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

DE LIMA, R. G. et al. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 9, p. 2643–2650, 1 jun. 2005.

DE LIMA, R. G. et al. Ultradeformable liposome loaded with zinc phthalocyanine and [Ru(NH.NHq)(tpy)NO]<sup>3+</sup> for photodynamic therapy by topical application. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, n. 1600, p. 184–193, 2017.

DENG, J. et al. Evaluation of DNA binding and DNA cleavage of nickel(II) complexes with tridentate  $\alpha$ -N-heterocyclic thiosemicarbazones ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 471, p. 194–202, fev. 2018.

DEVEREUX, S. J. et al. Caught in the Loop: Binding of the [Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> Light-Switch Compound to Quadruplex DNA in Solution Informed by Time-Resolved Infrared Spectroscopy. **Chemistry – A European Journal**, v. 26, n. 71, p. 17103–17109, 18 dez. 2020.

DI PIETRO, M. L. et al. Ru(II)-dppz derivatives and their interactions with DNA: Thirty years and counting. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 7, 2021.

DIAMANTIS, A. A.; DUBRAWSKI, J. V. Preparation and Structure of Ethylenediaminetetraacetate Complexes of Ruthenium(II) with Dinitrogen, Carbon Monoxide, and Other  $\pi$ -Acceptor Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1142–1150, 1981.

DODERO, V. I. Biomolecular studies by circular dichroism. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 61, 2011.

DONALD A. MCQUARRIE; JOHN D. SIMON. **Physical Chemistry: A Molecular Approach**. Sausalito, CA: University Science Books, 1997.

DONGARE, P. et al. [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> revisited. Is it localized or delocalized? How does it decay? **Coordination Chemistry Reviews**, v. 345, p. 86–107, ago. 2017.

DUPUREUR, C. M.; BARTON, J. K. Structural Studies of Λ- and Δ-[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> Bound to d(GTCGAC)<sub>2</sub>: Characterization of Enantioselective Intercalation. **Inorganic Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 33–43, 1997.

ENEMARK, J. H.; FELTHAM, R. D. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 339–406, set. 1974.

ENTRADAS, T.; WALDRON, S.; VOLK, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, n. January, p. 111787, 2020.

ESPÓSITO, B. P.; NAJJAR, R. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 137–149, out. 2002.

FANALI, G. et al. **Human serum albumin: From bench to bedside. Molecular Aspects of Medicine** Elsevier Ltd, , 2012.

FELSENFELD, G.; HIRSCHMAN, S. Z. A neighbor-interaction analysis of the hypochromism and spectra of DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 2, p. 407–427, set. 1965.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FRANCISCATO, D. S.; DE SOUZA, V. R. Influence of the oxidation state of the metal center on the interaction of ruthenium complex with HSA. **Monatshefte fur Chemie**, v. 147, n. 7, p. 1315–1321, 1 jul. 2016.

FRIEDMAN, A. E. et al. Molecular “Light Switch” for DNA: Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)<sup>2+</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 12, p. 4960–4962, 1990.

FRODL, A.; HEREBIAN, D.; SHELDRIK, W. S. Coligand tuning of the DNA binding properties of bioorganometallic (η<sup>6</sup>-arene)ruthenium(II) complexes of the type [(η<sup>6</sup>-arene)Ru(amino acid)(dppz)]<sup>n+</sup>(dppz = dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine), n = 1–3. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, n. 19, p. 3664–3673, 2002.

G. PORTER. Flash photolysis and spectroscopy. A new method for the study of free radical reactions. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences**, v. 200, n. 1061, p. 284–300, 6 jan. 1950.

GALINDO-MURILLO, R.; CHEATHAM, T. E. Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA–ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 7, p. 3735–3747, 19 abr. 2021.

GARY L. MIESSLER; PAUL J. FISCHER; DONALD A. TARR. **Química Inorgânica**. 5ª edição ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil Ltda, 2014.

G.D. FASMAN. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. Boston, MA: Springer US, 1996.

GIRI, B. et al. Formation, reactivity, photorelease, and scavenging of NO in ruthenium nitrosyl complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 502, n. December 2019, p. 119360, 2020a.

GIRI, B. et al. Near-IR light-induced photorelease of nitric oxide (NO) on ruthenium nitrosyl complexes: Formation, reactivity, and biological effects. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 31, p. 10772–10785, 2020b.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. The Preparation of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 471–474, 1971a.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. The Preparation of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 471–474, 1971b.

GOLD, V. (ED.). **The IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019.

GROSS, M. L. Accurate masses for structure confirmation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 2, p. 57–57, 1 fev. 1994.

GÜMÜŞ, A. et al. Synthesis, solvatochromism, electronic structure and nonlinear optic properties of quinolin-8-yl 2-hydroxybenzoate. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 145–158, 2018.

GUPTA, N. et al. [RuO(dppz)(tpy)]<sup>2+</sup>: a DNA Cleavage Agent with High DNA Affinity. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 31, n. 8, p. 1048–1050, 1992.



H. A. HAVEL. **Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution**. 1st. ed. New York: Wiley-VCH, 1996.

HAMMARSTRÖM, L.; JOHANSSON, O. Expanded bite angles in tridentate ligands. Improving the photophysical properties in bistridentate RuII polypyridine complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 21–22, p. 2546–2559, nov. 2010.

HANUSA, T. P. Cyanide Complexes of the Transition Metals. Em: **Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, p. 17, 2012.

HARRIS, D. C.; BERTOLUCCI, M. D. **Symmetry and Spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy**. [s.l.] Dover Publications, 1978.

HAYTON, T. W.; LEGZDINS, P.; SHARP, W. B. Coordination and organometallic chemistry of metal-NO complexes. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 935–991, 2002.

HEIN, K. L. et al. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. **Journal of Structural Biology**, v. 171, n. 3, p. 353–360, set. 2010.

HIORT, C.; LINCOLN, P.; NORDEN, B. DNA binding of .DELTA.- and .LAMBDA.-[Ru(phen)2DPPZ]2+. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 9, p. 3448–3454, 1 maio 1993.

HOFMEIER, H.; SCHUBERT, U. S. Recent developments in the supramolecular chemistry of terpyridine-metal complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 33, n. 6, p. 373–399, 28 jul. 2004.

HOMOCIANU, M. et al. Solvatochromic effects in the UV/vis absorption spectra of some pyridazinium ylides. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p. 355–359, 30 nov. 2011.

HUGGINS, M. T.; BILLIMORIA, F. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. An Advanced Undergraduate Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 3, p. 471, 1 mar. 2007.

ICSEL, C.; YILMAZ, V. T. DNA Binding and Cleavage Studies of Two Palladium(II) Saccharinate Complexes with Terpyridine. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 4, p. 165–172, abr. 2013.

IGNARRO, L. J. **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. [s.l.] Academic Press, 2009.

IMBERTI, C. et al. New Designs for Phototherapeutic Transition Metal Complexes. **Angewandte Chemie**, v. 132, n. 1, p. 61–73, 2 jan. 2020.

J. R. ALBANI. **Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies**. [s.l.] Elsevier, 2004.

JAKUBIKOVA, E. et al. Electronic structure and spectroscopy of  $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ , and  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{Cl})]^+$ . **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 22, p. 10720–10725, 16 nov. 2009.

JOHN R. RUMBLE. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 103. ed. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, [s.d.].

JONATHAN CLAYDEN; NICK GREEVES; STUART WARREN. **Organic Chemistry**. Second ed. New York: Oxford University Press Inc., 2012.

JURIS, A. et al. Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 84, n. 3, p. 85–277, mar. 1988.

KAMLET, M. J. et al. Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters,  $\pi$ ,  $\alpha$ , and  $\beta$ , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 17, p. 2877–2887, 1983.

KAMLET, M. J.; ABOUD, J. L.; TAFT, R. W. The Solvatochromic Comparison Method. 6. The  $\pi^*$  Scale of Solvent Polarities I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 18, p. 6027–6038, 1977.

KAMLET, M. J.; TAFT, R. W. The Solvatochromic Comparison Method. 2. The Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 10, p. 2886–2894, 1976a.

KAMLET, M. J.; TAFT, R. W. The solvatochromic comparison method. I. The  $\beta$ -scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 2, p. 377–383, 1 jan. 1976b.

KARGES, J. et al. Towards Long Wavelength Absorbing Photodynamic Therapy Photosensitizers via the Extension of a [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> Core. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2019, n. 32, p. 3704–3712, 31 ago. 2019.

KASHA, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. **Discussions of the Faraday Society**, v. 9, p. 14, 1950.

KELLETT, A. et al. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 4, p. 971–988, 21 fev. 2019.

KHAN, F. H. et al. The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOT? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9393, 10 dez. 2020.

KHANDELWAL, G.; BHYRAVABHOTLA, J. A Phenomenological Model for Predicting Melting Temperatures of DNA Sequences. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12433, 26 ago. 2010.

KNOLL, J. D.; ALBANI, B. A.; TURRO, C. New Ru(II) Complexes for Dual Photoreactivity: Ligand Exchange and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Generation. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2280–2287, 18 ago. 2015.

KNOLL, J. D.; TURRO, C. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 282–283, p. 110–126, 2015a.

KNOLL, J. D.; TURRO, C. **Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. Coordination Chemistry Reviews** Elsevier, , 1 jan. 2015b.

KOMOR, A. C.; BARTON, J. K. The path for metal complexes to a DNA target. **Chemical Communications**, v. 49, n. 35, p. 3617–3630, 4 abr. 2013.

KYPR, J. et al. **Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. Nucleic Acids Research**, 2009.

LAMMERS, I. et al. Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 67–73, mar. 2013.

LAZAREVIĆ, T.; RILAK, A.; BUGARČIĆ, Ž. D. **Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives.** *European Journal of Medicinal Chemistry* Elsevier Masson SAS, , 15 dez. 2017.

LEE, P.; WU, X. Review: Modifications of Human Serum Albumin and their Binding Effect. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, p. 1862–1865, 2015.

LI, W. et al. Ruthenium(II) complexes: DNA-binding, cytotoxicity, apoptosis, cellular localization, cell cycle arrest, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential and western blot analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 94–104, nov. 2014.

LÓPEZ, R. et al. Design and spectroscopic study of new ruthenium(II) complexes containing ligands derived front terpyridine and dipyrido[3,2-a:2',3'-c] phenazine: Ru(4' -Rph-tpy) [dppz(COOH)]Cl}PF<sub>6</sub> with R = NO<sub>2</sub>, Br, Cl. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 315–321, 2006.

LOVING, G. S.; SAINLOS, M.; IMPERIALI, B. **Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores.** *Trends in Biotechnology*, fev. 2010.

LU, W.; ZHONG, B.; MA, D. Amplified spontaneous emission and gain from optically pumped films of dye-doped polymers. **Applied Optics**, v. 43, n. 26, p. 5074, 10 set. 2004.

LUIZ MOREIRA DO AMARAL, M. et al. New trans-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(dppb)(o-bdqi)]<sup>+</sup> complex as NO donor encapsulated Pluronic F-127 micelles. **Polyhedron**, v. 218, 15 maio 2022.

MACRAE, C. F. et al. Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. **Journal of Applied Crystallography**, v. 53, n. 1, p. 226–235, 1 fev. 2020.

MANCHESTER, K. L. Use of UV Methods for Measurement of Protein and Nucleic Acid Concentrations. **BioTechniques**, v. 20, n. 6, p. 968–970, jun. 1996.

MARCO MONTALTI et al. **Handbook of Photochemistry**. 3rd Edition ed. [s.l: s.n.].

MARCUS, Y. The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. **Chemical Society Reviews**, v. 22, n. 6, p. 409–416, 1993.

- MARINI, A. et al. What is Solvatochromism? **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 51, p. 17128–17135, 30 dez. 2010.
- MASON, J. NMR spectroscopy of the early transition metals. **Polyhedron**, v. 8, n. 13–14, p. 1657–1668, jan. 1989.
- MCGOVERN, D. A. et al. Reduction of dipyrido-[3,2-a:2',3'-c]-phenazine (dppz) by photolysis in ethanol solution. **Chemical Communications**, n. 11, p. 1402–1404, 21 mar. 2005.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011.
- MERKLE, A. C.; MCQUARTERS, A. B.; LEHNERT, N. Synthesis, spectroscopic analysis and photolabilization of water-soluble ruthenium(iii)–nitrosyl complexes. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 26, p. 8047, 2012.
- MIESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química Inorgânica**. 5. ed. São Paulo: Pearson, 2014.
- MIR, J. M.; MALIK, B. A.; MAURYA, R. C. Nitric oxide-releasing molecules at the interface of inorganic chemistry and biology: A concise overview. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 91–112, 2019.
- MIRANDA, V. M. **Medicinal inorganic chemistry: An updated review on the status of metallodrugs and prominent metallodrug candidates**. **Reviews in Inorganic Chemistry** De Gruyter Open Ltd, , 1 mar. 2022.
- MONRO, S. et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 2, p. 797–828, 23 jan. 2019.
- MOORCROFT, M. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, n. 5, p. 785–803, 21 jun. 2001.
- MOREIRA, M. B. et al. Investigação da Supressão de Fluorescência de Soro Albumina Bovina e Humana por Complexo de Rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227–232, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds - Part A**. [s.l.] Wiley, 1997.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds - Part B**. Sixth ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

NAVALE, G. R.; SINGH, S.; GHOSH, K. **NO donors as the wonder molecules with therapeutic potential: Recent trends and future perspectives**. **Coordination Chemistry Reviews** Elsevier B.V., , 15 abr. 2023.

NEESE, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, 17 jan. 2018.

NICHOLS, S. P. et al. Local delivery of nitric oxide: Targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1177–1188, 2012.

P. W. ATKINS. **Physical Chemistry: Thermodynamics, Structure, and Change**. 10th. ed. New York: Freeman, 2014.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, n. 11, p. 2411–2423, nov. 1995.

PARVEEN, S. et al. Elucidating the interaction of enantiomeric Cu(II) complexes with DNA, RNA and HSA: A comparative study. **Polyhedron**, v. 210, 1 dez. 2021.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4th. ed. [s.l.: s.n.].

PEREIRA, A. D. C. et al. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 192–198, 31 maio 2011.

PEREZ, N. M. et al. Probing solvents effects on the absorption spectrum of oxo-centered carbonyl-triruthenium clusters. **Polyhedron**, v. 194, p. 114944, jan. 2021.

PETER ATKINS; LORETTA JONES. **Princípios de Química - Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5ª edição ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

PINNICK, D. V.; DURHAM, B. Photosubstitution reactions of Ru(bpy)<sub>2</sub>XYn<sup>+</sup> complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1440–1445, 1984.

PITOUX, D. et al. Fully Resolved NMR Correlation Spectroscopy. **Chemistry - A European Journal**, v. 21, n. 25, p. 9044–9047, 15 jun. 2015.

PIVETTA, R. C. et al. Synthesis, photophysical properties and spectroelectrochemical characterization of 10-(4-methyl-bipyridyl)-5,15-(pentafluorophenyl)corrole. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 332, p. 306–315, 1 jan. 2017.

POELHSITZ, G. VON et al. New nitrosyl ruthenium complex [RuCl(NO)(dcype)(bipy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>: Synthesis, electrochemistry, NMR and ESI-MS/MS studies. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 10, n. 2, p. 133–138, fev. 2007.

PORTER, G. Flash Photolysis and Some of Its Applications. **Science**, v. 160, n. 3834, p. 1299–1307, 21 jun. 1968.

POSSATO, B. et al. Anticancer activity and DNA interaction of ruthenium acetate clusters bearing azanaphthalene ancillary ligands. **Polyhedron**, v. 176, p. 114261, 2020.

REHMAN, S. U. et al. **Studying non-covalent drug-DNA interactions**. **Archives of Biochemistry and Biophysics** Academic Press Inc., , 2 jun. 2015.

REICHARDT, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 8, p. 2319–2358, 1 dez. 1994.

RENAN R. BERTOLONI et al. **Investigation of the solvatochromic effect in ruthenium complexes by multiparametric analysis**. **45 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2022.

ROBERTSON, P. A. et al. Halocarbons as hydrogen bond acceptors: A spectroscopic study of haloethylbenzenes (PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X, X = F, Cl, Br) and their hydrate clusters. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 12, p. 8218–8227, 2018.

ROSE, M. J.; MASCHARAK, P. K. Photoactive ruthenium nitrosyls: Effects of light and potential application as NO donors. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 18–20, p. 2093–2114, 2008.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1 fev. 1965.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

SANTOS, R. L. S. R.; SANCHES, R. N. F.; DE OLIVEIRA SILVA, D. Spectroscopic studies on interactions of the tetrakis(acetato)chloridodiruthenium(II,III) complex and the Ru<sub>2</sub> (II,III)-NSAID-derived metallodrugs of ibuprofen and ketoprofen with human serum albumin. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 68, n. 17–18, p. 3209–3228, 17 set. 2015.

SARMENTO, C. O. et al. Interactions of a Ruthenium-Ketoprofen Compound with Human Serum Albumin and DNA: Insights from Spectrophotometric Titrations and Molecular Docking Calculations. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 4, 27 jan. 2022.

SAUAIA, M. G.; DA SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 254–259, 2003.

SCHANIEL, D. et al. Reversible photoswitching between nitrito-N and nitrito-O isomers in trans-[Ru(py)<sub>4</sub>(NO)<sub>2</sub>]. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 23, p. 6171–6178, 21 jun. 2010.

SCHMID, M. et al. Merging of a Perylene Moiety Enables a RuII Photosensitizer with Long-Lived Excited States and the Efficient Production of Singlet Oxygen. **Chemistry – A European Journal**, v. 28, n. 1, 3 jan. 2022.

SCHOCH, T. K. et al. Synthesis and Structure of the Ruthenium(II) Complexes [(η-C<sub>5</sub>Me<sub>5</sub>)Ru(NO)(bipy)]<sup>2+</sup> and [(η-C<sub>5</sub>Me<sub>5</sub>)Ru(NO)(dppz)]<sup>2+</sup>. DNA Cleavage by an Organometallic dppz Complex (bipy = 2,2′-Bipyridine; dppz = Dipyrido[3,2- a:2′,3′- c]phenazine). **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 15, p. 4383–4390, 1 jan. 1996.

SHI, S. et al. Interaction of [Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> with human telomeric DNA: Preferential binding to G-quadruplexes over i-motif. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 370–377, abr. 2010.

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869–880, 2000.



SILVA, A. M. et al. Influence of nitro ruthenium isomerization on photochemically induced nitric oxide release: Vasorelaxant activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 112166, mar. 2023a.

SILVA, A. M. et al. Influence of nitro ruthenium isomerization on photochemically induced nitric oxide release: Vasorelaxant activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 243, p. 112166, jun. 2023b.

SILVA, H. V. R. et al. Phosphine/diimine ruthenium complexes with  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, v. 144, p. 55–65, 1 abr. 2018.

SILVEIRA, C. H. DA et al. Investigation of isomeric tetra-cationic porphyrin activity with peripheral  $[\text{Pd}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  units by antimicrobial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101920, set. 2020.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8th. ed. [s.l.: s.n.].

SOLIMAN, N.; GASSER, G.; THOMAS, C. M. Incorporation of Ru(II) Polypyridyl Complexes into Nanomaterials for Cancer Therapy and Diagnosis. **Advanced Materials**, v. 32, n. 47, p. 1–19, 2020.

SPANGE, S. et al. Reappraisal of Empirical Solvent Polarity Scales for Organic Solvents. **Chemistry–Methods**, v. 1, n. 1, p. 42–60, 13 jan. 2021.

SREENAVYA, S. A. et al. Framework of ruthenium-containing nickel hydrotalcite-type material: preparation, characterisation, and its catalytic application. **RSC Advances**, v. 8, n. 44, p. 25248–25257, 2018.

STROHALM, M. et al. mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 11, p. 4648–4651, 1 jun. 2010.

SULLIVAN, B. P.; CALVERT, J. M.; MEYER, T. J. Cis-Trans Isomerism in  $(\text{trpy})(\text{PPh}_3)\text{RuCl}_2$ . Comparisons between the Chemical and Physical Properties of a Cis-Trans Isomeric Pair. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1404–1407, 1980.

SUN, C. Y. et al. Solvatochromic behavior of chiral mesoporous metal-organic frameworks and their applications for sensing small molecules and separating cationic dyes. **Chemistry - A European Journal**, v. 19, n. 11, p. 3639–3645, 11 mar. 2013a.

SUN, Q. et al. Experimental Evidence of Ultrafast Quenching of the 3MLCT Luminescence in Ruthenium(II) Tris-bipyridyl Complexes via a 3dd State. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 37, p. 13660–13663, 18 set. 2013b.

SUN, Y. et al. Efficient DNA photocleavage by [Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppn)]<sup>2+</sup> with visible light. **Chemical Communications**, v. 46, n. 14, p. 2426–2428, 2010.

TAN, Z. et al. Binding properties of two ruthenium(II) polypyridyl complexes [Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz-Br)]<sup>2+</sup> and [Ru(dmb)<sub>2</sub>(dppz-Br)]<sup>2+</sup> with the RNA poly(U)•poly(A)\*poly(U) triplex. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 721–731, 16 ago. 2019.

THEODORE PETERS, JR. **All About Albumin**. New York: Elsevier, 1995.

THOMAS, D. D. et al. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 1, p. 355–360, 2 jan. 2001.

THOTA, S. et al. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 14, p. 5805–5821, 2018.

TOMA, H. E. **Química de Coordenação, Organometálica e Catálise**. 2<sup>a</sup> Edição ed. [s.l.: s.n.].

VON POELHSITZ, G. et al. Synthesis and characterization of nitrosyl complexes containing 4,6-dimethyl-pyrimidine-2-thiolato ('SpymMe2') as ligand: [Ru('SpymMe2',-N,-S)('SpymMe2',-S)(NO)(P-P)](PF<sub>6</sub>) (P-P=1,2-bis(diphenylphosphino)ethane or 1,2-bis(diphenylphosphino)ethylene. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 8, n. 9, p. 805–808, set. 2005.

VON POELHSITZ, G. et al. Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac-[RuCl<sub>3</sub>(NO)(dppf)], dppf=1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene. **Polyhedron**, v. 26, n. 16, p. 4707–4712, out. 2007.

W. BECKER. **The bh TCSPC handbook**. 9th. ed. [s.l.] Becker & Hickl GmbH, 2021.

WASYLENKO, D. J. et al. Electronic modification of the [RuII(tpy)(bpy)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> scaffold: Effects on catalytic water oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 45, p. 16094–16106, 17 nov. 2010.

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 7, n. 18, p. 3297, 2005.

XU, J. et al. A family of multi-color anthracene carboxyimides: Synthesis, spectroscopic properties, solvatochromic fluorescence and bio-imaging application. **Dyes and Pigments**, v. 139, p. 166–173, 1 abr. 2017.

YANG, T.; ZELIKIN, A. N.; CHANDRAWATI, R. Progress and Promise of Nitric Oxide-Releasing Platforms. **Advanced Science**, v. 5, n. 6, 2018.

YUN, B. H. et al. Simultaneous Binding of Ruthenium(II) [(1,10-Phenanthroline)<sub>2</sub>dipyridophenazine]<sup>2+</sup> and Minor Groove Binder 4',6-Diamidino-2-phenylindole to Poly[d(A–T)<sub>2</sub>] at High Binding Densities: Observation of Fluorescence Resonance Energy Transfer Across the DNA Stem. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 36, p. 9858–9864, 1 set. 2003.

YUSOH, N. A. et al. Metallointercalator [Ru(dppz)<sub>2</sub>(PIP)]<sup>2+</sup> Renders BRCA Wild-Type Triple-Negative Breast Cancer Cells Hypersensitive to PARP Inhibition. **ACS Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 378–387, 2020.

ZAYAT, L. et al. Ruthenium polypyridyl phototriggers: From beginnings to perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 371, n. 1995, 2013.

ZEGKINOGLU, I. et al. Electronic structure of diamond surfaces functionalized by Ru(tpy)<sub>2</sub>. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 26, p. 13877–13883, 5 jul. 2012.

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565–4579, 2007.

ZHANG, Y. et al. Solvatochromic AIE luminogens as supersensitive water detectors in organic solvents and highly efficient cyanide chemosensors in water. **Chemical Science**, v. 5, n. 7, p. 2710–2716, 2014.

ZHAO, R. et al. Nuclear targets of photodynamic tridentate ruthenium complexes. **Dalton Transactions**, n. 48, p. 10926, 2009.

ZHIVKOVA, Z. Studies on Drug – Human Serum Albumin Binding: The Current State of the Matter. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 14, p. 1817–1830, 26 mar. 2015.

ZHOU, Q. X. et al. Ruthenium(II) Terpyridyl complexes exhibiting DNA photocleavage: The role of the substituent on monodentate ligand. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 33, p. 11521–11526, 2009.

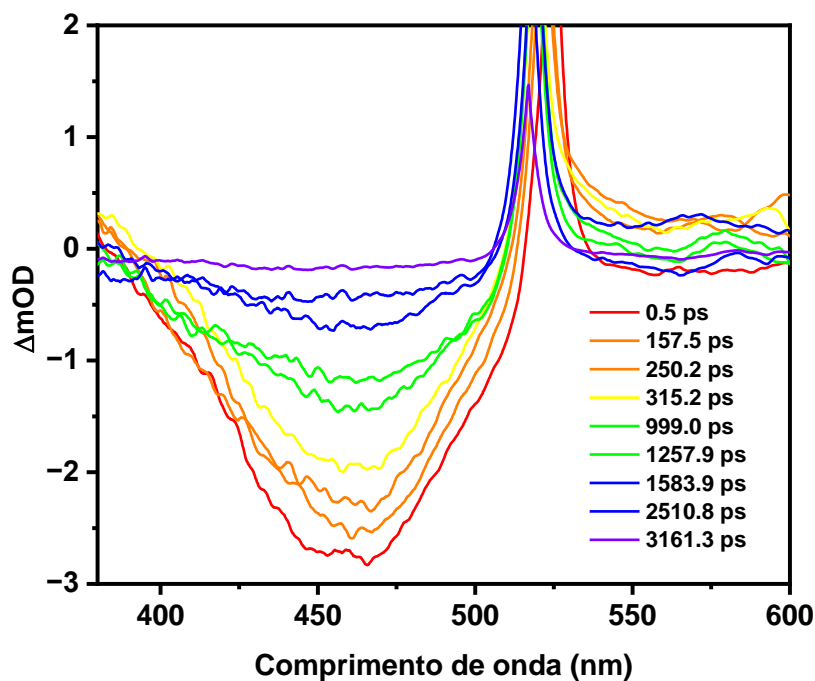
ZHOU, Q.-X. et al. A New Heteroleptic Ruthenium(II) Polypyridyl Complex with Long-Wavelength Absorption and High Singlet-Oxygen Quantum Yield. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, n. 10, p. 3157–3165, 8 mar. 2010.

ŽIVEC, P. et al. Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA- and albumin-binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 35–47, dez. 2012.

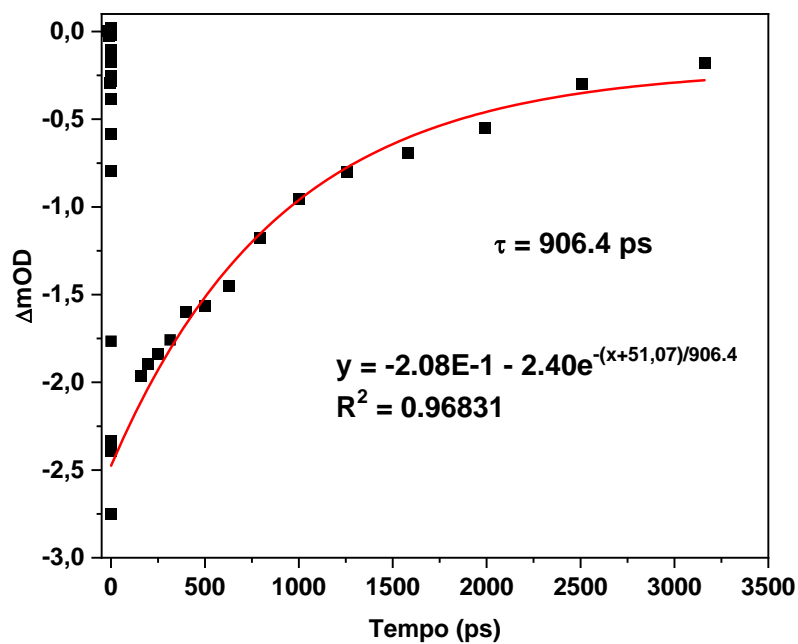
## 8. ANEXO

Destaca-se que todas as figuras apresentadas neste ANEXO apresentam como fonte o próprio autor.

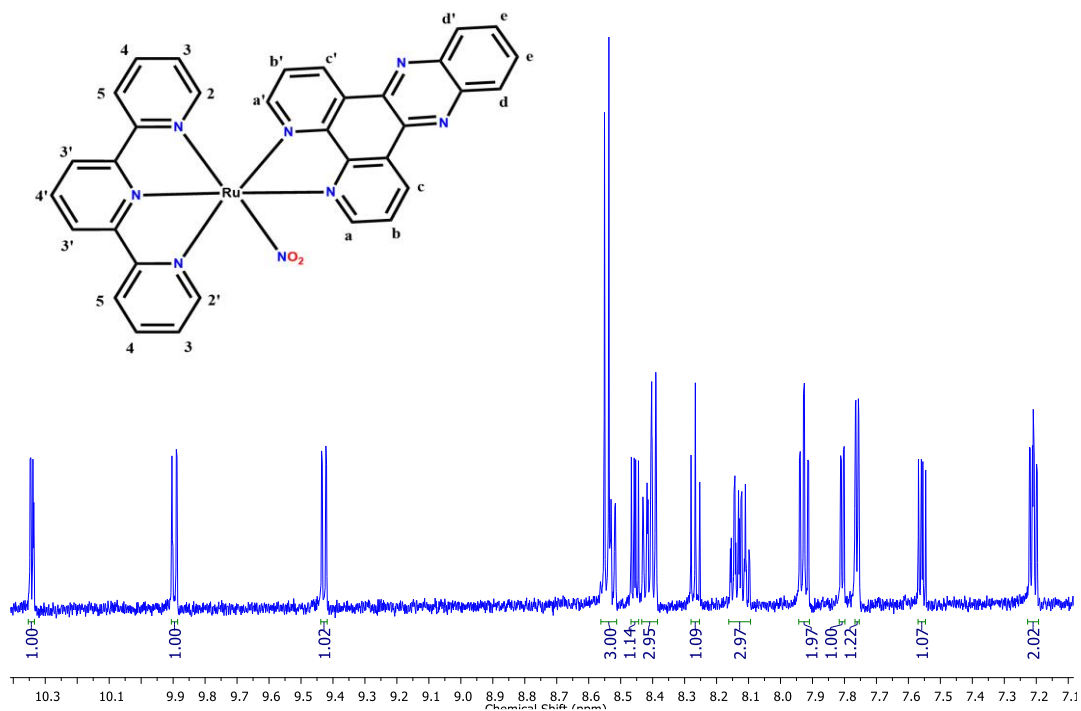
**Figura 84:** Espectro de fs-TA de uma solução 100  $\mu\text{M}$  do composto Ru-H<sub>2</sub>O em acetonitrila ( $\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$ ).



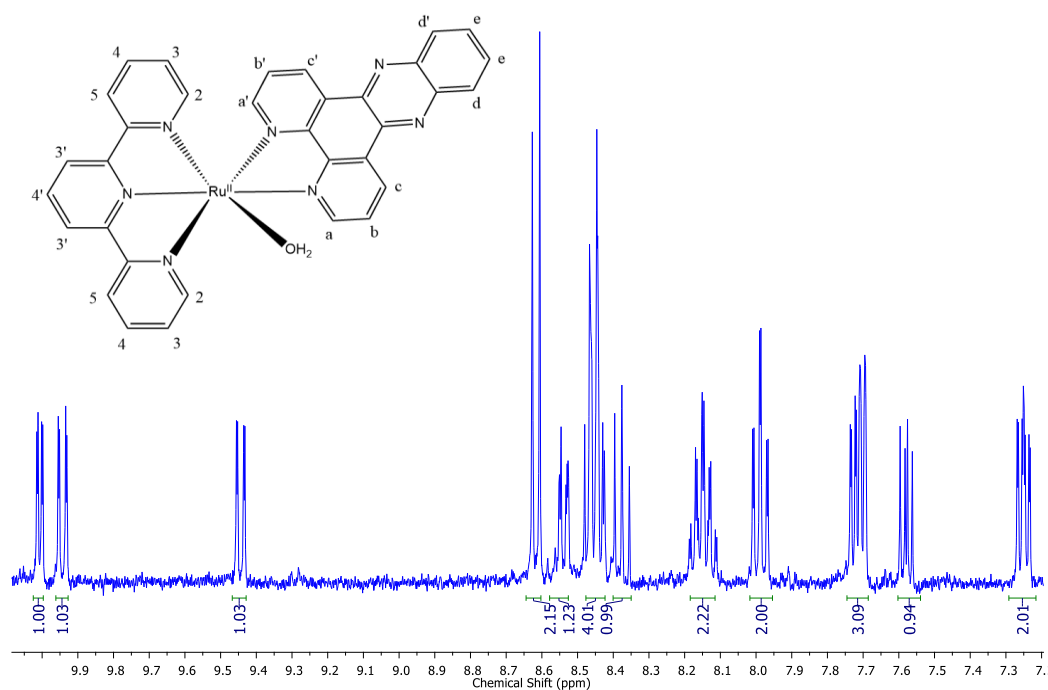
**Figura 85:** Curva cinética obtida para o experimento de fs-TA do Ru-H<sub>2</sub>O em acetonitrila ( $\lambda_{\text{max}} = 426 \text{ nm}$ ).



**Figura 86:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto Ru-NO<sub>2</sub> em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K).



**Figura 87:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto Ru-H<sub>2</sub>O em acetonitrila deuterada (1 mM, 600 MHz, 298K).



**Tabela 25:** Parâmetros cristalográficos obtidos para o cristal do composto Ru-NO<sub>2</sub>.

<b>Composto</b>	<b>Ru-NO<sub>2</sub></b>
Fórmula Molecular	C <sub>33</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> PRu
Massa Molecular (g/mol)	807,61
Temperatura (K)	273,15
Grupo Espacial	Monoclínico, C <sub>1</sub>
a (Å)	32,092(3)
b (Å)	13,8781(10)
c (Å)	15,4876(14)
α (°)	90
β (°)	92,750(3)
γ (°)	90
V (Å <sup>3</sup> )	6889,9(10)
Z	66
Intervalo de teta para a coleta de dados	3,055 a 26,393°
μ (Mo, Kα) (mm <sup>-1</sup> )	3,960
F(000)	5420
Reflexões coletadas	14975
Qualidade de ajuste a F <sup>2</sup>	0,711

Figura 88: Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-H<sub>2</sub>O utilizando o método de Kamlet-Taft.

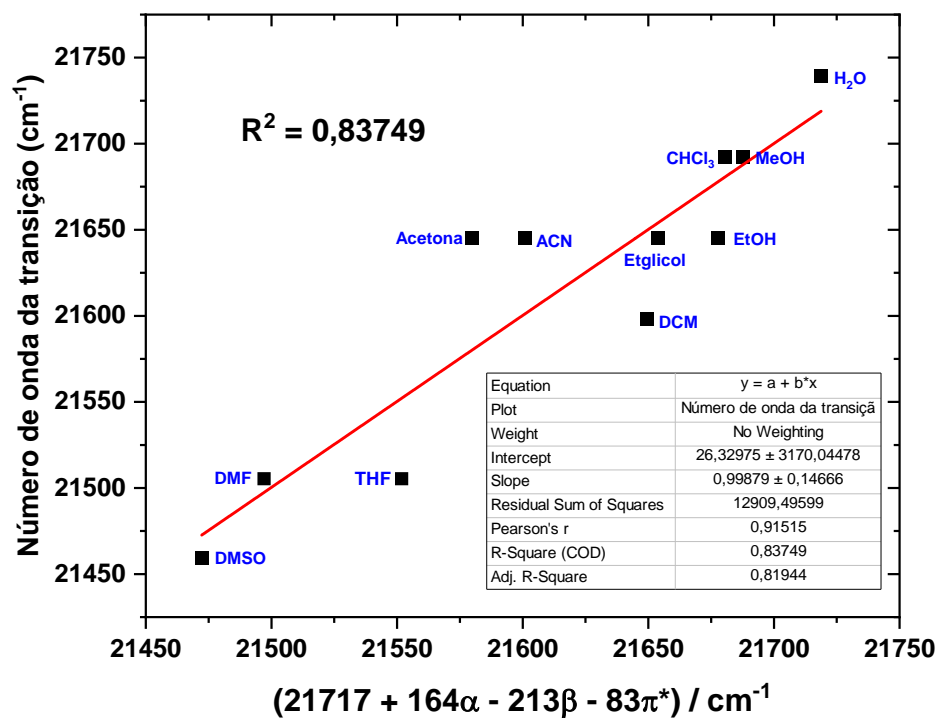


Figura 89: Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-py utilizando o método de Kamlet-Taft.

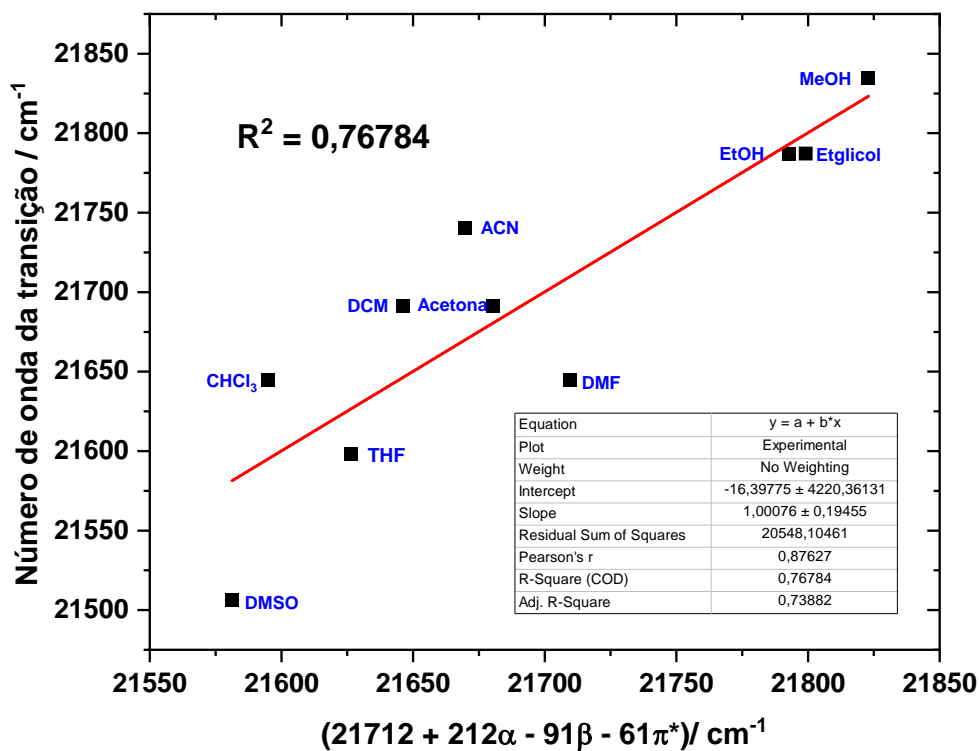




Figura 90: Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-Cl utilizando o método de Catalán.

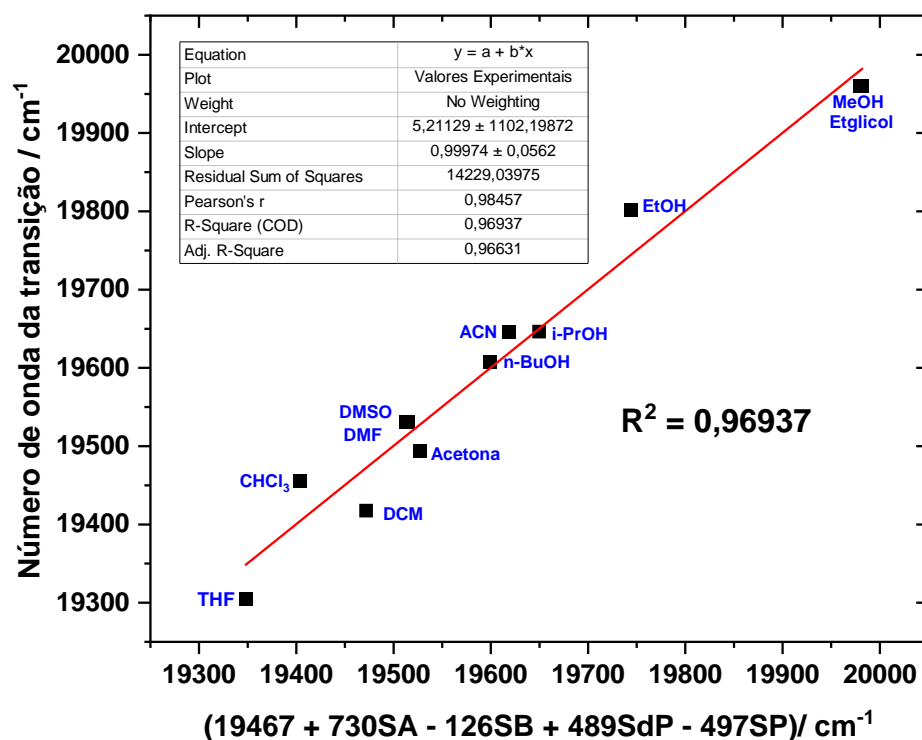
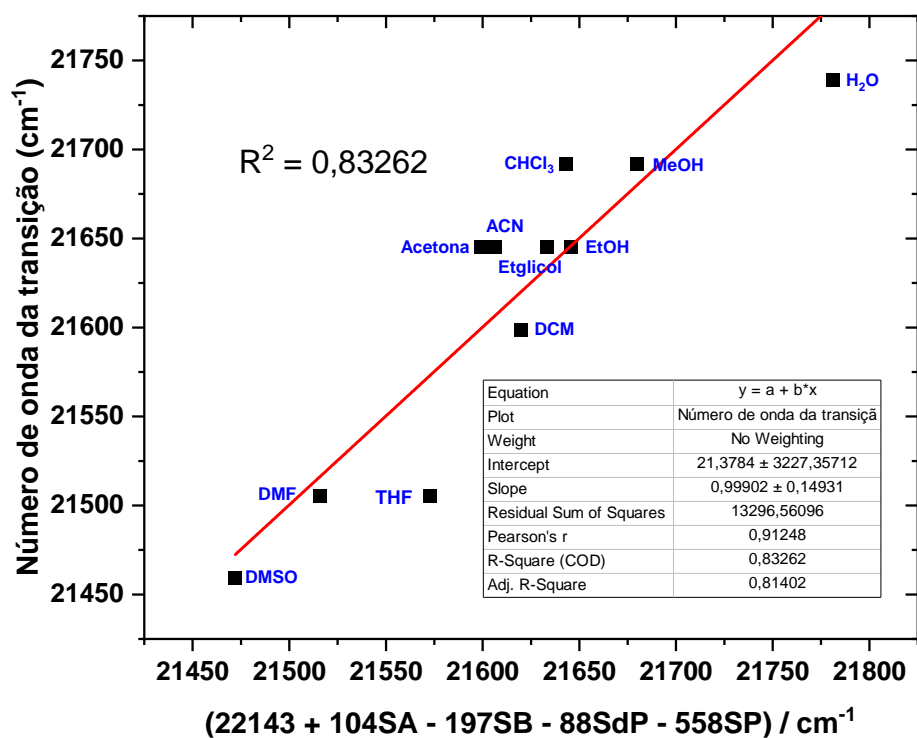
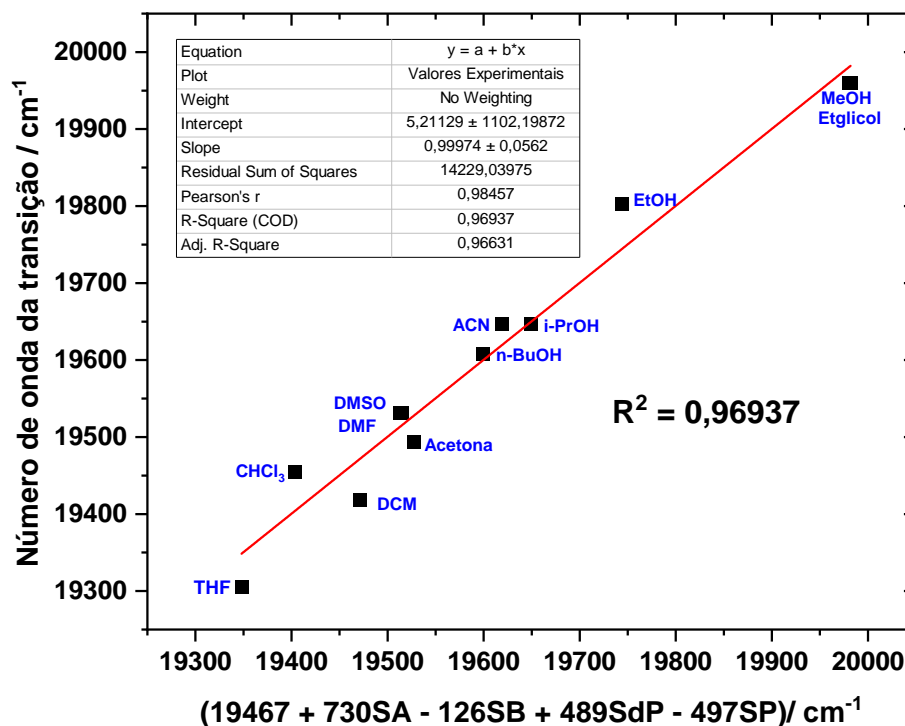


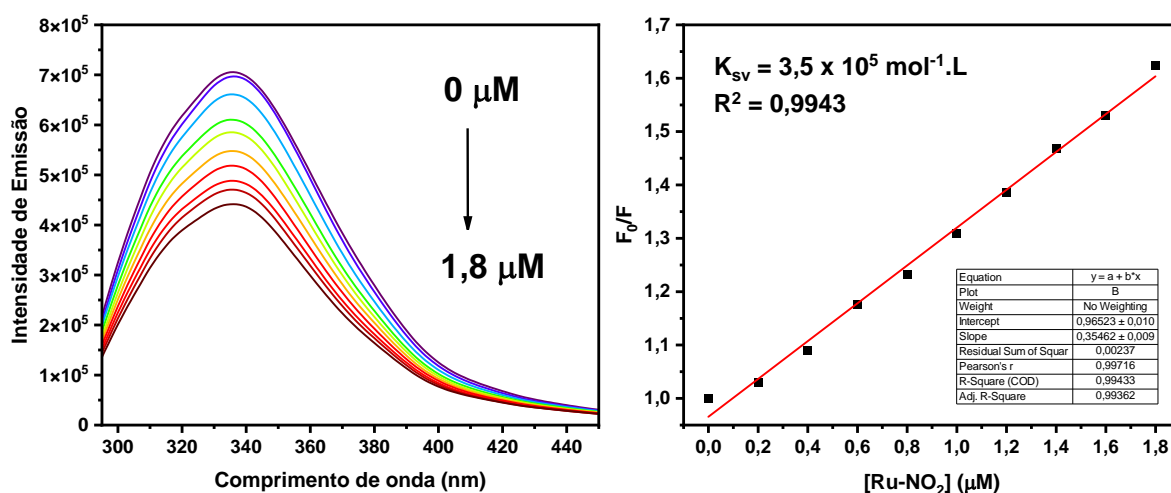
Figura 91: Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-H<sub>2</sub>O utilizando o método de Catalán.



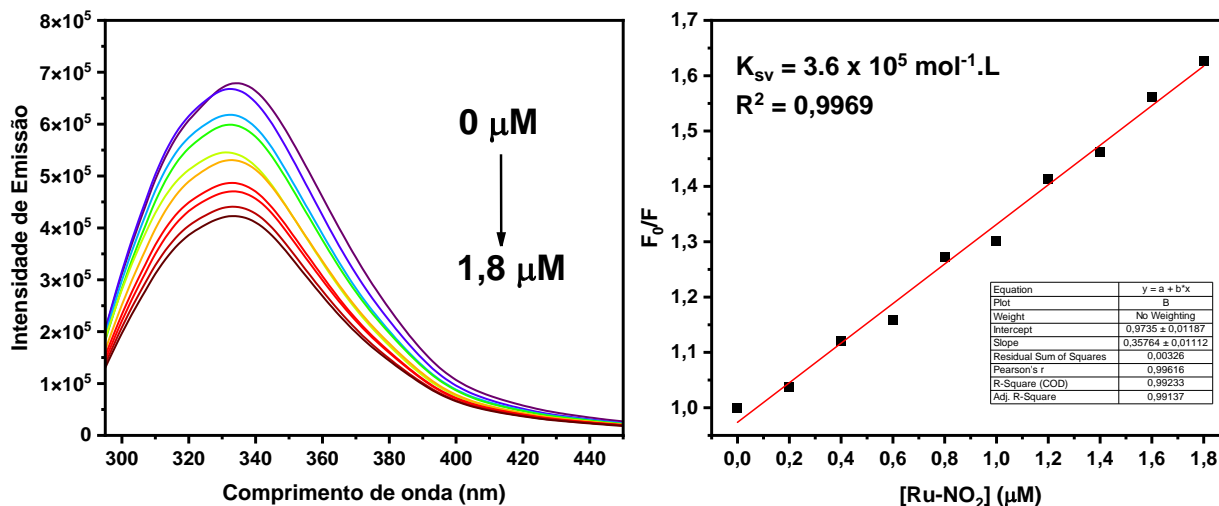
**Figura 92:** Regressão multiparamétrica para a energia da transição MLCT do Ru-py utilizando o método de Catalán.



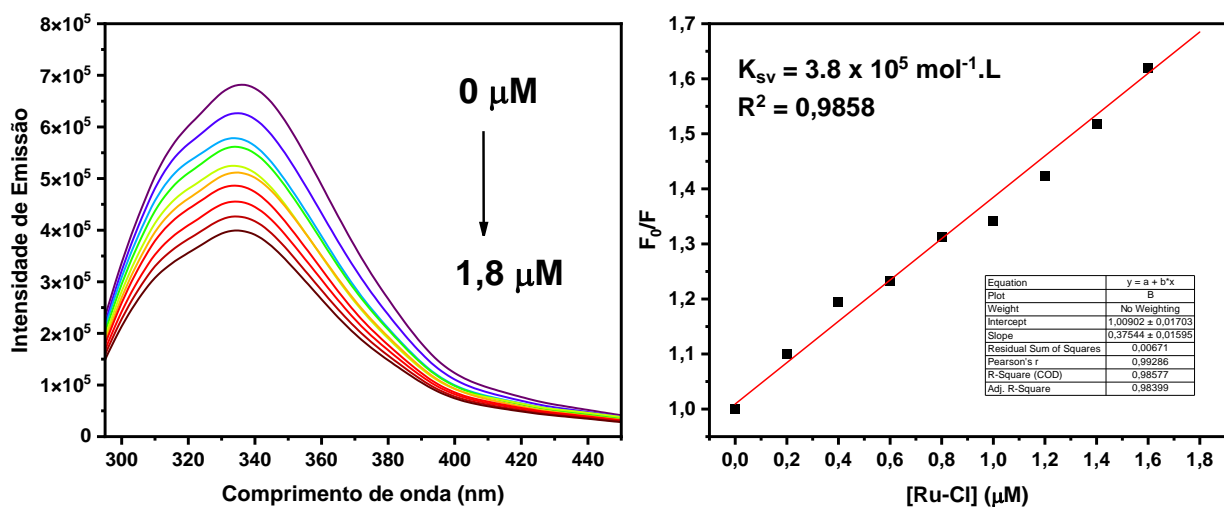
**Figura 93:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA  $1 \mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl  $50 \text{ mM}$  ( $\text{pH} = 7,4$ ) com adições sucessivas do complexo Ru-NO<sub>2</sub> à  $32^\circ\text{C}$  (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



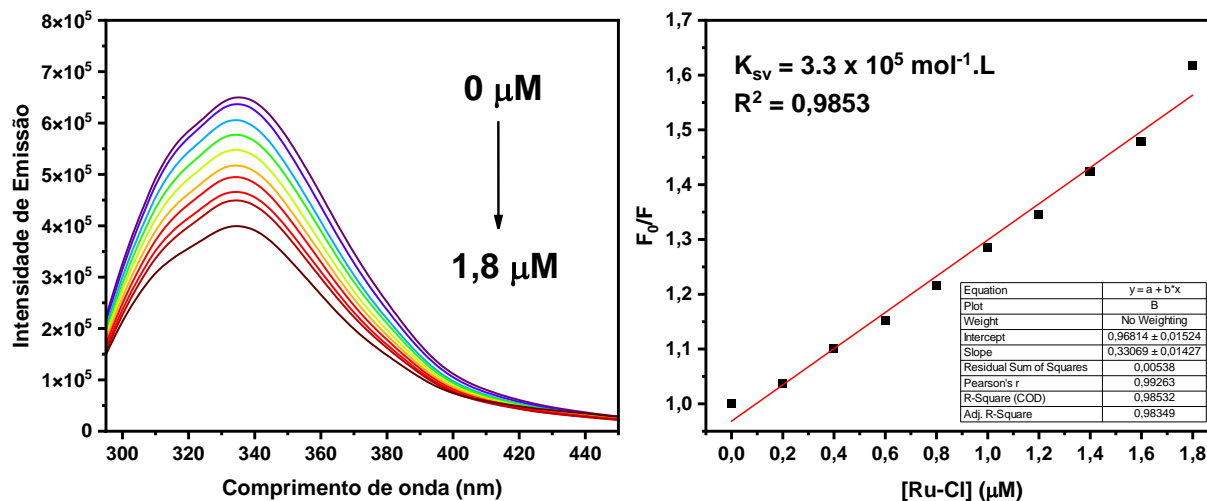
**Figura 94:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-NO<sub>2</sub> à 42°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



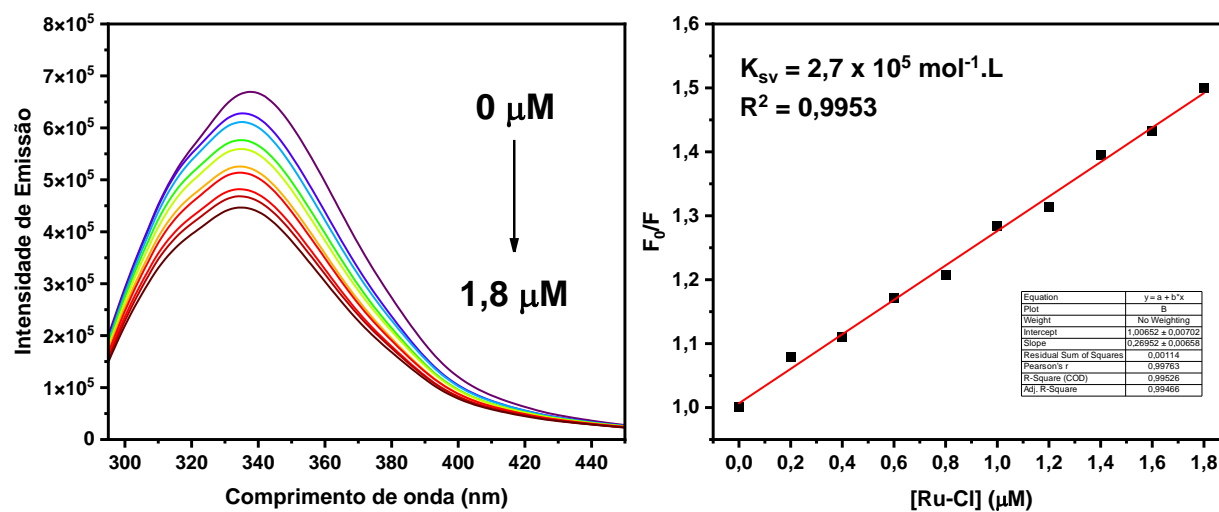
**Figura 95:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-Cl à 27°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



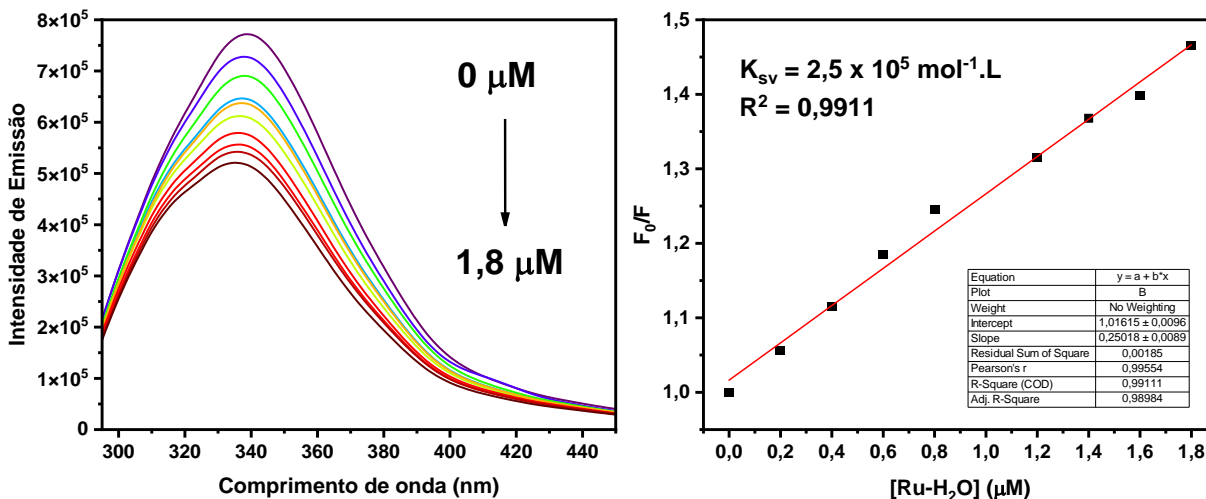
**Figura 96:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-Cl à 32°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



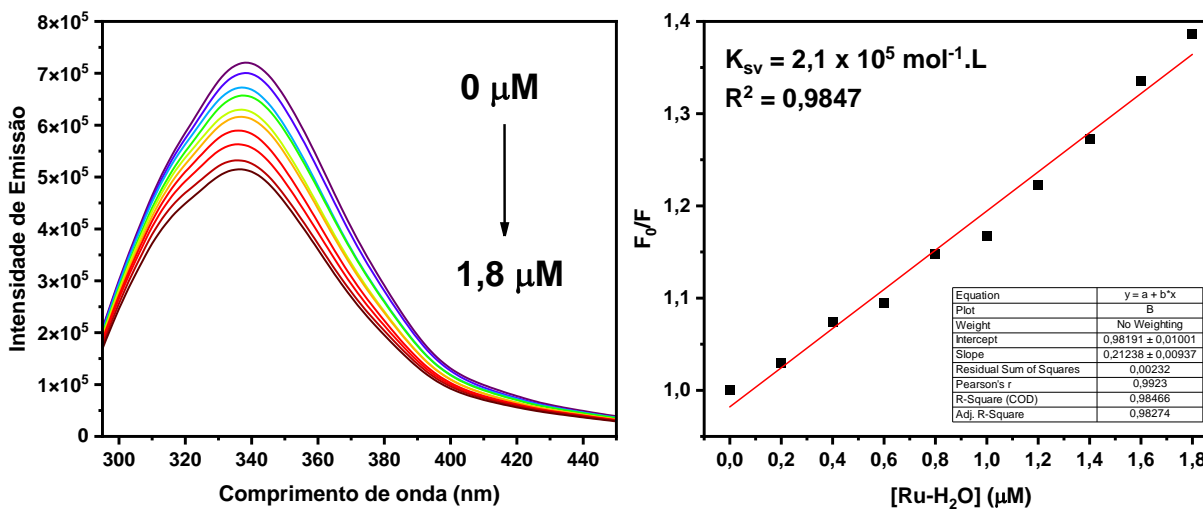
**Figura 97:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-Cl à 37°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



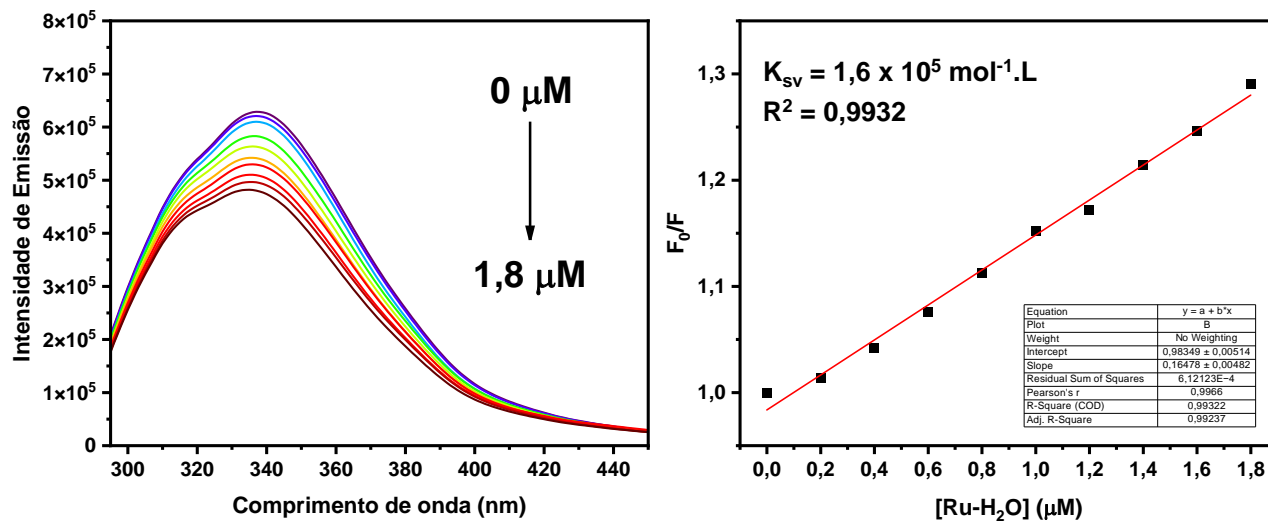
**Figura 98:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-H<sub>2</sub>O à 27°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



**Figura 99:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-H<sub>2</sub>O à 32°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



**Figura 100:** Titulação de supressão de fluorescência de uma solução de HSA 1  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) com adições sucessivas do complexo Ru-H<sub>2</sub>O à 37°C (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



**Figura 101:** Retas de Van't Hoff para a interação do complexo Ru-NO<sub>2</sub> (esquerda) e Ru-H<sub>2</sub>O (direita) com a HSA.

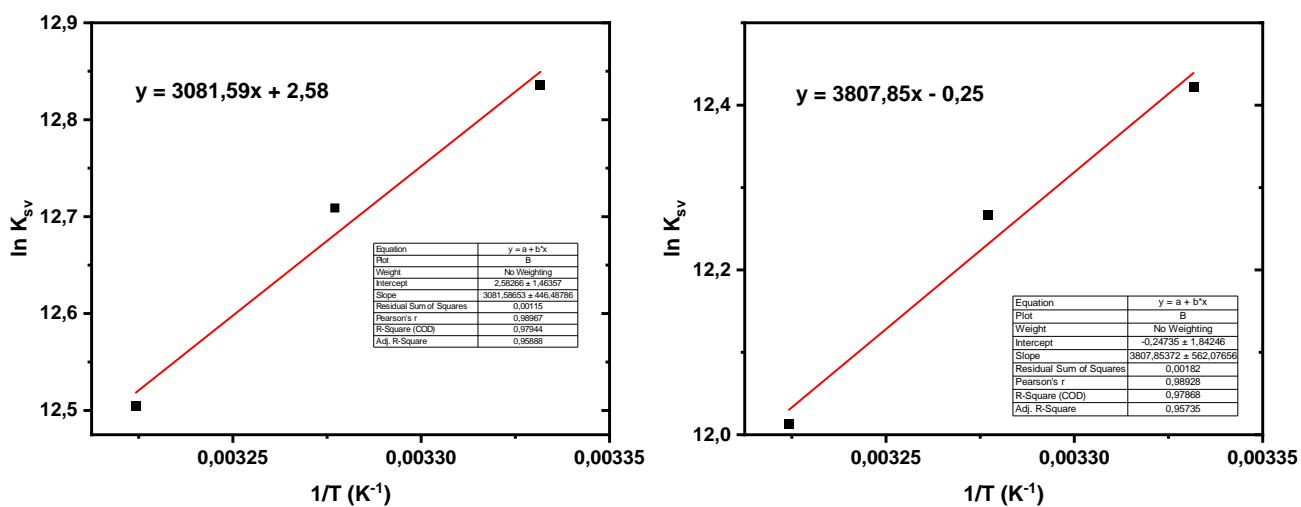


Figura 102: Regressão linear de Stern-Volmer para a interação do complexo Ru-NO<sub>2</sub> com o fs-DNA.

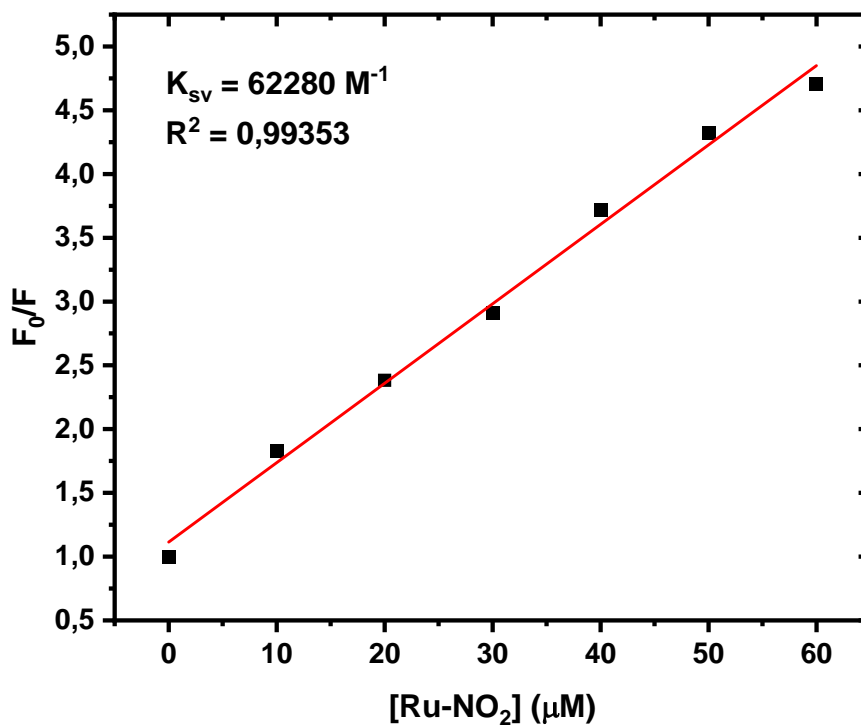
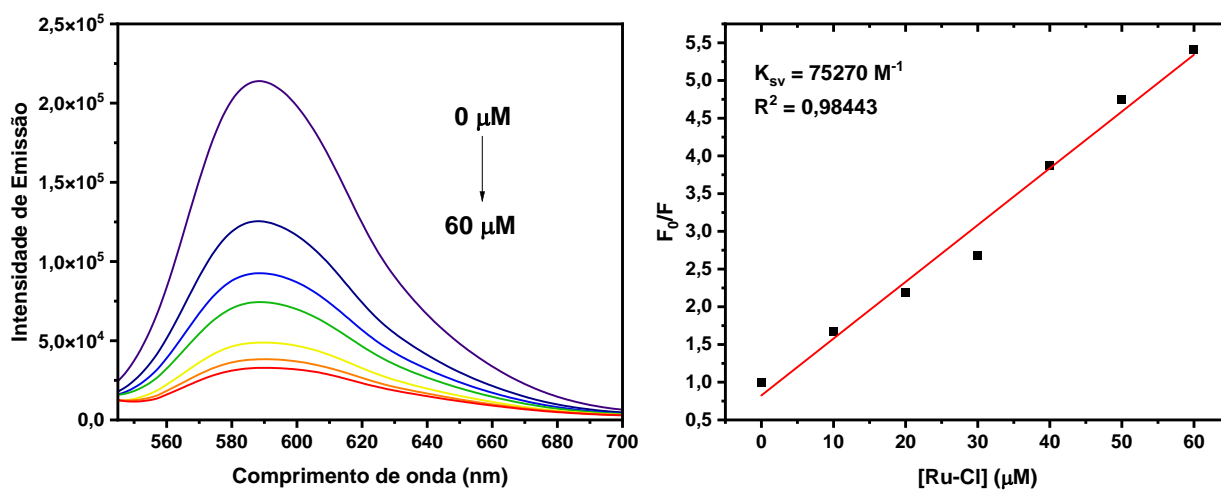
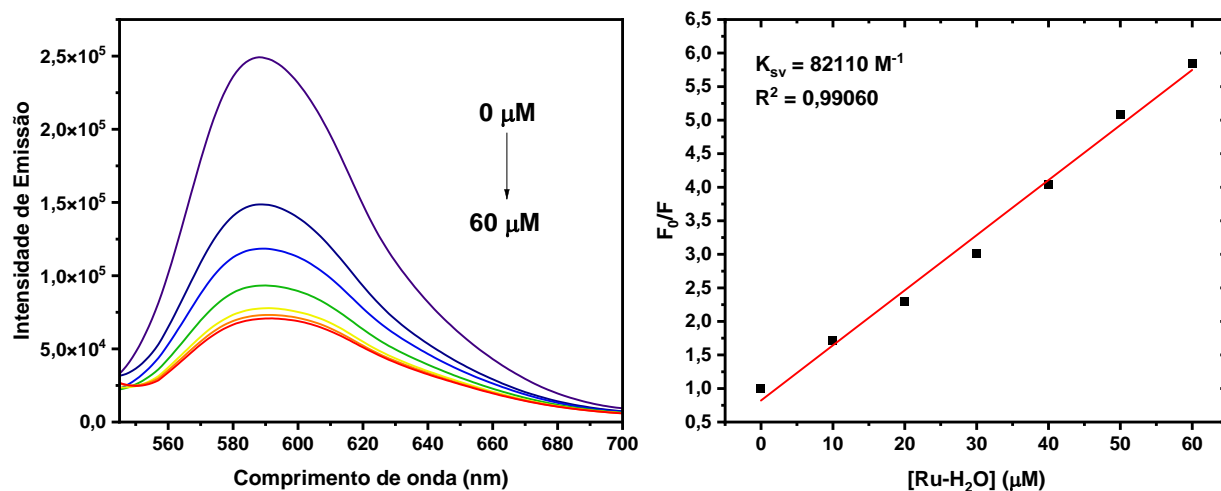


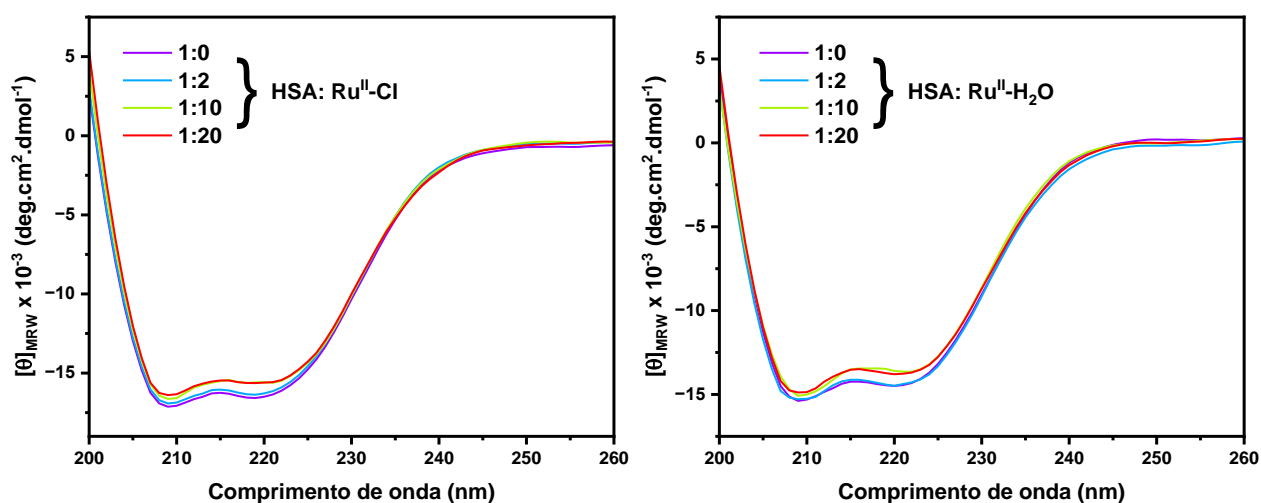
Figura 103: Titulação de supressão de fluorescência do fs-DNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4 e NaCl 5 mM) com o complexo Ru-Cl (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



**Figura 104:** Titulação de supressão de fluorescência do fs-DNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4 e NaCl 5 mM) com o complexo Ru-H<sub>2</sub>O (esquerda) e regressão linear de Stern-Volmer (direita).



**Figura 105:** Espectros de CD da HSA (1 μM) na presença do complexo Ru-Cl (esquerda) e Ru-H<sub>2</sub>O (direita) em diferentes proporções.





**Figura 106:** Espectros de CD do fs-DNA (200  $\mu\text{M}$ ) na presença do complexo Ru-Cl (esquerda) e Ru-H<sub>2</sub>O (direita) em diferentes proporções.

