



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PATRÍCIA HELENITA ROCHA MARTINS GALHARDO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS POLIPIRIDÍNICOS DE RUTÊNIO (II):
ESTUDOS DE REATIVIDADE E POTENCIAL BIOLÓGICO**

FORTALEZA

2024

PATRÍCIA HELENITA ROCHA MARTINS GALHARDO

DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS POLIPIRIDÍNICOS DE RUTÊNIO (II):
ESTUDOS DE REATIVIDADE E POTENCIAL BIOLÓGICO

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique S. Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G155d Galhardo, Patrícia Helenita Rocha Martins.
Desenvolvimento de complexos polipiridínicos de rutênio (II): Estudos de reatividade e potencial biológico / Patrícia Helenita Rocha Martins Galhardo. – 2024.
171 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, 0, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes.

1. Rutênio. 2. DNA. 3. Óxido nítrico. 4. Vasodilatação. 5. Bactéria. I. Título.

CDD

A Deus.

A minha mãe que durante todo esse período apoiou, incentivou e me fortaleceu nos momentos que não estava bem, foi a única rede de apoio nos cuidados com a minha filha. À Clarissinha que as vezes mesmo tirando minha paciência esteve ao meu lado em todos os momentos. Meu pai pelo incentivo e que orgulhosamente fala para todos que tem uma filha fazendo doutorado. Meu esposo que sempre esteve ao meu lado. E meu irmãozinho que não está mais nesse mundo, mas que tinha tanto prazer em falar para todos os amigos que eu estudava na UFC.... Sei que está muito feliz pelo encerramento desse ciclo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao professor Dr. Eduardo Henrique S. Sousa pela excelente qualidade na orientação, imensa paciência e dedicação oferecida durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes pela coorientação e pelo empenho em publicar o edital para eu conseguir a bolsa na seleção que participei, se não fosse seu esforço não teria entrada nessa seleção que fui contemplada com a bolsa.

Aos professores do grupo de Bioinorgânica da UFC: Dra. Izaura, Dra. Idalina, Dra. Alda Karine e o saudoso Dr. Jackson (*In Memoriam*).

Ao laboratório de fisiologia e farmacologia cardiovascular e renal (LAFCAR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) coordenado pelo prof. Dr. Nilberto Nascimento e o aluno de doutorado Iury pelos ensaios de vasodilatação.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) e o aluno de doutorado Alexandre pela realização dos estudos de atividade bacteriana, biomassa e hemólise.

Ao Prof. Dr. Adolfo do Departamento de Química da *University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, USA* que durante todo o mestrado e doutorado, se disponibilizou a ajudar na produção dos meus artigos e realização dos experimentos.

Ao meu amigo Marquinhos que desde a graduação esteve presente em todos os momentos que precisei, sempre apoiando e incentivando em todas as situações que necessito. E ao Francisco das Chagas (Chaguinha) pelo RMN que se dispôs a realizar.

As minhas amigas Geângela e Mayara que tive a oportunidade de conhecê-las durante o doutorado, sempre que solicitava sua ajuda estavam disponíveis, tanto no desenvolvimento das sínteses, tratamento de dados e nos momentos de desabafo.

Aos meus amigos Ana Cláudia, Welinson, Walysson, Juliana, Auridéia, Ricardo, Andreiane, Monilson, Henrique, Suesley, Caian, Florêncio que sempre estiveram presentes no desenvolvimento do meu trabalho, que me auxiliavam nos momentos que precisava e que em muitos momentos disponibilizaram seu precioso tempo para acompanhar ou realizar algum experimento que precisei.

RESUMO

Estudos envolvendo complexos polipiridínicos de rutênio despertaram o interesse da comunidade científica por, geralmente, apresentarem baixa toxicidade, comparado a outros sistemas candidatos a metalofármacos. Associado à essa característica, dispõe-se de ligantes atrativos a serem incorporados no sistema como o fenazínico (dppz = dipirido [3,2-a:2',3'-c]fenazina) e a bipyridina (bpy = 2,2' bipyridina). O ligante dppz, conhecido intercalante de DNA, e o óxido nítrico, que apresenta características vasodilatadoras, antiparasitária, dentre outras. Portanto, esse trabalho buscou combinar tais propriedades, sendo sintetizados três complexos polipiridínicos de rutênio: $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2](\text{PR})$, $\text{Na}[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{SO}_3)(\text{NO}_2)](\text{PR01})$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)(\text{PR02})$. Estes compostos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, eletroquímica, análise elementar e espectrometria de massas. A titulação ácido-base do composto **PR02** apresentou evidência de dois equilíbrios químicos em pH 5,94 e 9,16, atribuídos à protonação do nitrogênio do ligante dppz e a 50% de interconversão de NO^+ a NO_2^- , respectivamente. Ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) evidenciaram a formação do íon superóxido em concentração reduzida do composto **PR02** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$). As constantes de associação (K_b) ao DNA foram obtidas para os compostos, cujos valores encontram-se na ordem de 10^4 para o complexo **PR** e 10^5 para os complexos **PR01** e **PR02**. As medidas de eletroforeses em gel de agarose mostraram interação/clivagem do DNA após irradiação de luz, havendo aumento da clivagem do DNA com o aumento da concentração. O complexo **PR02** teve ainda sua capacidade de clivar DNA na presença de H_2O_2 sendo inibida com tiron (supressor de $\text{O}_2^{\bullet-}$) e cPTIO (supressor de NO/HNO). Estudos por dicroísmo circular mostraram a interação dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02** com DNA do tipo dupla fita e G-quadruplex. Estudos biológicos evidenciaram atividade vasodilatadora moderada para o complexo **PR02** ($\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$). A ação antimicrobiana foi também investigada, sendo observado atividade promissora do composto **PR02**. Além disso, esse composto apresentou capacidade de reduzir a biomassa bacteriana e atividade antibacteriana sinérgica quando combinado com antibióticos em uso clínico. Os complexos não provocaram hemólise nas máximas concentrações estudadas, sugerindo, inicialmente, um parâmetro de segurança de uso. Esses resultados mostraram um perfil farmacológico promissor para o composto **PR02** e posterior investigações.

Palavras-chave: rutênio; dna; óxido nítrico; vasodilatação; bactéria.

ABSTRACT

Studies involving ruthenium polypyridine complexes has brought interest of the scientific community because they generally present low toxicity compared to other metallopharmaceutical candidate systems. Associated with this characteristic, there are appealing ligands that can be incorporated into these systems, such as those based on phenazine type (e.g., dppz = dipyrdo[3,2-a:2',3'-c]fenazine) and bipyridine = 2,2' bipyridine, a known DNA intercalator, and nitric oxide, which has vasodilatory and antiparasitic properties, among others. Thus, in this work, these properties were combined, where three ruthenium polypyridine complexes were synthesized: precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ (**PR**), and compounds $\text{Na}[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{SO}_3)(\text{NO}_2)]$ (**PR01**) and $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)$ (**PR02**). These compounds were characterized by spectroscopic techniques, electrochemistry, elemental analysis and mass spectrometry. Acid-base titration of the compound **PR02** showed evidence of two pH-dependent chemical equilibria at pHs 5.94 and 9.16, attributed to the protonation of the nitrogen of the dppz ligand and interconversion of NO^+ to NO_2^- , respectively. Reactive oxygen species (ROS) generation tests showed the formation of superoxide ion at a low concentration of the compound **PR02** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$). The association constants (K_b) with DNA were obtained, whose values are in the order of 10^4 for **PR** complex and 10^5 for **PR01** and **PR02** complexes. Agarose gel electrophoresis measurements showed interaction/cleavage of DNA after light irradiation, with enhancement of DNA cleavage with increasing concentrations. **PR02** complex also had its ability to cleave DNA in the presence of H_2O_2 inhibited with tiron (suppressor of $\text{O}_2^{\cdot-}$) and cPTIO (NO/HNO suppressor). Circular dichroism studies supported the interaction of the **PR**, **PR01** and **PR02** complexes with double-stranded and G-quadruplex DNA. Biological studies showed moderate vasodilatory activity for the **PR02** complex ($\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$). The antimicrobial action was also investigated, where promising activity of the compound **PR02** was observed. Furthermore, this compound showed the ability to reduce bacterial biomass and synergistic antibacterial activity in combination with antibiotics of clinical use. Hemolytic activity assay showed that the **PR**, **PR01** and **PR02** complexes did not cause hemolysis at the maximum concentrations studied, initially suggesting a safety for use. Altogether, these results indicate **PR02** as a promising drug candidate that deserve further biological studies.

Keywords: ruthenium; dna; nitric oxide; vasodilation; bacterium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas de complexos de rutênio (II) e (III) em ensaios clínicos e pré-clínicos.....	23
Figura 2 - Ligantes bpy (2,2'-bipiridina) (1) e dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina) (2).....	26
Figura 3 - Ilustração adaptada das formas de DNA tipo A, B, Z, Triplex, i-Motif G-quadruplex.....	28
Figura 4 - Síntese endógena do NO(KNOWLES <i>et al.</i> , 1994).....	30
Figura 5 - Ilustração da produção de cGMP via estimulação da guanilato ciclase solúvel sGC por meio do NO.....	31
Figura 6 - Estrutura dos complexos PR, PR01 e PR02.....	34
Figura 7 - Espectro eletrônico experimental (—) e teórico (—) na região do uv-vis do complexo PR em DMSO na concentração 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	53
Figura 8 - Espectro eletrônico teórico (—) e experimental (—) na região do uv-vis do complexo PR01 em DMSO na concentração 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	54
Figura 9 - Espectros eletrônicos experimental (—) e teórico (—) do complexo PR02 em DMSO na concentração 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	55
Figura 10 - Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo PR02 calculados por TD – DFT.....	57
Figura 11 - Contribuições dos orbitais moleculares da espécie PR02 em função de seus fragmentos: Ru (—), bpy (—), dppz (—), SO_3^{2-} (—) e NO^+ (—) ..	58
Figura 12 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo PR, teórico (—) e experimental (—) ..	59
Figura 13 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo PR01, teórico (—) e experimental (—) ..	60
Figura 14 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo PR02, teórico (—) e experimental (—) ..	60
Figura 15 - Espectro de Ressonância Magnética de ^1H para o complexo PR02 em clorofórmio/metanol (3:1) deuterado, obtido na frequência 300MHz.....	62
Figura 16 - Espectrometria de massas do complexo PR em água.....	66

Figura 17 - Espectrometria de massas do complexo PR01 em água.....	66
Figura 18 - Espectrometria de massas do complexo PR02 em água.....	67
Figura 19 - Voltamograma cíclico do complexo precursor PR, obtidos em DMF contendo PTBA 0,1 mol L ⁻¹ (eletrólito suporte) com velocidade de varredura de 100mV s ⁻¹ , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se Ferroceno como padrão interno.....	68
Figura 20 - Voltamograma cíclico do complexo PR01 obtido em DMF contendo PTBA 0,1 mol L ⁻¹ (eletrólito de suporte) com velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se Ferroceno como padrão interno	69
Figura 21 - Voltamograma cíclico do complexo PR02 obtido em NaTFA 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0, com velocidade de varredura de 25 mV s ⁻¹ , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se Ferroceno como padrão interno ...	69
Figura 22 - Correlação entre v(NO) para complexos trans e cis- [Ru(L) ₂ LNO](PF ₆) _n e E _{1/2} para a reação redox cis-[Ru ^{II} (bpy) ₂ LNO ⁺] ⁺ⁿ e trans - [Ru ^{II} (L) ₂ LNO ⁰] ⁺ⁿ , vs Ag/AgCl.....	70
Figura 23 - Dependência do pH para o complexo PR02.....	72
Figura 24 - Estudo cinético do complexoPR02 na concentração de 20 µmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 em 5% de DMSO na ausência (1) e presença de luz (2), monitorado por 2h.....	74
Figura 25 - Estudo cinético do complexo PR02 20 µmol L ⁻¹ em NaTFA 0,1 mol L ⁻¹ em pH 4,0 irradiado por 2 h com LED azul.....	75
Figura 26 - Estudo cinético do complexo PR02 20 µmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, na presença de GSH (1,5 mmol L ⁻¹) sem irradiação (1) e com irradiação de luz azul por 2h (2)	75
Figura 27 - Estudo de estabilidade térmica do complexo PR02 8,5 µmol L ⁻¹ em tampão fosfato pH 7,4 e 5% de DMSO sem irradiação (1) e com irradiação com LED azul por 720 min (12h) à 37°C (2)	77

Figura 28 - Estudo de estabilidade térmica do complexo PR02 frente a adição de peróxido de hidrogênio(H_2O_2) 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,4 e 5% de DMSO sem irradiação por 720 min (12h) à 37°C.....	79
Figura 29 -Estudo de estabilidade térmica do complexo PR02 (1) e <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ (2), com adição de glutathione (GSH) 1,5 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,4 e 5% de DMSO sem irradiação (3) e com irradiação com LED azul por 720 min (12h) a 37 °C (4)	80
Figura 30 - Estudo de liberação de NO/HNO através da reação do complexo PR02 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com cPTIO 190 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 sob irradiação no UV. Monitorando variações espectrais na região do UV-vis variando de (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 20 min, (—) 30 min, (—) 40 min, (—) 50 min, (—) 60 min, (—) 60 min + GSH (1). Gráfico (2) da velocidade da reação de liberação do complexo PR02 em NBT 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e glutathione (GSH) 1,5 mmol L^{-1}	85
Figura 31 - Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais da banda em 560 nm do NBT, nas concentrações do PR02 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—), 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—), 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—), 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—), 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—), 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—), 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—) com glutathione (GSH) 1,5 mmol. L^{-1} na presença de NBT 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato 0,1 mol. L^{-1} em pH 7,4, espectros obtido a cada 30s durante 3600s.....	87
Figura 32 - Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete.....	89
Figura 33 - Curvas cinéticas do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul)	89
Figura 34 - Dicroísmo circular com DNA de salmão (350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de bases), DNA G4 C-myc (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base) e DNA G4 HTG-21 (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base) com os complexos PR, PR01 e PR02, que foram adicionados até a concentração máxima de de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	95
Figura 35 - Ensaio de fotoclivagem do DNA pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos PR e PR02 em tampão Tris-HCl 0,1 mol L^{-1} , diferentes concentrações no escuro e após 120 min de irradiação usando LED azul. Poços 1: DNA marcador (fitas linearizadas), Poço 2: Apenas DNA	

pBR322 escuro e Poço 3: Apenas DNA pBR322 irradiado; Poços 4 - 15: Complexos + DNA pBR322 nas concentrações de 5, 15, 20 e 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$.. 97

Figura 36 - Ensaio de fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos PR e PR02 após 120 min de irradiação usando LED azul e adição de supressores de radicais. Poços 1: DNA marcador (fitas linearizadas), Poço 2: Apenas DNA pBR322 irradiado; Poço 3: Complexo PR irradiado; Poços 4 - 7: Complexo PR + DNA pBR322 nas concentrações de 5, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e adição dos supressores piruvato, histidina, manitol e TIRON, respectivamente; Poço 8: Complexo PR02 irradiado; Poços 9 - 13: Complexo PR02 + DNA pBR322 nas concentrações de 5, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e adição dos supressores piruvato, histidina, manitol e TIRON, respectivamente..... 100

Figura 37 - Ensaio de fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos PR e PR02 nas concentrações de 5, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 120 min de irradiação usando LED azul e adição de 5 mmol L^{-1} Peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Poços 1: DNA marcador (ladder), Poço 2 e 3: Apenas DNA pBR322 escuro + H_2O_2 e irradiado + H_2O_2 , respectivamente. Poços 4 - 6: Complexos PR + DNA pBR322 e adição de H_2O_2 sem irradiação; Poços 7 - 9: Complexos PR + DNA pBR322 e adição de H_2O_2 irradiado; Poços 10 - 12: Complexos PR02 + DNA e adição de H_2O_2 sem irradiação; Poços 13 - 15: Complexos PR02 + DNA pBR322 e adição de H_2O_2 irradiado..... 103

Figura 38 - Voltamograma cíclico do complexo PR02 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) obtido em tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, na presença de DNA (1 mmol L^{-1} em pares de base, salmão) e irradiado com luz azul durante 90 min (1), e gráfico de corrente de pico versus tempo (2), com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente..... 105

Figura 39 - Voltamograma pulso diferencial do complexo PR02 4 mmol L^{-1} obtido em tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, na presença de DNA 1 mmol L^{-1} com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando eletrodo de

carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.....	107
Figura 40 - Efeito do complexo de rutênio PR sobre a formação de biofilmes de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	116
Figura 41 - Efeito do complexo de rutênio PR01 sobre a formação de biofilmes de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	118
Figura 42 - Efeito do complexo de rutênio PR02 sobre a formação de biofilmes de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	120
Figura 43 - Atividade hemolítica dos complexos de rutênio PR, PR01 e PR02.....	124
Figura 44 - Curvas de dose-resposta para ensaio de vasodilatação em aorta de rato com os complexos PR e PR02. As respostas de relaxamento são expressas em percentual de relaxamento versus concentração de complexos.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de reagentes com suas respectivas procedências e grau de pureza.....	37
Tabela 2 - Lista de reagentes especiais com suas respectivas procedências e grau de pureza.....	38
Tabela 3 - Análise elementar de C, N e H para os complexos PR, PR01 e PR02.....	52
Tabela 4 - Transições eletrônicas calculadas de estado singlete para os complexos PR, PR01 e PR02.....	56
Tabela 5 - Principais bandas vibracionais apresentadas pelos complexos de rutênio sintetizados, obtidas por FTIR.....	61
Tabela 6 - Deslocamento químico de RMN ¹ H e atribuições para os complexos PR, PR01 e PR02.....	64
Tabela 7 - Dados da voltametria cíclica dos complexos PR, PR01 e PR02.....	70
Tabela 8 - Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete dos complexos PR, PR01 e PR02.....	90
Tabela 9 - Constante de ligação ao DNA (K _b) para diferentes complexos metálicos de rutênio.....	92
Tabela 10 - Valores de coeficientes de partição (Log P) para os compostos.....	111
Tabela 11 - Atividade antibacteriana dos compostos PR, PR01 e PR02.....	114
Tabela 12 - Efeito do complexo PR irradiado por luz led azul combinado aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra), sobre <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	122
Tabela 13 - Efeito do complexo PR02 irradiado por luz led azul combinado aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra), sobre <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>aeruginosa</i>	123

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
bpy	2,2' - bipyridina
cGMP	Guanosina-3',5'- monofosfato cíclica
cPTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-óxido de potássio
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
CT-DNA	Timo de bezerro (<i>Calf Thymus</i>)
TFD	Teoria do Funcional de Densidade
DMF	N,N - dimetilformamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DPBF	Difenilbenzofurano
dppz	Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Glutathione reduzida
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
IV	Infravermelho
TCLL	Transferência de Carga Ligante-Ligante
TCLM	Transferência de Carga do Tipo Ligante Metal
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia
TCML	Transferência de Carga Metal Ligante
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NBT	Azul de Nitro-Tetrazólio
NOS	Óxido Nítrico Sintase
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleto
pBR322	DNA plasmidial
PTBA	Perclorato de tetrabutylamônio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton

GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
SOD	Superóxido Dismutase
TAE	Tris-Acetato EDTA
TFD-DT	Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV-Vis	Ultravioleta e Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
$\Lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda de máximo
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de geração de oxigênio singleto
Φ_{em}	Rendimento quântico de emissão
Δ	Deformação angular
E	Coefficiente de absortividade molar
N	Estiramento ou deformação axial
F	Força do oscilador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Ligantes Polipiridínicos.....	26
1.2	Aspectos gerais sobre o óxido nítrico.....	29
1.3	Complexos de Rutênio.....	32
2	OBJETIVO.....	35
2.1	Objetivos Específicos.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	Reagentes e soluções.....	37
3.2	Síntese dos Complexos.....	39
3.2.1	<i>Síntese do complexo precursor [Ru(bpy)(dppz)Cl₂] (PR).....</i>	39
3.2.2	<i>Síntese do complexo Na[Ru(bpy)(dppz)(SO₃)(NO₂)] (PR01)</i>	39
3.2.3	<i>Síntese do complexo [Ru(bpy)(dppz)(SO₃)(NO)](PF₆) (PR02)</i>	39
3.3	Equipamentos e Técnicas experimentais.....	40
3.3.1	<i>Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV.....</i>	40
3.3.2	<i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....</i>	40
3.3.3	<i>Modelagem Molecular – Cálculos quanto-mecânicos.....</i>	40
3.3.4	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H.....</i>	41
3.3.5	<i>Espectrometria de massas.....</i>	41
3.3.6	<i>Medidas eletroquímicas.....</i>	41
3.4	Determinação da constante de equilíbrio de interconversão de NO ⁺ /NO ₂ ⁻ coordenados.....	42
3.5	Estudos de liberação de NO.....	43
3.6	Investigação de produção de NO por sonda seletiva.....	43

3.7	Estudo de Geração de Radical Superóxido.....	43
3.8	Espectroscopia de emissão.....	43
3.8.1	<i>Rendimento quântico de emissão.....</i>	44
3.8.2	<i>Rendimento quântico (geração de $^1O_2$)</i>	44
3.9	Estudo de interação e danos ao DNA.....	45
3.9.1	<i>Titulação de DNA.....</i>	45
3.9.2	<i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	45
3.9.3	<i>Estudos de fotólise.....</i>	46
3.9.4	<i>Reatividade com Peróxido de Hidrogênio.....</i>	46
3.9.5	<i>Supressores de radicais livres.....</i>	46
3.10	Dicroísmo Circular.....	47
3.11	Coeficiente de Partição (logP).....	47
3.12	Ensaio Biológicos.....	48
3.12.1	<i>Estudo de Vasodilatação.....</i>	48
3.12.2	<i>Atividade antibacteriana.....</i>	48
3.12.3	<i>Ensaio sobre a inibição da formação do biofilme e quantificação de biomassa.....</i>	49
3.12.4	<i>Avaliação do efeito combinado dos complexos de rutênio.....</i>	49
3.12.5	<i>Atividade hemolítica.....</i>	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Caracterização dos complexos de rutênio.....	52
4.1.1	<i>Análise Elementar.....</i>	52
4.1.2	<i>Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.....</i>	53
4.1.3	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....</i>	59
4.1.4	<i>Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H.....</i>	60

4.1.5	<i>Espectrometria de massa.....</i>	65
4.1.6	<i>Voltametria cíclica.....</i>	65
4.2	Determinação da constante de equilíbrio de interconversão de $\text{NO}^+/\text{NO}_2^-$.....	71
4.3	Estudos de reatividade do NO.....	73
4.4	Investigação da geração seletiva para NO ou HNO.....	83
4.5	Estudo de geração de radical superóxido.....	86
4.6	Estudo de geração de oxigênio singlete.....	88
4.7	Estudos de interação e danos ao DNA.....	91
4.7.1	<i>Medição da Constante de Associação (Kb) ao DNA.....</i>	81
4.7.2	<i>Dicroísmo Circular.....</i>	92
4.7.3	<i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	96
4.7.3.1	<i>Investigação da interação e clivagem de DNA na ausência e presença de Luz.....</i>	96
4.7.3.2	<i>Estudo com supressores de espécies reativas de oxigênio nitrogênio...</i>	99
4.7.3.3	<i>Estudo com adição de peróxido de hidrogênio.....</i>	102
4.7.4	<i>Estudos de interação com DNA por eletroquímica.....</i>	104
4.8	Lipofilicidade (Log P)	108
4.9	Ensaio de atividade antibacteriana.....	112
4.10	Ensaio de inibição da formação do biofilme e quantificação de biomassa.....	115
4.11	Avaliação do efeito dos complexos de rutênio combinado aos antibióticos clínicos.....	120
4.12	Atividade Hemolítica.....	123
4.13	Ensaio de vasodilatação para os complexos PR e PR02.....	124

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
	REFERÊNCIAS.....	130
	APÊNDICE A - ESPECTRO ELETRÔNICO NA REGIÃO DO UV-VIS DO COMPLEXO PR (A), PR01 (B) E PR02 (C) EM DMSO NA CONCENTRAÇÃO 20 μMOL L⁻¹.....	147
	APÊNDICE B - CONTRIBUIÇÕES DOS ORBITAIS MOLECULARES DA ESPÉCIE PR EM FUNÇÃO DE SEUS FRAGMENTOS Ru (—), bpy (—), Cl (—) e dppz (—).....	149
	APÊNDICE C - SUPERFÍCIES DE CONTORNO DOS ORBITAIS MOLECULARES DO COMPLEXO PR CALCULADOS POR TD-DFT.....	150
	APÊNDICE D - CONTRIBUIÇÕES DOS ORBITAIS MOLECULARES DA ESPÉCIE PR01 EM FUNÇÃO DE SEUS FRAGMENTOS RU (—), BPY (—), DPPZ (—), SO₃²⁻ (—) E NO₂⁻ (—).....	151
	APÊNDICE E - SUPERFÍCIES DE CONTORNO DOS ORBITAIS MOLECULARES DO COMPLEXO PR01 CALCULADOS POR TD-DFT.....	152
	APÊNDICE F - ESPECTRO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS COMPLEXOS PR (—), PR01 (—) E PR02 (—), EM PASTILHA DE KBr.....	153
	APÊNDICE G - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ¹H PARA O COMPLEXO [RU(BPY)(DPPZ)CL₂] - PR EM CLOROFÓRMIO/METANOL (3:1), OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 500 MHZ.....	154
	APÊNDICE H - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ¹H BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO PR EM CLOROFÓRMIO/METANOL (3:1) DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHZ.....	155

APÊNDICE I - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H PARA O COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})(\text{DPPZ})(\text{SO}_3)(\text{NO}_2)] - \text{PR01}$ EM DMF DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 500 MHZ.....	156
APÊNDICE J - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO PR01 EM DMF DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 500 MHZ.	157
APÊNDICE K - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO PR02 EM DMSO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHZ	158
APÊNDICE L - ESTUDO CINÉTICO DOS COMPLEXOS PR E PR01 NA CONCENTRAÇÃO DE $20 \mu\text{MOL L}^{-1}$ EM TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ MOL L}^{-1}$ PH 7,4 EM 5% DE DMSO NA AUSÊNCIA DE LUZ, MONITORADO POR 2H.....	159
APÊNDICE M - MONITORAMENTO DE REATIVIDADE DO COMPLEXO PR $20 \mu\text{MOL L}^{-1}$ EM TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ MOL L}^{-1}$ EM PH 7,4, SOB IRRADIAÇÃO DE LUZ AZUL POR 2H, NA PRESENÇA DE NBT (A) E ACOMPANHAMENTO DA BANDA 560 NM NA PRESENÇA DO COMPLEXO NAS CONCENTRAÇÕES DE $1 \mu\text{MOL L}^{-1}$, $30 \mu\text{MOL L}^{-1}$ E $75 \mu\text{MOL L}^{-1}$ (B).....	160
APÊNDICE N - ESPECTROS DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO, APENAS COM (A) DPBF, NA PRESENÇA DE (B) $[\text{Ru}(\text{BPY})_3]^{2+}$, (C) PR, (D) PR01 E (E) PR02. FENDAS: $0,3 \text{ MM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410\text{NM}$. TEMPO DE IRRADIAÇÃO VARIANDO DE 0 – 320S. AMOSTRAS IRRADIADAS <i>EX SITU</i> USANDO LED AZUL.....	161

APÊNDICE O - ENSAIO DE FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS PR01 EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL L^{-1} , PH 7,4 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO ESCURO E APÓS 120 MIN DE IRRADIAÇÃO EM LED AZUL ($\lambda_{\text{MÁX}} = 458 \text{ NM}$). POÇO 1: MARCADOR DE FITAS LINEARES DE DNA (*MOLECULAR LADDER*). POÇO 2: APENAS DNA PBR322 NO ESCURO E POÇO 3: APENAS DNA PBR322 COM LUZ. POÇOS 4 - 9: COMPLEXOS + DNA PBR322 NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 15 E 45 $\mu\text{MOL L}^{-1}$

162

APÊNDICE P - ENSAIO DE FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS PR E PR02 EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL L^{-1} , PH 7,4 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO ESCURO E APÓS 120 MIN DE IRRADIAÇÃO EM LED VERDE ($\lambda_{\text{MÁX}} = 520 \text{ NM}$). POÇO 1: MARCADOR DE FITAS LINEARES DE DNA (*MOLECULAR LADDER*). POÇO 2: APENAS DNA PBR322 NO ESCURO E POÇO 3: APENAS DNA PBR322 NO CLARO. POÇOS 4 - 15: COMPLEXOS + DNA PBR322 NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 15, 20 E 45 $\mu\text{MOL L}^{-1}$

163

APÊNDICE Q - ENSAIO DE FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS PR E PR02 EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL L^{-1} , PH 7,4 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO ESCURO E APÓS 120 MIN DE IRRADIAÇÃO EM LED VERMELHO ($\lambda_{\text{MÁX}} = 693 \text{ NM}$). POÇO 1: MARCADOR DE FITAS LINEARES DE DNA (*MOLECULAR LADDER*). POÇO 2: APENAS DNA PBR322 NO ESCURO E POÇO 3: APENAS DNA PBR322 NO CLARO. POÇOS 4 - 15: COMPLEXOS + DNA PBR322 NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 15, 20 E 45 $\mu\text{MOL L}^{-1}$ COM E SEM IRRADIAÇÃO COM LUZ VERMELHA.....

164

APÊNDICE R - ENSAIO DE FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS PR (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) E PR02 (50$\mu\text{MOL L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL L^{-1}, PH 7,4 NO ESCURO E APÓS 30 E 120 MIN DE IRRADIAÇÃO COM LED AZUL ($\lambda_{\text{MÁX}} = 458 \text{ NM}$) E NA PRESENÇA DE GLUTATIONA (GSH - 5 MMOL L^{-1}). POÇO 1: MARCADOR DE FITAS LINEARES DE DNA (<i>MOLECULAR LADDER</i>). POÇOS 2, 3 - APENAS DNA PBR322 NO ESCURO E IRRADIADO COM LUZ AZUL; POÇO 4,5: DNA PBR322 COM GSH NO ESCURO E IRRADIADO COM LUZ AZUL. POÇOS 6 E 7: PR + DNA PBR322; POÇOS: 8 - 10: COMPLEXOS PR + DNA PBR322 COM GSH NO ESCURO E IRRADIADO COM LUZ AZUL; POÇOS 11 E 12: PR02 + DNA PBR322; POÇOS: 13 - 15: COMPLEXOS PR02 + DNA PBR322 E GSH NO ESCURO E NO CLARO.....	165
APÊNDICE S – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPLEXO PR CORRESPONDENTE À BANDA 475 NM NA FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE $1,0 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$ À $1,9 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$	166
APÊNDICE T – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPLEXO PR01 CORRESPONDENTE À BANDA 360 NM NA FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6} \text{ MOL L}^{-1}$ À $1,0 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$	167
APÊNDICE U – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPLEXO PR02 CORRESPONDENTE À BANDA 363 NM NA FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE $3,0 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$ À $5,5 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$	168
ANEXO A - REACTIVITY OF NITROSYL RUTHENIUM COMPLEX AND ITS POTENTIAL IMPACT ON THE FATE OF DNA – AN IN VITRO INVESTIGATION.....	169

ANEXO B – ANTI-BACTERIAL, ANTI-BIOFILM AND SYNERGISTIC EFFECTS OF PHENAZINE-BASED RUTHENIUM(II) COMPLEXES.....	170
---	------------

1 INTRODUÇÃO

Compostos a base de metais de transição constituem uma classe bastante estudada de possíveis quimioterápicos, dentre suas principais aplicações consiste na utilização como agentes antitumorais e antivirais (LEDNICER, 2007). Exemplos de metalofármacos antitumorais consagrados e usados rotineiramente em tratamentos clínicos são a cisplatina [cis-diaminodicloroplatina(II)] e seus análogos carboplatina e oxaliplatina (BORTOLAMIOL *et al.*, 2023; BRABEC *et al.*, 2006)

A cisplatina (CDDP, cis-diaminodicloridoplatina(II)) é uma das drogas a base de íons metálicos anticâncer mais utilizadas na prática clínica de rotina (ALI *et al.*, 2013; WHEATE *et al.*, 2010). No entanto, seu uso é frequentemente associado a efeitos colaterais significativamente graves e limitantes da dose, incluindo nefrotoxicidade, neuropatia periférica, toxicidade hepática, mielotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e ototoxicidade. Além disso, o uso de cisplatina é limitado em muitos tipos de tumor por resistência primária ou adquirida a essa droga (BORTOLAMIOL *et al.*, 2023; BRABEC *et al.*, 2005).

Consequentemente, a resistência aos medicamentos e os efeitos colaterais limitam sua utilidade clínica. Essas limitações levaram a uma busca por novos agentes antitumorais baseados em íons metálicos mais eficazes e menos tóxicos. Esses entraves estimularam, inclusive, a investigação de outros complexos metálicos com atividade antitumoral similar ou melhor que a dos compostos de platina, porém com menor toxicidade. Portanto, vários compostos a base de íons metálicos foram sintetizados e caracterizados (BERGAMO *et al.*, 2008; CLARKE *et al.*, 1999; LUCACIU *et al.*, 2022; MORRIS *et al.*, 2001; MUHAMMAD *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, complexos de coordenação baseados em centros metálicos com configuração eletrônica do tipo d^6 em conjunto com arquiteturas de ligantes polipiridínicos foram desenvolvidos como agentes capazes de interagir com o DNA, inclusive com interações em regiões bem específicas dessa macromolécula (BRABEC *et al.*, 2006; PRATHIMA *et al.*, 2023). Dentre estes sistemas, alguns complexos de rutênio parecem ser promissores para o tratamento de câncer, alguns com atrativa ação sistêmica permitindo atividade na metástase de tumores sólidos (PRATHIMA *et al.*, 2023)

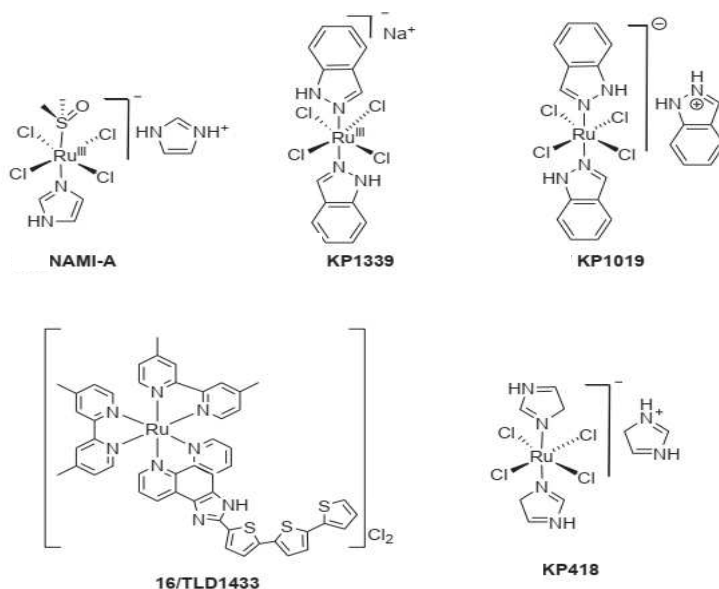
Alguns dos estudos em química inorgânica medicinal estão sendo direcionados para a concepção de agentes antitumorais baseados em metais de transição, como os complexos de

rutênio, atraindo muito interesse como drogas alternativas à cisplatina e análogos na quimioterapia do câncer (SUN *et al.*, 2021). Três desses complexos (Fig. 1), NAMI-A (trans-[tetraclorido(1H-imidazol)(S-dimetilsulfóxido) rutenato(III)]), KP1339 (trans-[tetracloridobis(1H-indazol) rutenato(III)] de sódio) e KP1019 (indazólio trans-[tetracloridobis(1H-indazol) rutenato(III)]) mostraram alta atividade antitumoral *in vivo* e entraram em ensaios clínicos em humanos (BERGAMO *et al.*, 2012; TRONDL *et al.*, 2014).

Embora NAMI-A e KP1019 mostrem semelhança estrutural, eles exibem diferentes atividades *in vitro* e *in vivo*. KP1019 é conhecido por ser ativo contra tumores primários, enquanto o NAMI-A é ativo contra tumores secundários por meio de atividades antiangiogênicas e antimetastáticas. O NAMI-A provou ser ativo contra a metástase tumoral, impedindo assim o desenvolvimento e crescimento de tumores, mas acabou tendo seus estudos clínicos descontinuados. KP1339, um precursor para KP1019 também entrou em avaliações clínicas devido à sua excepcional solubilidade aquosa. TLD1443, que está atualmente na fase 1 e fase 2a dos ensaios clínicos, vem sendo investigado no tratamento de câncer de bexiga por meio de terapia fotodinâmica.

Ainda foi desenvolvido um complexo solúvel em água KP418, cujo ligante indazólio é substituída por um íon imidazólio (RIEDL *et al.*, 2021). Este último provou exibir melhor atividade anticarcinogênica, comparado ao 5-fluorouracil, cisplatina e ciclofosfamida contra câncer colorretal com evidente inibição do crescimento tumoral de até 90% (EL-HABEEB *et al.*, 2024; PRATHIMA *et al.*, 2023; SAVA *et al.*, 2011). NKP1339, o sal de sódio de KP1019, exibiu solubilidade melhorada e citotoxicidade significativa (WANG *et al.*, 2015).

Figura 1. Estruturas de complexos de rutênio (II) e (III) em ensaios clínicos e pré-clínicos.



Baseando-se nos resultados promissores apresentados pela cisplatina e seus derivados (Fig. 1), numerosos complexos metálicos, incluindo sistemas baseados em rutênio foram projetados devido exibir função semelhante (GILL *et al.*, 2012).

Os metalocompostos que apresentam o rutênio como átomo central são promissores para uso clínico, principalmente pela expectativa de sua baixa toxicidade e similaridade com os compostos baseados em ferro, comparados aos complexos de platina. Essa similaridade com o ferro, devido as suas características químicas, supõem que o mecanismo de remoção desse metal do organismo seja similar, principalmente pelo uso de proteínas transportadoras e quelantes de íons metálicos, como exemplo a transferrina e albumina (CLARKE, 2002).

No entanto, mesmo os complexos de rutênio apresentando similaridade química com o ferro, a variação do estado de oxidação em meio fisiológico (Ru^{2+} , Ru^{3+} e Ru^{4+}) poderá influenciar na toxicidade do rutênio (BERTOLINI, 2004; CLARKE, 2002).

Alguns complexos de rutênio apresentam uma cinética de troca de ligante semelhante as drogas antitumorais de platina (II) já utilizados clinicamente, entretanto, apresentam aparentemente baixa toxicidade. Isso se deve, em parte, à capacidade dos complexos de rutênio de imitar a ligação do ferro a moléculas de importância biológica, explorando os mecanismos que o corpo desenvolveu para o transporte de ferro (GUIN *et al.*, 2022). A recente descoberta de diferentes vias de substituição da transferrina pelo complexo de Ru (II) foi descrita (GUO *et al.*, 2013). Esses estudos mostraram que complexos de Ru(III) antitumoral foram capazes de substituir Fe(III) na transferrina (GUIN *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2013).

Além disso, o potencial redox entre os diferentes estados de oxidação acessíveis nos complexos de rutênio permite que o corpo promova reações de oxidação e redução, dependendo do ambiente fisiológico (MADEC *et al.*, 2023). As mudanças bioquímicas que acompanham o câncer alteram o ambiente fisiológico, permitindo que os complexos de rutênio sejam ativados seletivamente nos tecidos cancerosos (GILL *et al.*, 2012; MADEC *et al.*, 2023).

Outra importante característica dos complexos de rutênio é a capacidade de assumir diferentes estruturas tridimensionais que são proporcionados pela grande variedade de ligantes e suas formas de interação, assim, devido a sua geometria os compostos de rutênio podem interagir com o DNA afetando sua conformação de forma diferente da cisplatina e seus análogos. Além disso, alvos diferentes do núcleo celular, como a mitocôndria e a membrana

celular, estão sendo estudados mostrando atividade antineoplásica de alguns complexos de rutênio (PRATHIMA *et al.*, 2023).

Assim, os compostos de rutênio vêm mostrando grande potencial sobre os complexos antitumorais de platina (II), atualmente investigados em testes clínicos por apresentarem toxicidade reduzida, um novo mecanismo de ação, a perspectiva de não ter resistência cruzada e um espectro diferente de atividades biológicas. Em outras palavras, algumas propriedades químicas tornam os compostos de rutênio adequados para aplicações medicinais e como uma alternativa aos medicamentos antitumorais de platina no tratamento de células cancerosas resistentes à cisplatina.

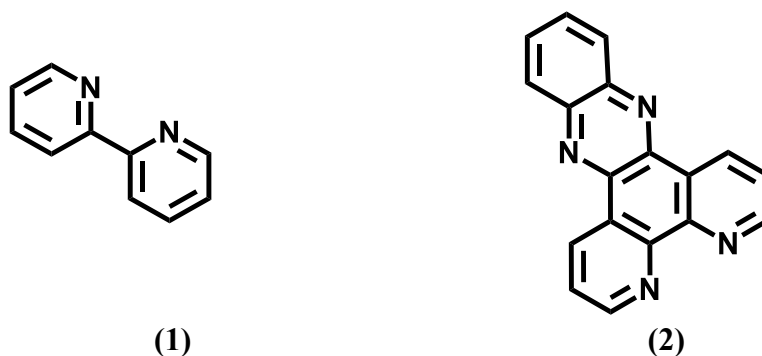
Embora o alvo farmacológico para compostos antitumorais de rutênio não tenha sido identificado, há um grande corpo de evidências indicando que a citotoxicidade de muitos desses complexos se correlaciona com sua capacidade de se ligar ao DNA, embora hajam exceções relatadas na literatura (FANTONI *et al.*, 2021; KUNDU *et al.*, 2021).

Todas essas características estimularam o desenvolvimento de medicamentos à base de metais, despertando inúmeras pesquisas uma vez que apresentam uma variedade de modos de ligações e reatividade devido aos variados números de coordenação, geometrias e cargas (FANTONI *et al.*, 2021; KUNDU *et al.*, 2021). Os ligantes podem ainda conferir múltiplas ações, tais como capacidade de interação com o DNA (DASHDORJ *et al.*, 2013), bem como uso em detecção e interação (MCQUAID *et al.*, 2019) com proteína (LARRAGY *et al.*, 2015), e eventualmente potencial emprego em terapia anticâncer (KUNDU *et al.*, 2021). Além disso, alguns desses sistemas metálicos podem ser utilizados para fotogerar ou fotoliberar bioativos (MARTINS *et al.*, 2023), podendo ser usados em diversas fototerapias, o que tem provocado uma intensa busca no desenvolvimento desses compostos.

1.1 Ligantes Polipiridínicos

No desenvolvimento de novos compostos, os ligantes apresentam grande importância devido à sua característica de potencializar a atividade biológica, influenciando a reatividade química das espécies, bem como tornando-as mais seletivas e eficazes com o reconhecimento de alvos específicos. Uma classe de ligantes que têm sido exaustivamente estudada são os compostos orgânicos heterocíclicos aromáticos contendo nitrogênio, os quais podem atuar como ligantes bidentados em complexos com íons metálicos devido as suas propriedades químicas, eletroquímicas e ópticas (ZEGLIS *et al.*, 2007). Entre esses ligantes nitrogenados pode-se citar, a bipyridina (bpy - 2,2'-bipiridina) e o dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina). Consequentemente, um significativo número de complexos metálicos de rutênio tem sido planejados e sintetizados utilizando a bpy e dppz (GUIN *et al.*, 2022) (CHEN *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2016; MCCONNELL *et al.*, 2013), como exemplo o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (Ru-dppz) (DICKESON *et al.*, 1970) (MCCONNELL *et al.*, 2013).

Figura 2. Ligantes bpy (2,2'-bipiridina) (1) e dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina) (2).



A utilização desses ligantes polidentados permite que esses complexos se tornem ferramentas poderosas para explorar a interação de complexos metálicos com DNA e uma variedade de outras biomoléculas. Diversos desses complexos de rutênio apresentaram alta afinidade de ligação ao DNA e o efeito único de *light-switch*, que funciona como um “interruptor” de luz empregado na detecção do DNA (FRIEDMAN *et al.*, 1990; LI *et al.*, 2016).

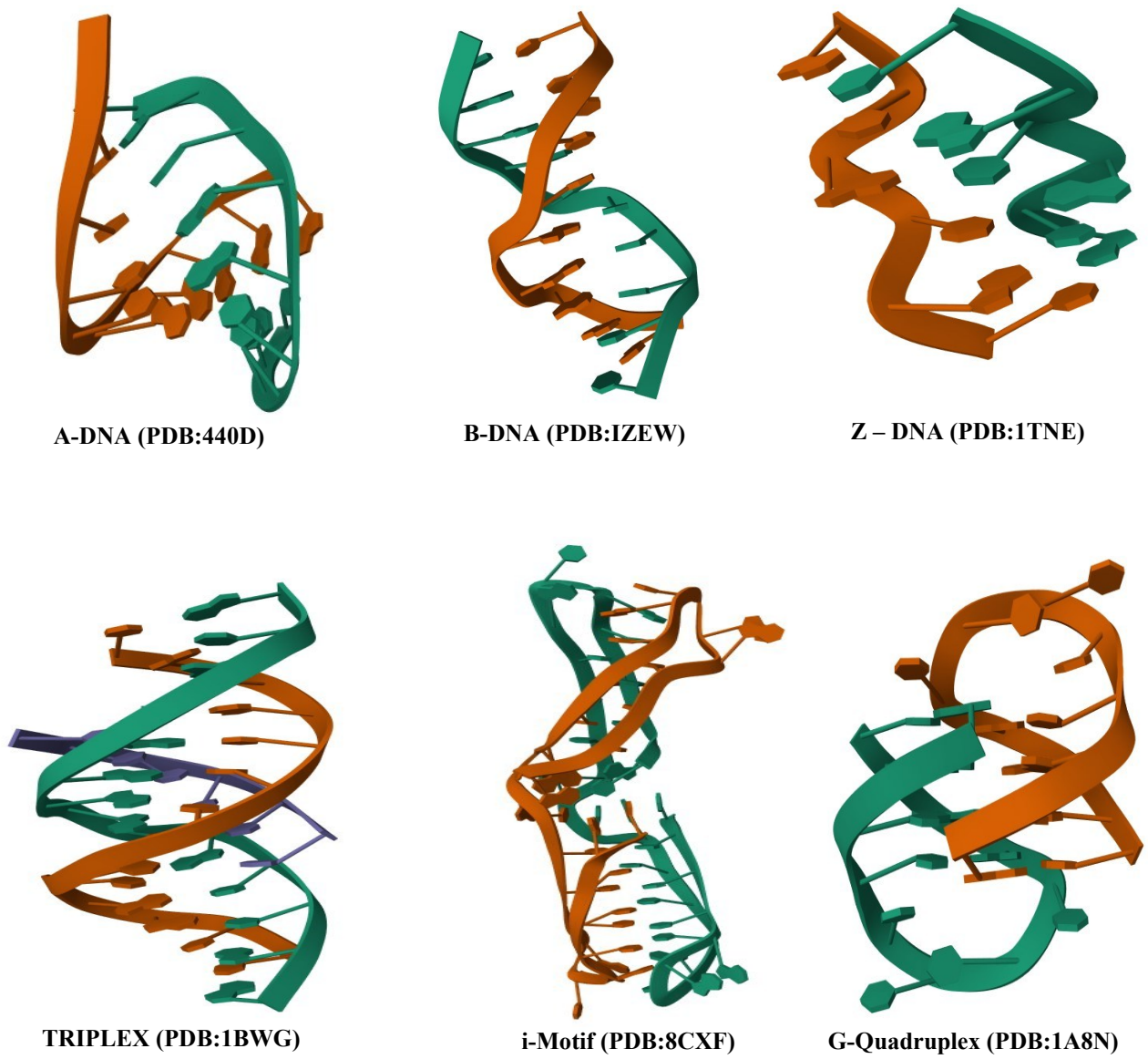
A utilização de ligantes polidentados também pode influenciar na saída de um outro ligante que possuem maior labilidade. Outra vantagem é que esses ligantes polidentados podem

promover a interação ou auxiliar na clivagem do DNA, como é caso dos ligantes bidentado do tipo fenantrolina e dppz, que já são bastante descritos na literatura atuando com complexos metálicos na interação/clivagem do DNA(CHAQO *et al.*, 2019; FRIEDMAN *et al.*, 1990).

Algumas estruturas cristalinas de complexos de Ru com dppz com oligonucleotídeos (pequenas sequências de DNA) revelaram interessantes detalhes da ligação do metal ao DNA em alta resolução. Esses resultados ajudaram a melhor explicar o mecanismo molecular para o efeito de *light-switch* desses complexos(FRIEDMAN *et al.*, 1990). Modificações do sistema de Ru com dppz foram testadas com o objetivo de modular suas propriedades a fim de melhorar a afinidade de ligação ao DNA, promovendo também melhor penetração celular, assim gerando compostos mais eficientes para a eliminação do câncer (LI *et al.*, 2016).

Um interesse particular nesse tipo de sistema concentra-se em sua capacidade de ligação ao DNA, motivando o desenvolvimento de grande variedade de complexos Ru(II) baseados em dppz, os quais foram concebidos como ligantes seletivos para diversas estruturas de DNA, incluindo DNA fita dupla na forma **A**(GAO *et al.*, 1999), **B**(HAYS *et al.*, 2005) e **Z**(SUGIYAMA *et al.*, 1996), **triplex**(ASENSIO *et al.*, 1999), **G-quadruplex**(KETTANI *et al.*, 1998), **i-Motif**(LI, K. S. *et al.*, 2023), bem como DNA defeituoso (ex. abásico, mal pareadas) entre outras (LI *et al.*, 2016) (figura 3).

Figura 3. Ilustração adaptada das formas de DNA tipo A, B, Z, Triplex, i-Motif e G-quadruplex.



As aplicações do sistema de Ru com dppz também tiveram alcance em domínios não relacionados ao DNA. A luminescência desses complexos são observadas quando localizados em ambientes apolares, como vesículas fosfolipídicas(DE LA CADENA *et al.*, 2016), ciclodextrina aniônicas(HIGGS *et al.*, 2016) e cavidades hidrofóbicas em proteínas⁹, servindo esse sistema como sonda molecular.

Baseando-se nas características desses complexos de rutênio e dos ligantes polidentados, buscou-se uma forma de ativação desse composto nos ensaios biológicos que facilitasse a liberação controlada desse complexo, sendo assim foi inserido um ligante bastante descrito na literatura como o ligante óxido nítrico (NO). Um desses sistemas é o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}](\text{PF}_6)$ (SILVA *et al.*, 2006), que apresentou características interessantes para aplicação em fototerapia ao liberar NO após irradiação com luz ultravioleta(UV), mostrando potencialidade em diversos estudos, tais como interação com DNA, atividade vasodilatadora e bactericida, comparados ao complexo precursor que não possuía o ligante NO(MARTINS *et al.*, 2023).

Além da inserção do ligante NO, foi realizada a substituição de um dos ligantes bpy do $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}](\text{PF}_6)$ pelo ligante dppz. Essa modificação foi realizada com a finalidade de potencializar o efeito de interação do complexo nos estudos biológicos, já que esse ligante é conhecido na literatura pelo seu efeito de intercalação ao DNA(LI *et al.*, 2016).

1.2 Aspectos gerais sobre o óxido nítrico

Estudos realizados durante a década de 80 foram capazes de despertar enorme interesse da comunidade científica em relação às propriedades biológicas apresentadas pelo óxido nítrico (NO), passando a ser alvo de estudos intensos. Essa molécula tem a capacidade de se difundir tanto em meios lipofílicos como hidrofílicos, sendo considerada a menor molécula a funcionar como mensageiro secundário capaz de se difundir em processos biológicos.

A molécula de óxido nítrico (NO) é essencial para a sinalização celular e para o metabolismo, mas também contribuem para condições patológicas, particularmente sob condições inflamatórias(THOMAS *et al.*, 2008). Há muito tempo sabe-se que a concentração afeta os efeitos das moléculas nos sistemas biológicos. No caso de biorreguladores de moléculas pequenas, como NO, a situação é mais complexa do que um simples efeito de concentração

porque essas espécies podem ser convertidas em outras moléculas sinalizadoras(SIES *et al.*, 1985).

Além disso, há interações químicas entre agentes de sinalização redox que devem ser considerados. A compreensão dos aspectos de sinalização dessa molécula evoluiu ao longo de várias décadas, baseada no conceito simplificador da biologia química do NO, buscando explicar como uma espécie aparentemente tóxica poderia efetuar diversos processos, como regulação da pressão arterial e controle de patógenos e células cancerosas(MIRANDA *et al.*, 2021; RIDNOUR *et al.*, 2004).

Contudo, sabe-se que concentrações elevadas de óxido nítrico nas células podem reagir com oxigênio molecular ou radicais superóxido presente no ambiente celular favorecendo a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) altamente prejudiciais às macromoléculas, desregulando suas funções biológicas provocando danos nas células e nos tecidos(MIRANDA *et al.*, 2021).

A produção endógena do NO (figura 4) é realizada através da reação de oxidação do aminoácido L-arginina com uso do oxigênio molecular e catalisada por isoenzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS), além da participação do co-substrato NADPH (IGNARRO, 1989; NAPOLI *et al.*, 2006).

Figura 4. Síntese endógena do NO(KNOWLES *et al.*, 1994).

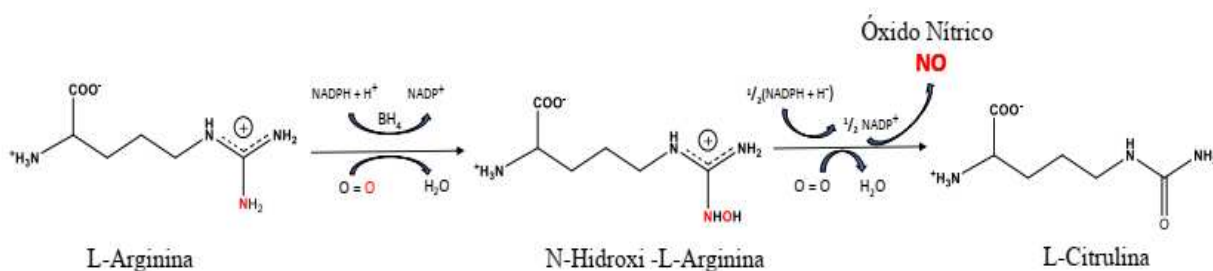


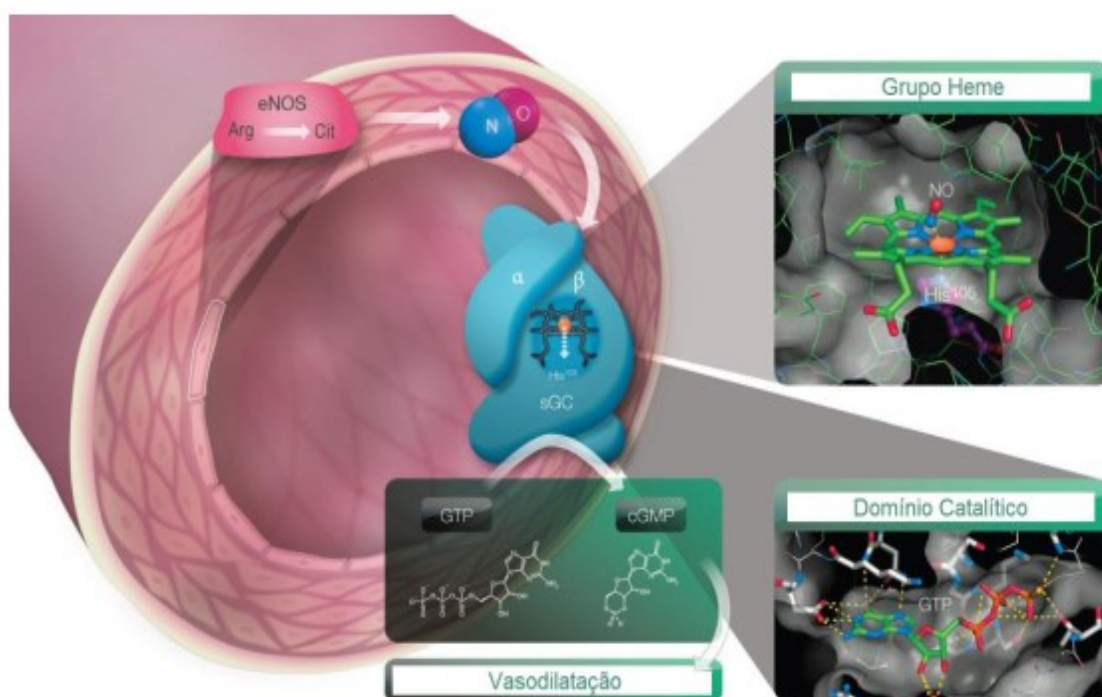
Figura adaptada(KNOWLES *et al.*, 1994).

Essa produção endógena também pode induzir a formação de outra espécie resultante da redução do NO, como a nitroxila ($\text{NO}^\cdot$). Em geral essa molécula é representada como HNO , uma vez que em condições fisiológicas está protonada (pK_a 11.4)(HUGHES, 1999; KEMP-HARPER *et al.*, 2011).

O HNO tem, em vários casos, um comportamento distinto, em suas respostas farmacológicas, ao NO. As propriedades farmacológicas do HNO incluem efeitos protetores contra danos de reperfusão para o tratamento de infarto do miocárdio, a capacidade de melhorar a contração do miocárdio no tratamento de insuficiência cardíaca, inibição da aldeído desidrogenase para o tratamento do alcoolismo e a inibição do crescimento de tumores e da angiogênese no tratamento de câncer (JOHNSON *et al.*, 2013).

A mais estabelecida atuação do NO no organismo ocorre como estimulador da guanilato ciclase solúvel (sGC), uma enzima hêmica com alta afinidade pelo NO. A sGC funciona como importante regulador do sistema cardiovascular presente em células do músculo liso dos vasos sanguíneos e no processo de desagregação de plaquetas. O NO produzido no endotélio difunde-se rapidamente nas células musculares, estimulando a sGC (Figura 5), resultando no aumento intracelular de cGMP (guanosina-3',5'- monofosfato cíclica), um mensageiro celular. Esse último provoca uma variedade de respostas fisiológicas, incluindo a dilatação de vasos (baixando a pressão do sangue) e uma melhora na circulação sanguínea. A patogênese de várias doenças e, particularmente, do sistema cardiovascular, tem sido associada a uma deficiência na estimulação da sGC (FOLLMANN *et al.*, 2013).

Figura 5. Ilustração da produção de cGMP via estimulação da guanilato ciclase solúvel sGC por meio do NO. Copyright © 5270780077910 (FOLLMANN *et al.*, 2013).



O NO também está relacionado à homeostase vascular e a modulação neurológica (influenciando na memória e aprendizagem), além de atuar como um dos principais moduladores cardiovasculares, sendo relacionado à vasodilatação, regeneração endotelial, inibição à atividade plaquetária e de adesão celular endotelial (COUSSEAU, 2012). A deficiência ou altas concentrações podem provocar inúmeros processos patológicos tais como hipertensão vascular, problemas neurodegenerativos, processos inflamatórios e imunológicos, choque séptico, dentre outros (EMAM *et al.*, 2021; IGNARRO, 1989; KNOWLES *et al.*, 1994).

Outro papel relevante do NO no organismo está relacionado a sua atuação em células tumorais, ainda que sua ação permaneça parcialmente compreendida. Enquanto alguns relatos indicam que a presença de NO em células tumorais ou em seu microambiente é prejudicial para a sobrevivência dessas células e, conseqüentemente, sua capacidade metastática, um grande corpo de dados clínicos e experimentais sugerem um papel promotor do NO na progressão tumoral e metástase (LALA *et al.*, 1998). Os impactos desta molécula podem ser aparentemente contraditórios, o que complica o desenvolvimento de tratamentos contra o câncer baseados na modulação dos fluxos de NO nos tumores, o que cada vez mais estão associados a sua resposta dependente da concentração levando a esses vários perfis. Em um nível fundamental, níveis baixos de NO conduzem vias oncogênicas, imunossupressão, metástase e angiogênese, enquanto níveis mais elevados levam à apoptose e à redução da hipóxia sensibilizando os tumores às terapias convencionais (MIRANDA *et al.*, 2021).

1.3 Complexos de Rutênio

A intensa busca por melhoria na atividade de metalofármacos e a grande variedade de ligantes que podem ser usados nesses sistemas são aspectos importantes nesses estudos. Essas características estimulam o desenvolvimento de medicamentos à base de metais despertando inúmeras pesquisas uma vez que apresentam uma variedade de modos de ligações e reatividade devido aos variados números de coordenação, formas e carga. (FANTONI *et al.*, 2021; PRATHIMA *et al.*, 2023)

Dentre esses complexos metálicos o que tem apresentado bastante destaque são os complexos de rutênio por apresentarem menos toxicidade que a cisplatina (DEHNE *et al.*, 2001), capacidade de assumir diversos estados de oxidação (II, III e IV), diferentes números de coordenação e cinética de substituição favoráveis. Outra propriedade desses complexos é promover a forte estabilização do campo ligante e a afinidade a diversos ligantes, além

de apresentar uma grande faixa de potenciais de oxidação e redução (SUSSUCHI, 2005). Sua baixa toxicidade, se deve à similaridade com o ferro, ambos pertencentes ao grupo VIII da tabela periódica, o que favorece em sistemas biológicos. (DE OLIVEIRA NETO *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2020)

A versatilidade apresentada pelos compostos de rutênio e sua capacidade de associação à inúmeros tipos de ligantes, mostrou que esses compostos metálicos são bastante promissores quando associado à molécula de óxido nítrico. A busca continua por complexos metálicos que possam ser utilizados em tratamentos anticâncer, como substituto à cisplatina, estimulou a procura incessante por complexos que apresentem baixa citotoxicidade e que proporcionem menos efeitos colaterais ao organismo, sendo os nitrosilos complexos de rutênio bastante promissores para esses estudos.

Embora haja um número expressivo de estudos sobre nitrosilo compostos, além da importância e essencialidade dos metais para o organismo, ainda há muitos mecanismos a serem desvendados, pois a reatividade do complexo *in vitro* pode apresentar comportamento diferente, em relação aos estudos *in vivo*, devido sua forma de atuação no organismo principalmente quando relacionados aos metais de transição. Sua reatividade depende do balanço entre o metal e os ligantes, e diante de uma matriz complexa como o organismo humano a compreensão da sua reatividade ainda é pouco conhecida.

Há diversos compostos polipiridínicos de rutênio citados na literatura, tais como os complexos do tipo *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO)]ⁿ⁺, sendo L os ligantes imidazol (Imn), sulfito (SO₃²⁻) e isonicotinamida (Isn), entre outros (SILVA *et al.*, 2006). Esses compostos já mostraram que liberam NO após redução induzida eletroquimicamente, no entanto o valor do potencial de meia onda (E_{1/2}) para o processo de redução (NO⁺/NO⁰) é fortemente dependente da natureza do ligante L. O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺ mostrou-se bastante promissor em diversas aplicações biológicas e ensaios com células, tecidos e animais.

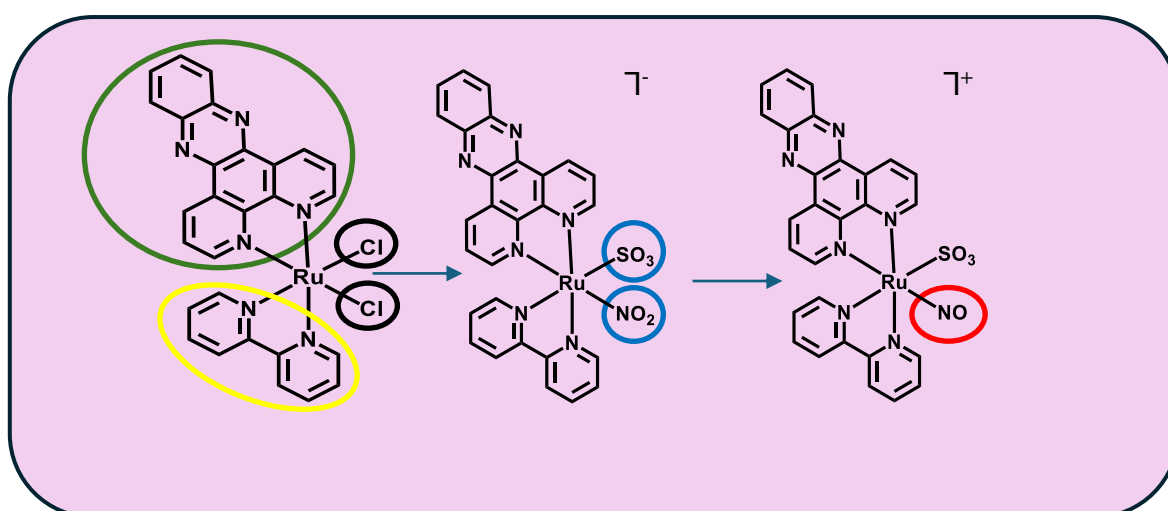
Uma das razões para isso pode estar relacionada a sua elevada estabilidade em pH fisiológico, que se deve a utilização do ligante sulfito (SO₃²⁻) funcionando como modulador de reatividade. Assim ele permite que em pH fisiológico o composto se mantenha na forma de nitrosilo composto. Outra característica é a possibilidade de liberar NO (e/ou HNO) pela reação com redutores biológicos tiólicos (SILVA *et al.*, 2011).

Dessa maneira a busca por possíveis alternativas farmacoterápicas, como desenvolvimento de nitrosilo complexos de rutênio estão despertando o interesse no meio científico com o objetivo de elaborar compostos que sejam capazes de liberar ou sequestrar a

molécula de $\cdot\text{NO}$, sendo o uso de compostos de coordenação uma promissora alternativa (COUSSEAU, 2012; EMAM *et al.*, 2021; LEHNERT *et al.*, 2021; SILVA SOUSA *et al.*, 2016).

Portanto, com a finalidade de preparar novos sistemas metálicos à base de rutênio, com potenciais atividades biológicas, e considerando o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)$, previamente preparado pelo grupo de Bioinorgânica da UFC e que já apresentou diversos e promissores efeitos biológicos, foram preparados três complexos de rutênio (Fig.6), onde realizou-se a substituição de uma bpy pelo ligante fenazínico dppz, dessa forma se poderia conferir potencial seletividade de interação ao DNA e que eventualmente promoveria atividades biocidas.

Figura 6. Estrutura dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02**.



2 OBJETIVO

Este trabalho visa realizar a síntese de novos sistemas metálicos à base de rutênio, com potencial atividade biológica. Dessa forma, realizou-se a síntese de três complexos metálicos contendo dppz: $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ (**PR**); $\text{Na}[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{SO}_3\text{NO}_2]$ (**PR01**) e $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{SO}_3\text{NO}](\text{PF}_6)$ (**PR02**) (figura 6). Além disso, a incorporação de NO, no preparo do composto **PR02**, servirá como uma versão modificada do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)$, agora contendo ligante com seletividade ao DNA, e que também poderia fornecer NO ampliando suas potencialidades.

2.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar complexos de rutênio(II) contendo os ligantes: sulfito, NO_2 e $\text{N}\bar{\text{O}}$, bem como ligantes polipiridínicos conjugados (2,2'-bipiridina e dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazina), investigar suas reatividades, atividade antibacteriana, citotóxicas e vasodilatadoras.
- Sintetizar o precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ (**PR**), e os complexos $\text{Na}[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{SO}_3\text{NO}_2]$ (**PR01**) e $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{SO}_3\text{NO}](\text{PF}_6)$ (**PR02**), sendo bpy = 2,2' bipiridina e dppz = dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazina;
- Caracterizar os complexos preparados utilizando técnicas espectrofotométricas (UV-vis, infravermelho, luminescência), ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H), espectrometria de massas, eletroquímica (voltametria cíclica) e análise elementar.
- Determinar a constante de equilíbrio de interconversão dos ligantes $\text{NO}^+/\text{NO}_2^-$ do complexo **PR02**;
- Monitorar a liberação de NO do complexo **PR02**;
- Realizar estudos de geração de espécies reativas e radical superóxido;
- Investigar a interação dos complexos metálicos com DNA empregando técnicas espectroscópicas (absorção eletrônica, luminescência e dicroísmo circular);
- Estudar a fotorreatividade dos compostos frente ao DNA empregando eletroforese em gel de agarose;
- Determinar a lipofilicidade do complexo (Log P);
- Realizar estudos de vasodilatação;

- Medir a concentração inibitória mínima (MIC) e atividade bactericida (MBC) em bactérias Gram positivas e negativas.
- Realizar ensaio de inibição da formação do biofilme e quantificação de biomassa;
- Avaliar o efeito dos complexos metálicos preparados em combinação com antibióticos em uso clínicos;
- Investigar potencial atividade hemolítica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As sínteses dos ligantes e dos complexos foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) da UFC. A síntese dos ligantes 1,10 – fenantrolina-5,6–diona e dipirido[3,2-a:2',31-c]fenazina (dppz) foi realizada conforme descrito na literatura (DICKESON *et al.*, 1970). As medidas de RMN foram realizadas no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN (UFC). Os ensaios biológicos foram realizados sob colaboração com o Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) (Dr. Prof. Edson Holanda). Os estudos de vasodilatação dos complexos **PR** e **PR02** foram realizados em colaboração com o laboratório de fisiologia e farmacologia cardiovascular e renal (LAFCAR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) (Dr. Prof. Nilberto R. F. Nascimento).

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica e não sofreram qualquer purificação prévia. Segue abaixo a Tabela 1 com sua respectiva procedência e grau de pureza.

Tabela 1. Lista de reagentes com suas respectivas procedências e grau de pureza.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA	PUREZA (%)
RuCl ₃ .xH ₂ O	Precious Metals Online	99
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	Reagan	99
Ácido trifluoroacético (HTFA)	Tédia	-
Cloreto de lítio	Fischer Chemical	98,7
Nitrito de sódio	MP Biomedicals, LLC	USP
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base)	Uniscience	99
Hexafluorofosfato de Amônio (NH ₄ PF ₆)	Aldrich (Chemistry)	95

Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	Synth	99
[Ru(bpy) ₃](PF ₆) ₂	Sigma-Aldrich	98

Fonte: A autora. (-) = Não fornecido pelo fabricante.

Tabela 2. Lista de reagentes especiais com suas respectivas procedências.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA
Agarose LE	Uniscience
D-Manitol	Sigma-Aldrich
L-Histidina	Sigma-Aldrich
Tris(hidroximetil)aminometano (Trisbase)	Uniscience
K ⁺ G-quadruplex	Invitrogen / ThermoFisher Scientific
C-myc	Invitrogen byThermoFisher Scientific
2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5- tetrametilimidazol-1-oxi-3-óxido (cPTIO)	Santa Cruz Biotechnology
Glutationa (GSH)	Sigma - Aldrich
Plasmídeo (pBR322)	New England Biolabs® Inc
Piruvato	Sigma - Aldrich
TIRON (4,5 – Di-hidróxido-1,3- sal dissódico de ácido benzenodissulfônico monohidratado)	Sigma - Aldrich
Superóxido Dismutase (SOD)	Sigma (Life Science)

Fonte: A autora.

3.2 Síntese dos Complexos

3.2.1 Síntese do complexo precursor $[Ru(bpy)(dppz)Cl_2]$ (PR)

Na síntese do complexo precursor, utilizou-se metodologia semelhante ao descrito na literatura para obtenção do complexo $[Ru(bpy)_2Cl_2]$ (LISKA *et al.*, 1988). Para tal, solubilizou-se 92,60 mg (0,354 mmol) de $RuCl_3 \cdot xH_2O$, juntamente com 55,28 mg (0,36 mmol) de 2,2'-bipiridina, 100 mg (0,36 mmol) de dppz, e 120,04 mg (2,8 mmol) de LiCl em 18,00 mL de DMF. Manteve-se a mistura sob agitação por 8 horas, sendo a temperatura controlada para que não ultrapassasse 130° C (Atenção: acima dessa temperatura ocorre degradação da DMF e formação de subprodutos, inclusive CO). Após este tempo, um sólido de cor vinho-avermelhado foi obtido logo após a solução ter sido rotaevaporada até a secura, e ressolubilizada em seguida com a adição de 2 mL de etanol e precipitada pela adição de 20 mL de éter etílico. A mistura foi filtrada em funil de placa porosa, lavada com acetona gelada e seca a vácuo. Rendimento: 70%.

3.2.2 Síntese do complexo $Na[Ru(bpy)(dppz)(SO_3)(NO_2)]$ (PR01)

Misturou-se 100 mg (0,16 mmol) do complexo precursor $[Ru(bpy)(dppz)Cl_2]$ e 20,57 mg (0,16 mmol) de Na_2SO_3 , dissolvidos em 12 mL de uma solução 3:1 (etanol /água), deixando em refluxo e agitação por 2 horas. Em seguida adicionou-se 13,51 mg (0,16 mmol) de $NaNO_2$, ficando sob agitação e refluxo por 4 horas à aproximadamente 70° C. Após esse período o solvente foi removido completamente empregando-se um sistema de rotaevaporação. Em seguida o sólido obtido foi ressolubilizado em 2mL de acetona, e posteriormente adicionado cerca de 10 mL de éter etílico, então essa mistura foi mantida na geladeira. No dia seguinte, o sólido foi lavado com acetona gelada, filtrado e estocado sob vácuo. Rendimento 70 %.

3.2.3 Síntese do complexo $[Ru(bpy)(dppz)(SO_3)(NO)](PF_6)$ (PR02)

Dissolveu-se 150 mg (0,17 mmol) de $Na[Ru(bpy)(dppz)(SO_3)(NO_2)]$ em 9 mL de etanol e 3,0 mL de água (3:1), sob fluxo de argônio, e em seguida adicionou-se 600 µL de ácido trifluoroacético (CF_3COOH) concentrado, deixando reagir por 90 min. Após esse tempo, removeu-se todo o solvente usando um sistema de rotaevaporação, o sólido obtido foi ressolubilizado em 2 mL de etanol, sendo em seguida adicionado 20 mg de NH_4PF_6 ,

previamente solubilizado em 1 mL de água. A fim de favorecer a precipitação, foi adicionado nessa mistura cerca de 10 mL de éter etílico. A mistura foi mantida em geladeira durante a noite, lavado com água gelada, filtrado e o precipitado estocado sob vácuo. Rendimento 76%.

3.3 Equipamentos e Técnicas experimentais

3.3.1 Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV-visível

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível em solução foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Varian, UV-Vis-NIR Cary 5000, o estudo de determinação da constante de equilíbrio de interconversão de $\text{NO}^+/\text{NO}_2^-$ foi feito usando o espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode-Array, acoplado a um banho termostaticado. As amostras foram analisadas em solução empregando-se cubetas de quartzo retangulares de caminho óptico de 1,0 cm.

3.3.2 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

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

3.3.3 Modelagem Molecular – Cálculos quanto-mecânicos

Cálculos computacionais foram realizados no Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho no Ceará (CENAPAD CE) localizado na Universidade Federal do Ceará. Utilizou-se os softwares GaussView 5.0 (DENNINGTON *et al.*, 2009) para geração dos inputs e o Gaussian09 (FRISCH, 2009) para execução os cálculos de toda a teoria funcional de densidade (DFT). A otimização das geometrias dos complexos foi realizada utilizando DFT (densidade funcional), por meio do funcional híbrido B3LYP. (BEEKE, 1993; FRISCH *et al.*, 1988; STEPHENS *et al.*, 1994) O conjunto de bases LANL2DZ (HAY *et al.*, 1985) foi usado para descrição do átomo de rutênio e 6-31G(d) (FRENKING *et al.*, 1986) foi utilizado para os demais átomos (C, H, O, N, S).

Foram realizadas simulações envolvendo a presença de solvente DMSO com o uso do modelo de solvatação polarizada contínua (PCM)(MENNUCCI *et al.*, 1997). Os espectros eletrônicos teóricos foram simulados através de TD-DFT (MARQUES *et al.*, 2012), também utilizando o funcional B3LYP e o conjunto misto de bases citado anteriormente. Determinação dos valores de contribuições percentuais de orbitais bem como análise das transições eletrônicas foram efetuadas empregando os softwares Chemissian 4.23 e GaussSum 3.0.

3.3.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e COSY foram obtidos em um espectrômetro AVANCE DPX 300 Bruker, a 300 MHz, utilizando como solventes deuterados dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio/metanol (3:1).

3.3.5 Espectrometria de massas

Todos os espectros de massas foram adquiridos usando espectrômetro de massas de alta resolução Waters Q-TOF ESI equipado com ionização por *HRESI* (Ionização Eletro Spray de alta resolução) no modo de íon positivo com tensão capilar ajustada para +3,5 kV; a taxa de fluxo do gás de secagem N_2 a 5 L min^{-1} a 300°C e gás nebulizador 30 psi. As amostras foram diluídas em água. A espectrometria de massa de alta resolução foi realizada no equipamento Agilent 6545 ESI-qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e ESI-HRMS/MS no equipamento Agilent 6545 Q-TOF LC/MS (Marconi, Brazil). As análises foram feitas no Departamento de Química da *University of Illinois at Urbana- Champaign, Urbana, USA* e no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brasil.

3.3.6 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas dos complexos metálicos sintetizados foram realizadas utilizando-se um sistema eletroquímico potenciostato/galvanostato BAS Epsilon E2 818 à temperatura ambiente, utilizando uma célula convencional de três eletrodos. As medidas eletroquímicas para os compostos **PR** e **PR01** foram realizadas em solução de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em DMF, utilizando eletrodos de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl, utilizou-se ferroceno como padrão interno, admitindo que o par redox ferroceno

(Fe⁺/Fe⁰) apresenta $E_{1/2} = 0,326 \text{ V vs Ag/AgCl}$ (BALZANI *et al.*, 2001). Enquanto o complexo **PR02** em solução aquosa de NaTFA 0,1 mol L⁻¹ em pH 4,0, os mesmos eletrodos anteriormente descritos como de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

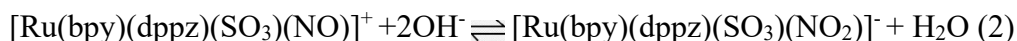
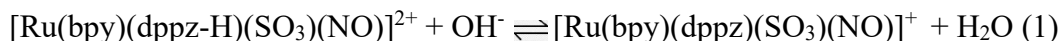
Para os estudos com DNA de salmão e o complexo metálico, realizados através da técnica de eletroquímica, foi utilizado o complexo **PR02** na concentração de 4,0 mmol L⁻¹ e DNA de salmão 1 mmol L⁻¹ (baseado em pares de bases) em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1mol L⁻¹ pH 7,4, cujas interações do DNA e o complexo foram estudadas empregando-se a técnica de voltametria cíclica e DP (pulso diferencial).

3.4 Determinação da constante de equilíbrio de interconversão de NO⁺/NO₂⁻ coordenados

A constante de equilíbrio de interconversão foi determinada através de medidas espectroscópicas na região do UV-vis do complexo metálico seguindo a metodologia descrita na literatura (LOPES *et al.*, 2001). O complexo **PR02** foi preparado na concentração de 40 μmol L⁻¹ e dissolvido em uma solução de HTFA 0,1 mol L⁻¹ e titulado com solução de NaOH. A mudança espectral foi observada em espectrofotômetro enquanto a variação do pH medida no aparelho 827 pH lab Metrohm Ion analysis.

Com a finalidade de medir o pH em que se observa 50% de conversão do NO⁺ a NO₂⁻, foi realizado a adição de NaOH em concentrações de 0,01 mol L⁻¹, 0,05 mol L⁻¹, 1,0 mol L⁻¹ e 3,0 mol L⁻¹ em 100 mL de NaTFA 0,1 mol L⁻¹ (pH inicial 1,33) sendo monitorado esse processo por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. Um gráfico de absorbância (em 430 nm) versus pH foi ajustado à equação tipo sigmoidal, associado à variação espectral, que descreve processos ácido-base dependente, sendo possível obter o valor de pK associado ao equilíbrio químico abaixo:

Determinação da constante de equilíbrio para a reação (equação 1)



A

B

3.5 Estudos de liberação de NO

Os estudos de liberação de NO foram realizados na ausência ou com a irradiação de luz (placa de LED azul, Basetch Conrand, 1,7 W, comprimento de onda máximo $\lambda_{\text{máx}}$: 458 nm), a 27 °C. Outros experimentos foram realizados em solvente aquoso contendo NaTFA 0,1 mmol L⁻¹ em pH 4,0 e com glutathiona reduzida (GSH). A amostra do complexo foi solubilizada previamente em DMSO, entretanto, após diluição em água a concentração desse solvente foi inferior 1%. A liberação de NO foi observada através de monitoramento da mudança espectral por meio de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.

3.6 Investigação de produção de NO por sonda seletiva

O experimento foi realizado a partir da reação do complexo **PR02** com cPTIO empregando-se lâmpada UV ($\lambda_{\text{máx}}$: 350 nm, Ct 06405 da Brantord, USA), empregando-se as concentrações de 190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cPTIO e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo **PR02**, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4. A reação foi monitorada por 80 minutos empregando-se espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. Amostras controle foram também empregadas durante esse experimento a fim de excluir a reação direta entre o complexo e a sonda, bem como foi irradiado somente uma amostra contendo cPTIO na ausência do complexo.

3.7 Estudo de Geração de Radical Superóxido

Esse estudo foi realizado na presença do redutor biológico glutathiona (GSH) na concentração de 1,5 mmol L⁻¹ e cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O experimento foi realizado com o complexo **PR02** nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, monitorado por espectroscopia eletrônica cuja banda de formação de produto (formazan) deve ser observada em 560 nm.

3.8. Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão foram obtidos utilizando-se o espectrofluorímetro estacionário QM-40 (PTI). As amostras foram analisadas usando como solvente etanol e medidas em uma cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 1,0 cm.

3.8.1 Rendimento quântico de emissão

O rendimento quântico de emissão foi realizado usando o espectrofotômetro estacionário QM-40 (PTI), utilizando uma cubeta de quartzo retangular de caminho óptico 1,0 cm. Para determinar o rendimento quântico dos complexos, DPBF e do complexo padrão $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ foi utilizada a equação 2 abaixo para o cálculo do rendimento quântico de emissão (Abreu et al., 2016).

$$\Phi_{em}(amostra) = \frac{I_a}{I_p} \cdot \frac{Abs(padrão)\lambda_{exc}}{Abs(amostra)\lambda_{exc}} \cdot \Phi_{em}(padrão) \quad (2)$$

I_a e I_p são as áreas dos espectros corrigidos de emissão da amostra e do padrão, respectivamente, obtidos nas mesmas condições experimentais, Abs são as absorbâncias das soluções no mesmo comprimento de excitação e Φ_p é o rendimento quântico do padrão. O valor utilizado para o rendimento quântico do padrão $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ foi $\Phi(\text{Etanol}) = 0,84$ (LEE *et al.*, 2009).

3.8.2 Rendimento quântico (geração de $^1\text{O}_2$)

O rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_Δ) foi determinado empregando-se o reagente 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como sonda fluorescente (DING *et al.*, 2006) em espectrofotômetro estacionário QM-40 (PTI). Os espectros foram obtidos nas seguintes condições: $\lambda_{exc} = 410$ nm, varredura = 420 – 540 nm e fendas = 0,3 mm.

O experimento foi realizado com cada complexo **PR**, **PR01** e **PR02**, todos na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo adicionado a essa solução $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DPBF em 1,5 mL de etanol em cubeta de quartzo. A irradiação das amostras foi efetuada com uma placa de LEDs de $\lambda_{m\acute{a}x} = 458$ nm (azul) em intervalos de 10 segundos. Como padrão para geração de oxigênio singlete com luz azul foi utilizado $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. O valor de Φ_Δ para os complexos foi determinado a partir da equação (3):

$$\frac{ka}{kp} = \frac{\Phi_\Delta(amostra)}{\Phi_\Delta(padrão)} \quad (3)$$

Sendo ka e kp os coeficientes angulares das curvas cinéticas $\ln(I / I_0)$ vs tempo de irradiação da amostra e do complexo padrão. I e I_0 são intensidades dos espectros de emissão em vários tempos e zero, respectivamente.

3.9 Estudo de interação e danos ao DNA

3.9.1 Titulação de DNA

A titulação espectrofotométrica com ct-DNA (DNA de timo bovino) foi realizada monitorando-se o espectro eletrônico do complexo na faixa de 200 a 800 nm, a fim de verificar a possível interação do complexo com o DNA. As medidas foram realizadas empregando-se uma concentração constante dos complexos **PR01** e **PR02** de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, com sucessivas adições de CT DNA (estoque de 2,5 mmol L^{-1} em pares de bases) em tampão tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH = 7,4. A análise dos dados da titulação foi realizada a fim de se obter a constante de associação intrínseca (K_b) entre o complexo e o DNA, equação 4 (PYLE *et al.*, 1989). A equação abaixo foi utilizada para o cálculo:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (4)$$

Sendo que, $[\text{DNA}]$ corresponde a concentração de DNA por nucleotídeo, ϵ_f ao coeficiente de extinção molar do complexo na forma livre, ϵ_b ao coeficiente de extinção molar dos complexos ligados ao DNA, ϵ_a ao coeficiente de extinção molar aparente, dado por $\text{Abs}/[\text{complexo}]$ e K_b a constante de ligação ou associação (NAVARRO *et al.*, 2003). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9.2 Eletroforese em gel de agarose

A técnica de eletroforese em gel de agarose foi empregada nos estudos de fotoclivagem de DNA. As soluções dos complexos **PR** e **PR02** (concentrações finais 0 – 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram adicionadas à solução contendo o DNA superenovelado plasmidal pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ baseado em pares de base de nucleotídeos) em tampão tris-HCl, pH = 7,4. Essas amostras foram irradiadas durante 120 min, ou mantidas no escuro pelo mesmo tempo. O padrão de bandas de DNA foi verificado em gel de agarose (0,8 %) com tampão Tris-acetato EDTA – (TAE) pH = 7,4, e corados com GelRedTM e analisado usando o fotodocumentador Gel DocTM XR + System (Biorad).

3.9.3 Estudos de fotólise

O experimento de irradiação foi realizado com placas de LED's (Basetech Conrand, 1.7 W) em diferentes comprimentos de onda: azul ($\lambda_{\text{máx}} = 458 \text{ nm}$), verde ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$) e vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 693 \text{ nm}$) a uma distância de 5 cm dos microtubos transparentes (tipo PCR) contendo as amostras.

3.9.4 Reatividade com Peróxido de Hidrogênio

Com o objetivo de verificar se os complexos apresentariam clivagem de DNA na presença de peróxido de hidrogênio, através da geração espécies reativas de oxigênio, foram incubados os complexos **PR** e **PR02** nas concentrações 5, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo usadas a concentração de 5 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio, como indicado na literatura (METZLER-NOLTE *et al.*, 2009). Foram realizados experimentos nessas condições tanto na ausência de irradiação luz como sob irradiação de luz azul por 120 min.

3.9.5 Supressores de radicais livres

Foram realizados ensaios de clivagem, adicionando uma série de supressores de radicais e espécies reativas de oxigênio (ROSSI *et al.*, 2002), conforme descritos na literatura. Os ensaios foram realizados com adição de 20 mmol L^{-1} de supressores de radicais livres em cada amostra, sendo a concentração dos complexos **PR** 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e complexo **PR02** 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

- Piruvato: provoca desproporcionamento do H_2O_2 e formação do ânion superóxido;
- Histidina: Supressor de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$);
- Manitol: Sequestrador de radicais hidroxila;
- TIRON: Sequestrador de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)
- cPTIO: Reagente seletivo para NO e HNO.

3.10 Dicroísmo Circular

Todas as medidas de dicroísmo circular foram realizadas de 200 a 350 nm em tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4. Os estudos foram realizados com DNA de salmão (350 µM em pares de bases), DNA G-quadruplex HTG (10 µM em pares de base) e DNA G-quadruplex C-myc (10µM em pares de base) foram pré-incubado por 90 min com cada um dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02** em concentrações variadas de complexo (6,25; 12,5; 25 e 50 µM L⁻¹), mantendo-se a concentração inicial de DNA. Esses experimentos foram executados em espectroscópio de dicroísmo circular (modelo Jasco-815), usando uma cubeta de quartzo de comprimento de caminho de 0,1 cm, passo de dados de 1 nm, velocidade de varredura de 100 nm min⁻¹, acumulação de 10 espectros.

3.11 Coeficiente de Partição (logP)

Os valores dos coeficientes de partição (log P) para os complexos **PR**, **PR01** e **PR02** foram determinados pelo método “*shake-flask*”, utilizando-se n-octanol (previamente equilibrado com água) e água. Uma alíquota de 2,5 mL da solução inicial de partição (complexo em água) foi transferida para uma cubeta de quartzo para que seja lida e registrada a absorbância inicial da solução para uso no experimento de partição. Posteriormente, 3 mL da solução de partição (fase aquosa) foi transferida para um tubo de centrífuga sendo então misturada com 3 mL de n-octanol. Em seguida, a solução é submetida a intensa agitação magnética por 2 horas ao abrigo da luz. Após esse período, a solução é transferida para microtubos tipo *eppendorf* e submetidos a centrifugação (5 minutos) para separar totalmente as duas fases.

Posteriormente, uma alíquota de 2,5 mL da fase aquosa é transferida para uma cubeta de quartzo, de caminho óptico de 1 cm, e realizada a leitura da absorbância final. Os procedimentos foram realizados na temperatura de 25°C e o logP foi calculado através da equação 5, sendo [Ru]_{octanol} a concentração do composto em 1-octanol e [Ru]_{água} a concentração do composto na fase aquosa. A concentração do composto na fase orgânica foi obtida de maneira indireta, através da determinação da absorção inicial e final, ou seja, antes e depois da partição do complexo (RAMA *et al.*, 2006). Para a quantificação da concentração em fase aquosa foi realizado curvas de calibração para cada um dos complexos. As medidas foram realizadas em triplicata.

$$\text{Log P} = \text{Log} \left(\frac{[\text{Ru}]_{\text{octanol}}}{[\text{Ru}]_{\text{água}}} \right) \quad (5)$$

3.12 Ensaios Biológicos

3.12.1 Estudo de Vasodilatação

Estudos de vasodilatação dos complexos **PR** e **PR02** foram realizados em colaboração com o laboratório de fisiologia e farmacologia cardiovascular e renal (LAFCAR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) coordenado pelo prof. Dr. Nilberto Nascimento. Nesses ensaios foi utilizado aorta torácica de ratos Wistar machos (200-250 g), sacrificados em uma câmara de CO₂ (CEUA 00829719/2019) foram removidos anéis segmentados de 4 mm. Em seguida foram montados horizontalmente em ganchos de aço inoxidável, e submersos em banho contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit (BAILEY *et al.*, 1978) pré-aquecido à 37°C, em mistura gasosa (5% CO₂, 95% O₂).

Esses anéis aórticos foram conectados a um transdutor de força (TRI202P, Panlab, Barcelona, Espanha) sob tensão de 1 g, e os experimentos foram registrados usando um sistema de aquisição (PowerLab 8/30, AD Instruments). Fenilefrina (PE, 1 µM) foi usado como agente vasoconstritor. No plano de contração foi obtida uma curva de relaxamento dose-resposta em concentrações de 10⁻¹² a 10⁻⁵ mol L⁻¹ dos complexos. A contração do tecido foi avaliada logo após esses experimentos para verificar se o tecido ainda era viável. O EC₅₀ foi calculado por ajuste de regressão não linear com eliminação de valores discrepantes usando a seguinte equação 6:

$$Y = 100 / (1 + 10^{(\log EC_{50} - X)}) \quad (6)$$

O ensaio foi realizado através de 7 medidas independentes preparadas a partir de diferentes animais para obtenção de dados estatisticamente confiáveis.

3.12.2 Atividade antibacteriana

A susceptibilidade das bactérias aos complexos de rutênio citados nesse trabalho foi avaliada pela concentração bactericida mínima (MBC) e a concentração mínima inibitória (MIC) dos complexos. A avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos foi realizada segundo o ensaio de microdiluição seriada em placas de 96 poços. Primeiramente, o complexo foi solubilizado em água destilada estéril e DMSO 8%, permanecendo na concentração final de 125 µg mL⁻¹. Posteriormente, realizou-se uma diluição seriada para obtenção de diferentes concentrações (62,5 – 1,95 µg mL⁻¹) da substância.

Para a determinação da atividade antimicrobiana, o complexo foi submetido ao teste de microdiluição utilizando placas de poliestireno de 96 poços. Cada poço da placa foi preenchido inicialmente com 100 μL do complexo de rutênio em diferentes concentrações. Em seguida, adicionou-se 100 μL da suspensão bacteriana (concentração de 2×10^6 cfu mL^{-1}), obtendo-se um volume final de 200 μL . Essas placas foram submetidas a irradiação com LED azul por 1 hora ou mantidas no escuro, incubadas por 24 horas, a 37 °C com 5% de CO_2 .

A avaliação do crescimento bacteriano foi mensurada através da turbidez dos poços com auxílio do leitor de microplacas (SpectraMax i3), a um comprimento de onda de 620 nm. Para a medição de MBC, foram removidos 10 μL de cada poço onde não apresentaram crescimento microbiano após 24 horas de incubação, seguido de inoculação em placas de petri com meio BHI ágar e posteriormente incubadas sobre as mesmas condições já descritas. Após o período de 24 horas avaliou-se a presença de unidades formadoras de colônias (ufc).

3.12.3 Ensaio sobre a inibição da formação do biofilme e quantificação de biomassa

O ensaio foi realizado baseado na coloração com cristal violeta (CV) em placas de poliestireno de 96 poços de acordo com (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000) com algumas modificações propostas por (VASCONCELOS *et al.*, 2014). A preparação das placas para os testes foi similar ao procedimento usado no ensaio de determinação da CIM.

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada pelo método de coloração com cristal violeta (CV). Após as 24 horas de incubação as placas foram lavadas com água destilada estéril por três vezes para a retirada das células fracamente aderidas. Posteriormente os poços foram preenchidos com 200 μL de metanol a 95% por 5 minutos para fixação dos biofilmes. Adicionou-se, então, 200 μL de cristal de violeta 1 % por mais 5 minutos, a 25 °C. Em seguida, o excesso de corante foi removido e as placas lavadas com água destilada.

O corante remanescente foi removido com ácido acético a 33% e então a biomassa foi quantificada através da medição da densidade óptica a 590 nm (D.O_{590}) com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

3.12.4 Avaliação do efeito combinado dos complexos de rutênio

As avaliações dos efeitos resultantes das associações entre os complexos e alguns antibióticos em uso clínico foram realizadas através da metodologia *checkerboard*, descrita nos

trabalhos realizados por (ROSATO *et al.*, 2007) e (LECHARTIER *et al.*, 2012). O termo *checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com dois agentes antimicrobianos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs para os microrganismos testados. Este método consiste em colunas contendo concentrações diferentes da droga “A” diluídas ao longo do eixo x, e linhas contendo as concentrações da droga “B” ao longo do eixo y (LORIAN, 2005).

Para este estudo, foram avaliadas duas associações diferentes com os complexos **PR** e **PR02** totalizando quatro combinações, a saber: complexo **PR** + Amp (ampicilina), **PR** + Tetra (tetraciclina); **PR02** + Amp e **PR02** + Tetra, sendo que tanto os complexos de rutênio, quanto os antibióticos, foram preparados em concentração 4 vezes a da CIM.

Para cada combinação testada foram usados 5 poços da microplaca de 96 e poliestireno de fundo plano, das linhas A a E, sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa, de A1 a E1 e os complexos de rutênio diluídos no sentido horizontal, de A1 a A5 (tabela 11). No total, 25 poços foram utilizados, de forma que as concentrações finais para cada uma das substâncias usadas foram MIC, $\frac{1}{2}$ da MIC, $\frac{1}{4}$ da MIC, da MIC e $\frac{1}{16}$ da MIC.

Os compostos testados foram diluídos separadamente em placas de microdiluição de fundo em U, e logo em seguida foram misturados em nova placa de 96 poços de fundo plano, de maneira que cada poço dessa nova placa, foi preenchido com 50 μ L do antibiótico, 50 μ L dos complexos de rutênio e 100 μ L do inóculo bacteriano previamente ajustado. A linha F foi usada como controle da CIM dos complexos, e a coluna 6 como controle da CIM dos antibióticos, sendo que as placas foram irradiadas por luz de led azul por 60 min.

Logo após a montagem das placas, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas e para a determinação da nova CIM em combinação, a D.O foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nanômetros em leitor de microplacas (Spectramax).

A interpretação dos resultados foi realizada através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que consiste na soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) de cada composto usado na associação, conforme equação 7:

$$\text{ICIF} = \text{CIFA} + \text{CIFB}, \text{ onde:}$$

CIFA = [CIM do complexo na associação / CIM do complexo individual];

CIFB = [CIM do antibiótico na associação / CIM do antibiótico individual].

De acordo com os valores obtidos, foi calculado Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) para cada combinação a fim de avaliar a interação entre as drogas. Sendo

assim, a interação foi considerada sinérgica ($ICIF \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônica ($ICIF > 4$) (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2013; (ODDS, 2003).

3.12.5 Atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado conforme descrito por (MALAGOLI, 2007) com modificações. Resumidamente, amostras de sangue humano recém coletadas (O+) foram misturadas com uma solução anticoagulante de heparina 20UI. Para obter uma suspensão pura de hemácias, as amostras de sangue foram lavadas seis vezes com NaCl 9% estéril. Em microplacas de 96 poços de fundo em ‘U’, os complexos **PR**, **PR01** e **PR02** foram diluídos em concentrações seriadas (250 a $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Depois de adicionar a suspensão de glóbulos vermelhos a 3%, as placas foram incubadas a 25°C durante 60 min no escuro ou irradiadas por luz de LED azul. Um controle positivo para hemólise (SDS 1%) e controles negativos de NaCl 9% e DMSO 4% foram usados. Após a incubação, os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa e a densidade óptica de cada poço foi medida a 450 nm (DO 450). Os níveis hemolíticos foram expressos como a porcentagem de hemólise calculada de acordo com a equação 8:

$$\text{Porcentagem hemólise} = \left(\frac{DO_{450} \text{ da amostra tratada} - DO_{450} \text{ do NaCl } 9\%}{DO_{450} \text{ do SDS } 1\% - DO_{450} \text{ do NaCl } 9\%} \right) \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados três complexos de rutênio(II). As caracterizações desses complexos consistem no emprego de diversas técnicas espectroscópicas, eletroquímica, espectrometria de massas, análise elementar e RMN ^1H , a fim de garantir a formulação proposta e sua pureza. Além disso, uma série de experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o comportamento desses complexos em relação a sua atividade biológica e reatividade química e fotoquímica.

4.1 Caracterização dos complexos de rutênio

4.1.1 Análise Elementar

Com a finalidade de determinar a formulação dos complexos finais sintetizados, foi realizada a análise elementar do carbono, nitrogênio e hidrogênio para os dois complexos sintetizados, cujos resultados estão apresentados na tabela 3, sendo os valores em parênteses os resultados teóricos.

Tabela 3. Análise elementar de C, N e H para os complexos **PR01** e **PR02**.

COMPLEXOS	EXPERIMENTAL (TEÓRICO)		
	C%	H%	N%
PR 01 ($\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{NaO}_5\text{RuS}$)	48,84 (48,74)	2,43 (2,43)	14,24 (14,16)
PR 02 ($\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_4\text{PRuS}$)	42,32 (42,39)	2,28 (2,35)	12,34 (12,17)

Fonte: A autora.

Os dados obtidos experimentalmente foram consistentes com os valores esperados para os dois complexos analisados, **PR01** e **PR02**, cujos erros encontram-se dentro de uma faixa aceitável e consistente com a pureza dos compostos.

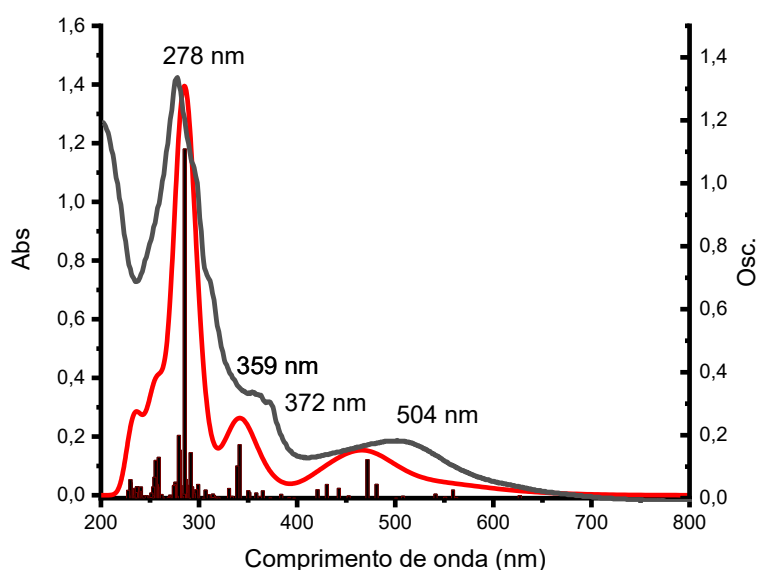
4.1.2 Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis

Os espectros eletrônicos dos complexos **PR** (LISKA *et al.*, 1988), **PR01** e **PR02** (apêndice A - a, b, c), respectivamente, foram obtidos em solução utilizando como solvente DMSO.

O espectro eletrônico do complexo **PR** (figura 7) apresentou banda com máximo em 504 nm, que são descritas como transições de transferência de carga do metal para o ligante (tipo *MLCT*) oriunda dos orbitais $d\pi$ (Ru^{II}) para os orbitais $p\pi^*$ do ligante correspondente ao dppz (LISKA *et al.*, 1988). A banda intensa na região de 279 nm corresponde a transição intraligante ($p\pi^* \leftarrow p\pi$) do ligante dppz. A banda de absorção surgindo aproximadamente na região de 365 nm deve se referir às transições intraligante ($p\pi^* \leftarrow p\pi$) do ligante dppz de acordo com a literatura (CHEN *et al.*, 2011).

Com a finalidade de validar as atribuições propostas anteriormente foram realizados estudos computacionais empregando-se a teoria do funcional de densidade dependente do tempo (TD - DFT). Os resultados obtidos através dos estudos teóricos reforçaram os dados experimentais, sendo as bandas de transição eletrônica na faixa de baixa energia, entre 400 – 600 nm, atribuídas às transições do tipo *MLCT* (transição de carga metal para ligante) envolvendo a bpy e dppz. Adicionalmente, as transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (IL – intraligante e LLCT – ligante para ligante via transferência de carga) referentes aos ligantes aromáticos surgem na faixa de 261 – 293 nm.

Figura 7. Espectro eletrônico experimental (—) e teórico (—) na região do UV-Vis do complexo **PR** em DMSO na concentração $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.



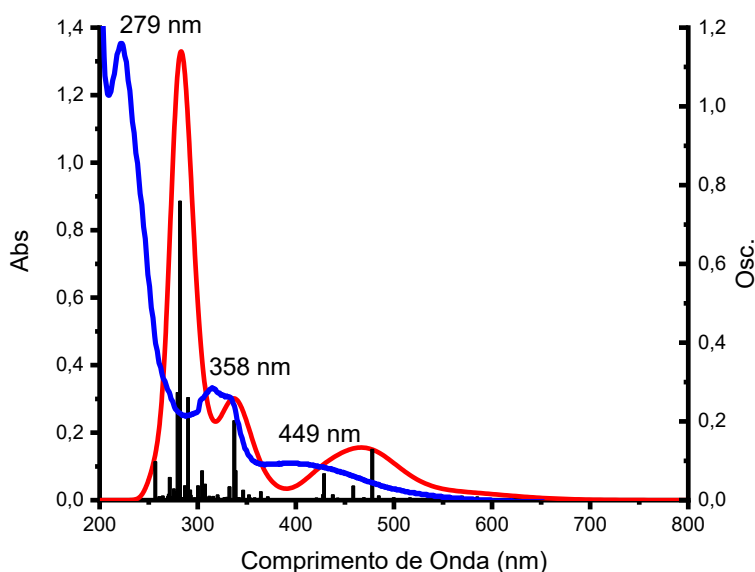
Fonte: A autora.

As transições eletrônicas do tipo MLCT, indicadas na tabela 4, são atribuídas predominantemente à transferência de carga de orbitais do metal rutênio (HOMO, HOMO-1 e HOMO-4) para os orbitais dos ligantes bipyridina e dppz (LUMO, LUMO +1, LUMO +2 e LUMO +3).

O espectro eletrônico do complexo **PR01** (figura 8) apresentou banda com máximo na região de 450 nm. Essa banda surge devido ao ligante NO_2^- provocar maior desdobramento dos níveis energéticos causando um deslocamento das bandas para região de maior energia. Os espectros eletrônicos na região do UV-Vis de nitrosilo complexos polipiridínicos de rutênio são caracterizados por bandas em regiões de menor energia (RONCAROLI *et al.*, 2002) e pode ser atribuída à transferência de carga metal-ligante (MLCT) oriunda dos orbitais $d\pi$ (Ru^{II}) para os orbitais π^* dos ligantes bipyridínicos (LISKA *et al.*, 1988), os quais são relativamente afetadas pela natureza do ligante nitrito (CHEVALIER *et al.*, 1991).

A absorção eletrônica em regiões que apresentam transições intraligantes ($\pi\pi^* \leftarrow \pi\pi$) do ligante dppz está aproximadamente localizada na região de 365 e 376 nm (CHEN *et al.*, 2011). A banda intensa na região de 278 nm corresponde, majoritariamente, a transição intraligante ($\pi\pi^* \leftarrow \pi\pi$) dos ligantes bipyridínicos, semelhante a outros complexos reportados na literatura (LECHNER *et al.*, 2021) (PYLE *et al.*, 1989).

Figura 8. Espectro eletrônico experimental (—) e teórico (—) na região do UV-vis do complexo **PR01** em DMSO na concentração $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

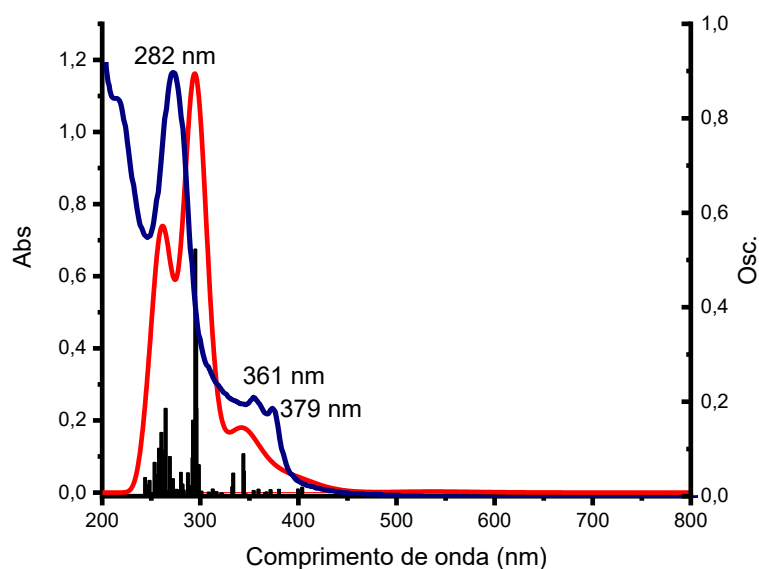


Fonte: A autora.

O espectro eletrônico do complexo **PR02** (figura 9) apresentou a banda na região de 450 nm, fortemente deslocada devido a ação do ligante NO^+ , que provocou o maior desdobramento dos níveis eletrônicos levando a transição para região de maior comprimento de onda. Pode-se atribuir essa variação pelo fato do ligante nitrosil (NO^+) ter um caráter π -receptor bem mais forte do que o ligante NO_2^- , resultando em alterações energéticas nos orbitais moleculares envolvidos nesta transição do metal para os ligantes dppz e bpy (BIGNOZZI *et al.*, 1993; RONCAROLI *et al.*, 2002).

A absorção eletrônica em regiões referentes às transições intraligantes ($p\pi^* \leftarrow p\pi$) do ligante dppz foi observada aproximadamente com máximo em 365 nm (CHEN *et al.*, 2011), como previamente discutido. De forma similar aos complexos anteriores, a banda intensa na região de 282 nm corresponde, majoritariamente, a transição intraligante ($p\pi^* \leftarrow p\pi$) dos ligantes bipyridínicos.

Figura 9. Espectro eletrônico experimental (—) e teórico (—) na região do UV-vis do complexo **PR02** em DMSO na concentração $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Nos complexos **PR01** e **PR02** em que ocorreram trocas dos íons cloretos pelo ligante sulfito, nitrito ou óxido nítrico foram observadas alterações das energias de transição eletrônicas do tipo *MLCT* ($p\pi^* \leftarrow d\pi$), com deslocamento das bandas nessa região, na sequência dos ligantes apresentados. Os espectros eletrônicos teóricos e experimentais

apresentaram para todos os complexos uma satisfatória concordância. Dessa forma foi possível realizar a interpretação das propriedades espectroscópicas dos complexos e validar as atribuições propostas (Tabela 4).

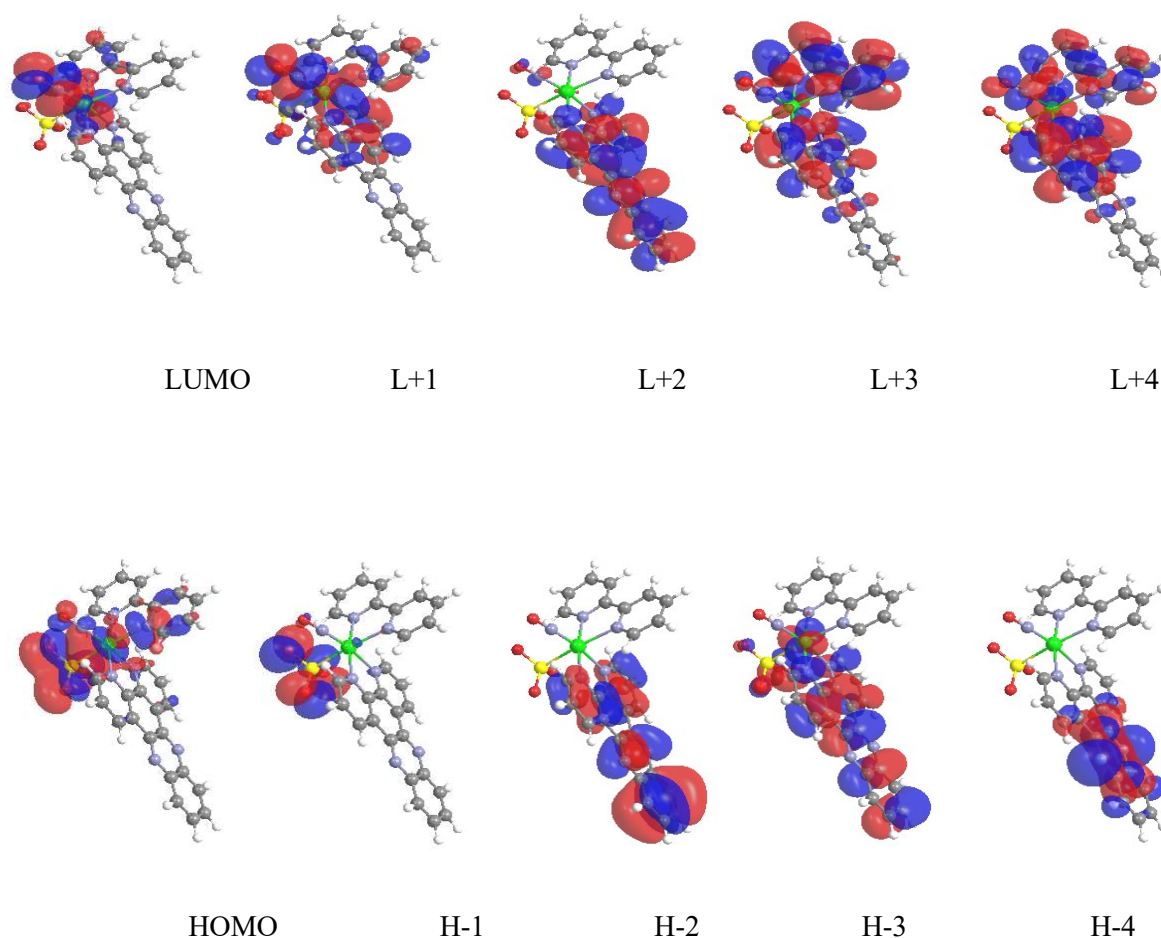
Tabela 4. Transições eletrônicas calculadas de estado singlete para os complexos **PR**, **PR01** e **PR02**.

COMPLEXOS						
	Exp. λ (nm)	Calc. λ (nm)	f	ϵ (mol.L ⁻¹ .cm ⁻¹)	Maior contribuição	Caráter dominante
PR	278	285	0,0041	3,20 x 10 ⁴	H-5 $\rightarrow$ L+4 (12%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$
					H-4 $\rightarrow$ L+8 (14%)	$\pi(\text{Cl}^-) \rightarrow \text{d}\pi(\text{Ru})$
					H-3 $\rightarrow$ L+6 (14%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
	359	343	0,0022	1,00 x 10 ⁴	H-6 $\rightarrow$ L+1 (48%)	$\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-6 $\rightarrow$ L+2 (35%)	$\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$
	372	468	0,0012	9,29 x 10 ³	H-3 $\rightarrow$ L+2 (19%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$
					H-2 $\rightarrow$ L+2 (71%)	$\text{d}\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$
	504	551	0,0008	4,79 x 10 ³	H-4 $\rightarrow$ LUMO(17%)	$\pi(\text{Cl}^-) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-3 $\rightarrow$ LUMO(44%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
PR01	279	283	0,0069	2,57 x 10 ⁴	HOMO $\rightarrow$ L+1(23%)	$\text{d}\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-4 $\rightarrow$ L+7 (23%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
	358	336	0,0752	6,92 x 10 ³	H-7 $\rightarrow$ L+1 (53%)	$\pi(\text{SO}_3^{2-}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-6 $\rightarrow$ L+1 (8%)	$\pi(\text{SO}_3^{2-}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
	449	468	0,0062	3,64 x 10 ³	H-4 $\rightarrow$ L+1 (22%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-3 $\rightarrow$ L+1 (31%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-2 $\rightarrow$ L+1 (20%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
	282	261	0,1351	1,60 x 10 ⁵	H-9 $\rightarrow$ L+4 (33%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-9 $\rightarrow$ L+3 (8%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$
PR02	361	293	0,1608	4,24 x 10 ⁴	H-7 $\rightarrow$ L+2 (11%)	$\pi(\text{SO}_3^{2-}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-5 $\rightarrow$ L+3 (40%)	$\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$
					H-5 $\rightarrow$ L+4 (11%)	$\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
	379	343	0,0897	3,42 x 10 ⁴	H-3 $\rightarrow$ L+2 (46%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					H-2 $\rightarrow$ L+4 (12%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					HOMO $\rightarrow$ L+6(18%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
	379	343	0,0897	3,42 x 10 ⁴	H-2 $\rightarrow$ L+4 (12%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$
					HOMO $\rightarrow$ L+6(18%)	$\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$

Fonte: A autora.

Através dos cálculos das superfícies de contorno dos orbitais foi possível calcular a distribuição espacial dos orbitais moleculares de fronteira do complexo, seguem as representações abaixo para o complexo **PR02**. Os complexos **PR** e **PR01** tiveram suas superfícies de contorno dos orbitais moleculares adicionadas nos apêndices B, C, D, E.

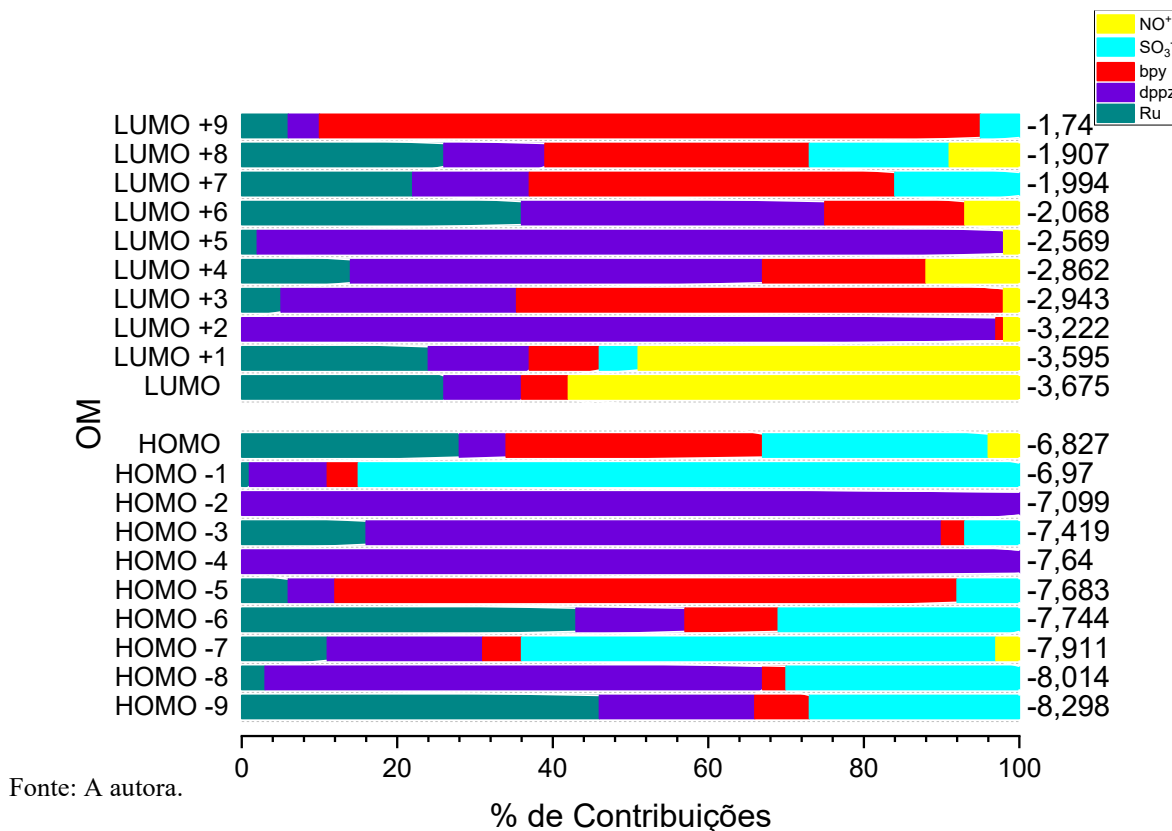
Figura 10. Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo **PR02** calculados por TD – DFT.



De acordo com os dados obtidos através dos cálculos de TD-DFT foi possível observar que o orbital HOMO possui contribuição do metal rutênio no complexo **PR02**, assim como dos ligantes bpy e sulfito. Já os orbitais LUMO e LUMO+1 apresentaram a contribuição majoritária do ligante NO^+ e moderada do rutênio, enquanto o LUMO +2 possuem contribuição majoritária do dppz (figura 10). Essa contribuição do ligante NO^+ , possivelmente ocorreu devido ao aumento da doação do tipo σ para o orbital Ru $d_{x^2-y^2}$ e a retrodoação do tipo π dos orbitais Ru d_{xz} , d_{yz} nessa ordem, causando a diminuição da densidade eletrônica ao longo do

eixo Ru-NO, resultando no aumento dos valores de ΔE (Energia dos produtos – Energia dos reagentes) (KANEKO *et al.*, 2019).

Figura 11. Contribuições dos orbitais moleculares da espécie **PR02** em função de seus fragmentos: Ru (—), bpy (—), dppz (—), SO_3^{2-} (—) e NO^+ (—).

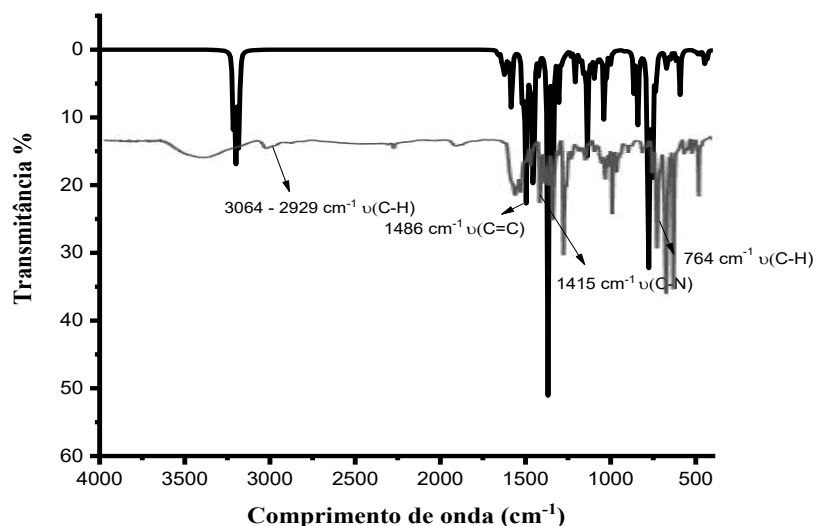


O orbital LUMO (figura 11) do nitrosilo complexo **PR02** apresenta uma grande contribuição do orbital π^* do NO, e uma parcela menor de contribuição do centro metálico. A ligação do NO em nitrosilo complexos do tipo MX_5NO é estabilizada através da interação π -back-bonding envolvendo os orbitais π^* do NO e orbitais “ $d\pi$ ” do metal. Esta interação é responsável por determinar a carga sobre o NO e as distâncias interatômicas na porção M-NO (CARVALHO, 2015; RONCAROLI *et al.*, 2002), dessa forma o efeito π -back-bonding entre o Ru e o ligante NO^+ também é afetado com a formação da ligação.

4.1.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

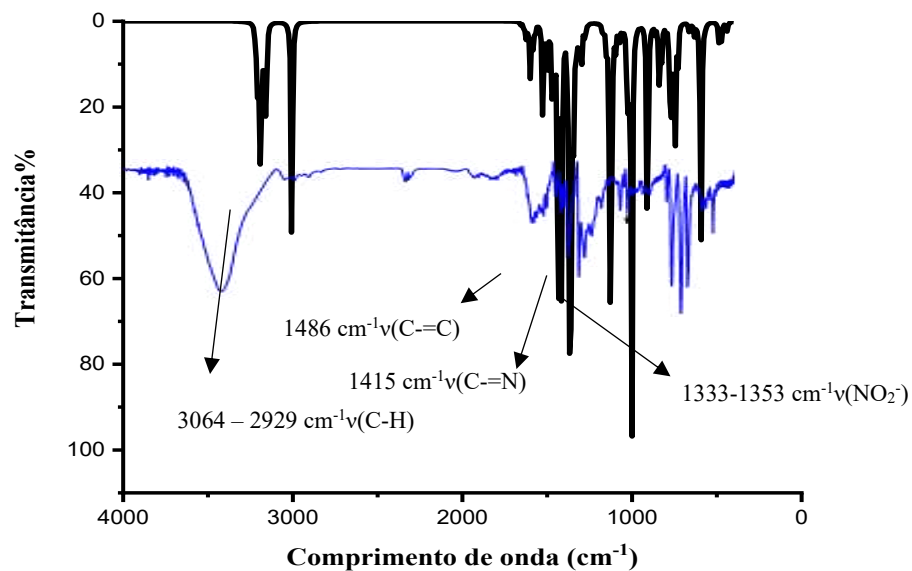
Os espectros vibracionais na região do infravermelho para os complexos **PR**, **PR01** e **PR02**, obtidos em pastilha de KBr, são apresentados nas figuras 12-14. Concomitantemente, foi incluído o espectro vibracional teórico desses complexos, cujos valores encontrados estão em satisfatória concordância com os valores obtidos experimentalmente, considerando que os estudos teóricos são referentes ao espectro no vácuo. As atribuições dos modos vibracionais foram realizadas comparando-os com os resultados da literatura para complexos similares e que apresentam os mesmos ligantes, e encontram-se descritos na tabela 5.

Figura 12. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo **PR**, teórico (—) e experimental (—).



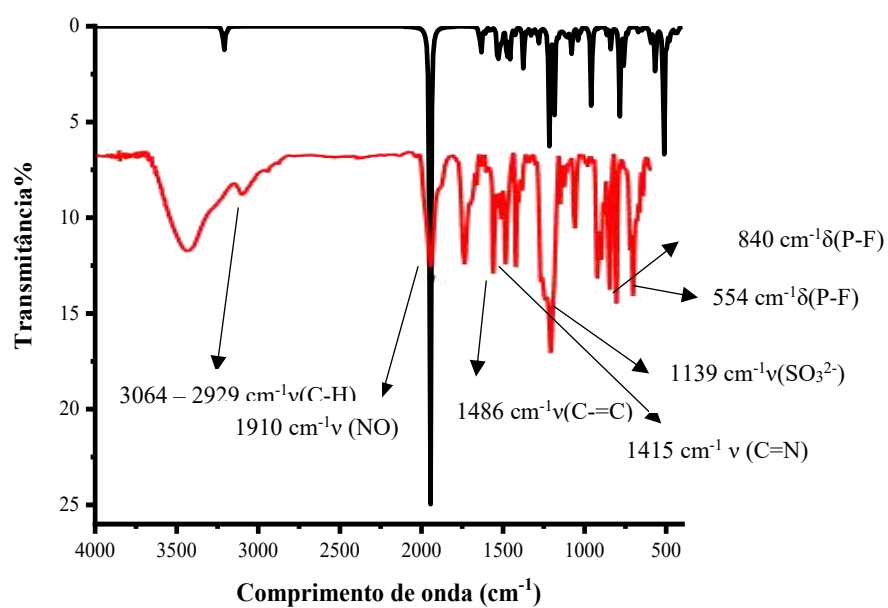
Fonte: A autora.

Figura 13. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo **PR01**, teórico (—) e experimental (—).



Fonte: A autora.

Figura 14. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo **PR02**, teórico (—) e experimental (—).



Fonte: A autora.

Tabela 5. Principais bandas vibracionais na região do infravermelho apresentadas pelos complexos de rutênio sintetizados, obtidas em KBr.

BANDAS VIBRACIONAIS, $\bar{\nu}$ (CM ⁻¹)			
PR	PR01	PR02	Atribuições
3064 – 2924	3064 - 2924	3064 - 2924	ν (C-H)
764	1486	----	ν (C-H)
1486	----	1486	ν (C=C)
1415	1415	1415	ν (C=N)
----	1333 - 1353	----	ν (NO ₂ ⁻)
----	----	1910	ν (NO)
----	----	840	ν (P-F)
----	----	514	δ (P-F)
----	1139	1139	ν (SO ₃ ²⁻)

Fonte: A autora.

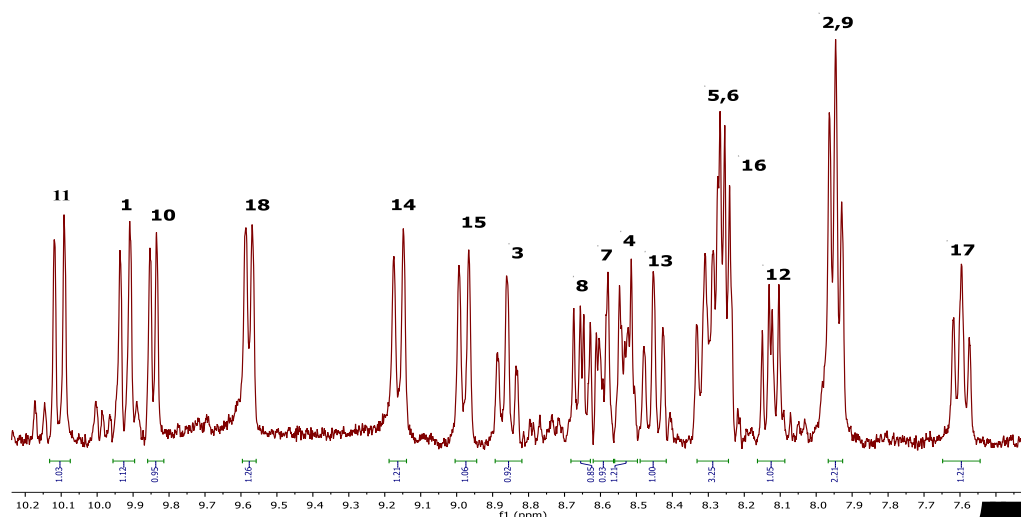
Observa-se no espectro vibracional do composto **PR01** (figura 13) a presença de duas bandas em 1333 e 1353 cm⁻¹ atribuída aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo NO₂⁻, mostrou que este ligante também faz parte da esfera de coordenação. Este resultado mostra que a coordenação deste ligante se dar via átomo de nitrogênio, visto que a diferença entre o estiramento assimétrico e simétrico está abaixo de 100 cm⁻¹. De acordo com dados da literatura (SILVA, 2004), quando se obtém uma diferença mínima entre os dois modos vibracionais a coordenação deste ligante se dar pelo nitrogênio. O espectro do composto **PR02** (figura 14) a presença de uma banda em 1910 cm⁻¹ atribuída ao modo de alongamento do ligante nitrosilo coordenado na forma linear (NO⁺) (SILVA *et al.*, 2011). Uma característica relevante para esse complexo é que a presença do ligante sulfito promove uma redução na frequência de estiramento do NO, devido à fraca acidez π do ligante sulfito, cuja densidade eletrônica nos orbitais $d\pi$ é transferida para o orbital π^* (NO) (SILVA *et al.*, 2006).

Esse valor corrobora com complexos análogos citados na literatura contendo ligantes auxiliares bipyridínicos e fenantrolínicos, cujo valor da banda se apresenta na região de 1942 cm⁻¹ para ambos (PAZ, 2019; SILVA, C. D. *et al.*, 2018). Portanto, a presença do ligante dppz promoveu uma redução bem mais significativa no estiramento do grupo nitrosil que os ligantes bpy e phen.

4.1.4 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro monodimensional de RMN de hidrogênio para o complexo **PR02**, obtido em clorofórmio/metanol (3:1) deuterados, está ilustrado na figura 15. Os espectros de RMN ^1H e COSY para os complexos **PR** e **PR01** encontram-se nos apêndices G, H, I, J, enquanto o COSY do complexo **PR02** no apêndice K. As atribuições dos sinais de hidrogênios observados foram realizadas conforme dados obtidos na literatura para sistemas similares, bem como com o auxílio do espectro COSY (ABREU *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020; SILVA, 2004).

Figura 15. Espectro de Ressonância Magnética de ^1H para o complexo **PR02** em clorofórmio/metanol (3:1) deuterados, obtido na frequência de 300MHz.



Fonte: A autora

Os valores de integração e deslocamento químico dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **PR**, **PR01** (apêndices G e I) e **PR02** (figura 15) foram consistentes com as formulações propostas. Para o complexo **PR02** observou-se integração para 18 hidrogênios, os quais correspondem aos hidrogênios encontrados nos ligantes bpy e dppz, discriminados na tabela 6. Para realizar as atribuições desses sinais, bem como dos outros complexos, foi utilizado também o RMN bidimensional COSY (apêndices H, J e K).

Além dessa análise, utilizou-se também de um estudo comparativo com os ligantes livres bpy e dppz, seus perfis de desdobramentos e integrações (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SILVA, 2004). Nesse estudo foi possível observar o deslocamento de alguns picos ao longo do

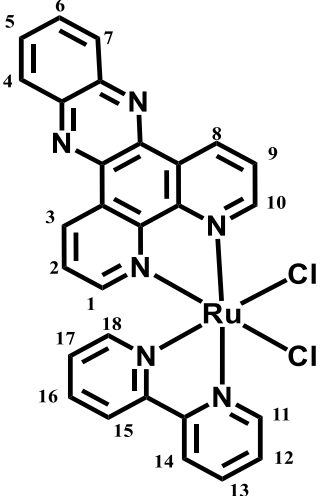
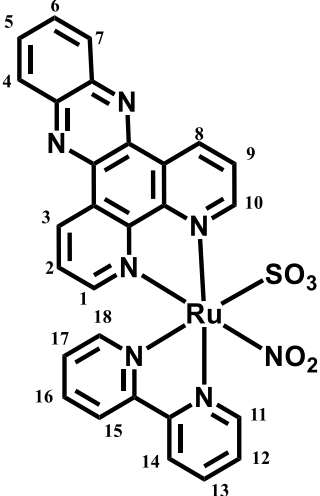
espectro para regiões mais desprotegidas, isso devido ao forte caráter π -receptor de ligante NO^+ , espera-se que os hidrogênios em posição *trans* a este ligante estejam mais desprotegidos.

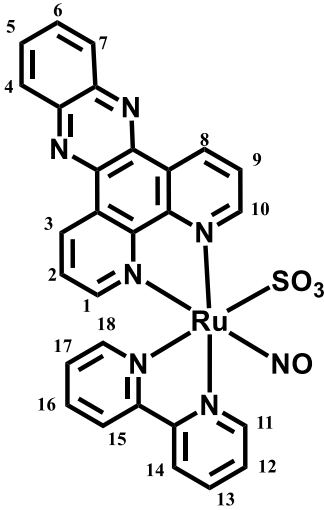
O efeito de desproteção destes hidrogênios causado pelo grupo nitrosil é levado em consideração a natureza π -receptora forte deste grupo, devido ocorrer uma interação π *back-bonding* do rutênio com o NO^+ , retirando a densidade eletrônica do metal e diminuindo a retrodoação para a bpy e o dppz, deixando os hidrogênios destes ligantes desprotegidos. Estas atribuições estão de acordo com resultados obtidos para compostos análogos publicados na literatura (JÚNIOR *et al.*, 2023; SÁ *et al.*, 2015).

Para os complexos **PR**, **PR01** e **PR02**, o hidrogênio mais desprotegido se trata do H-11, que corresponde ao hidrogênio bipyridínico que fica mais próximo aos ligantes monodentados, cloreto (10,24 ppm), NO_2^- (10,61 ppm) e NO (10,10 ppm), respectivamente, enquanto o hidrogênio mais protegido se refere ao H-17 no **PR** (6,94 ppm), **PR01** (7,36 ppm) e **PR02** (7,6 ppm). Os complexos metálicos possuem deslocamento químico com valores próximos aos valores sugeridos, sendo o deslocamento químico influenciado tanto pelos ligantes monodentados, como também forte influência provocada pelos ligantes bpy e dppz. O espectro bidimensional COSY (Anexo D, F e G) auxiliou na atribuição dos sinais em conjunto com as integrações. Nesse espectro bidimensional foi visto o acoplamento dos hidrogênios do ligante dppz (Tabela 6) que apresentaram deslocamento químico em todos os complexos em relação aos ligantes livre.

Os hidrogênios H-1 até H-10 (tabela 6) correspondem ao ligante dppz, que apresentaram deslocamentos químicos para regiões mais desprotegidas, quando comparado ao ligante livre. O mesmo comportamento foi observado para os hidrogênios bipyridínicos que correspondem a numeração H-11 até H-18. Assim, para os complexos metálicos, observou-se comportamento similar de deslocamento químico, confirmado pela análise do espectro COSY, aos observados em complexos similares descritos na literatura, devido ao efeito promovido pela presença de ligantes com comportamento π -receptor (SÁ *et al.*, 2015).

Tabela 6. Deslocamento químico de RMN ^1H e atribuições para os complexos **PR**, **PR01** e **PR02**.

COMPLEXOS		
PR	δ (ppm)	Hidrogênio
	9,71	1, 10
	8,23	2
	8,40	3, 8
	8,32	4, 7
	7,96	5, 6
	8,03	9
	10,24	11
	7,43	12
	7,54	13
	9,45	14
	8,12	15
	7,69	16
	6,94	17
	9,88	18
PR01	δ (ppm)	Hidrogênio
	10,20	10
	8,66	9
	9,14	8
	8,75	4, 7
	8,06	5, 6
	8,99	3
	8,59	2
	9,94	1
	10,29	18
	7,36	17
	8,87	16
	9,61	15
	9,68	14
	8,46	13

	8,39	12
	10,61	11
PR02	δ (ppm)	Hidrogênio
	9,92	1
	7,92 – 7,97	2, 9
	8,86	3
	8,5 – 8,55	4
	8,26 – 8,34	5, 6
	8,57 – 8,62	7
	8,63 – 8,67	8
	9,85	10
	10,10	11
	7,6	12
	8,45	13
	9,16	14
	8,98	15
	8,23 – 8,26	16
	8,09 – 8,16	17
	9,58	18

Fonte: A autora.

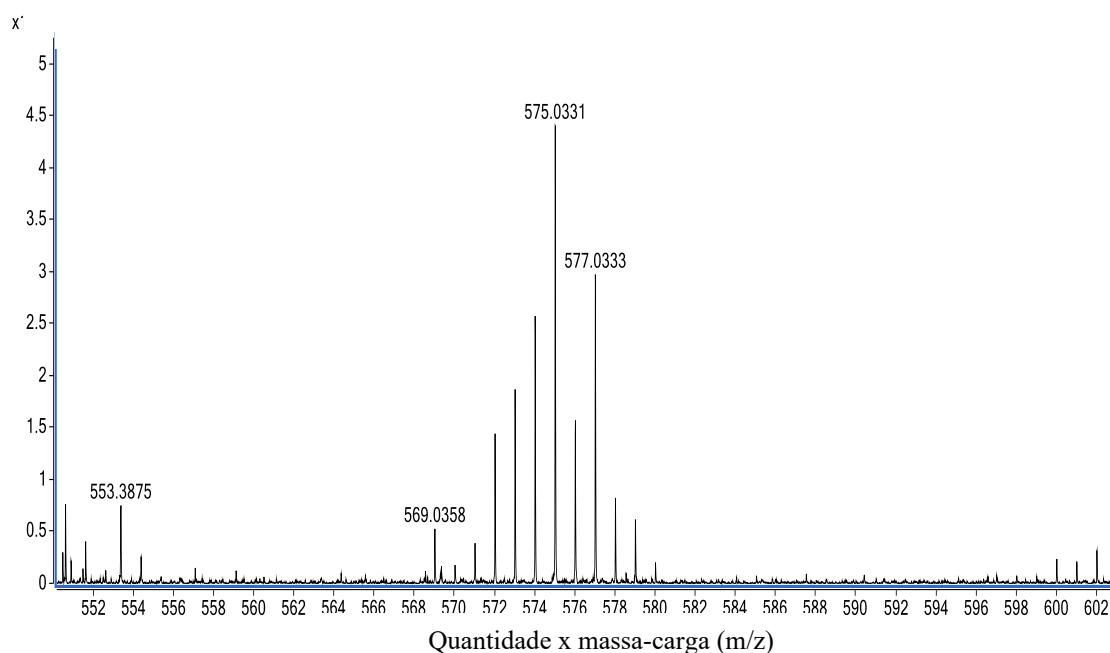
4.1.5 Espectrometria de massa

Os experimentos de espectrometria de massas de alta resolução para os íons complexos **PR**, **PR01** e **PR02** (figuras 16, 17 e 18) permitiram identificar os fragmentos referentes aos íons complexos. A espectrometria de massa de alta resolução mostrou um pico em m/z de 575,0331 com uma abundância isotópica típica de rutênio que correspondeu a **PR** - $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz}) \text{Cl}]^+$ íon (m/z teórico = 575,0325); (erro ppm: 1,04), apoiando a presença de ambos os ligantes quelantes distintos. Da mesma forma, o complexo metálico **PR01** ($\text{cis-Na}[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{SO}_3)(\text{NO}_2)]$) também foi caracterizado, onde um espectro de massa de alta resolução mostrou um sinal intenso de m/z em 586,0565 u com abundância isotópica típica de Ru.

Esse sinal correspondeu à formulação do íon $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{NO}_2)]^+$ (m/z teórico = 586,0577 u); (erro ppm: 2,05), suportando a presença dos ligantes aromáticos e também do nitrito como ligante. Em relação ao complexo **PR02** - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)$, sua

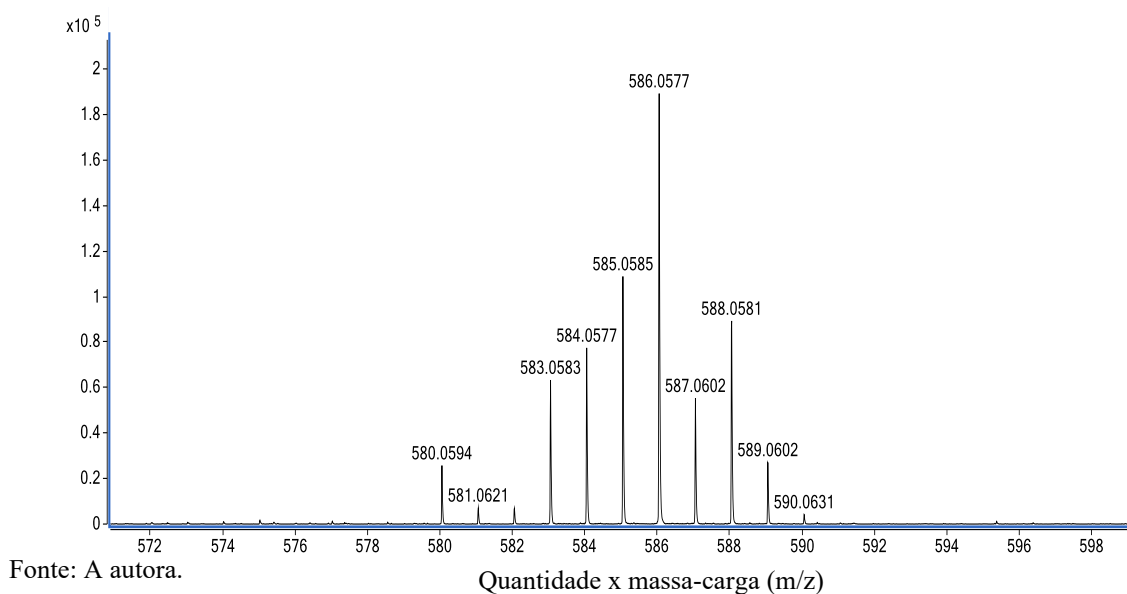
caracterização mostrou no espectro de massa de alta resolução um sinal intenso em m/z de 653,0504), que corresponde a formulação do íon (m/z teórico $(M+H)^+$: 653,0539); (erro ppm: 5,3). Este íon pode ser atribuído com a saída do NO, devido a coordenação de um MeOH, solvente utilizado na caracterização, juntamente com a protonação do complexo, formando um $(M+H)^+$.

Figura 16. Espectrometria de massas do complexo **PR** em água.



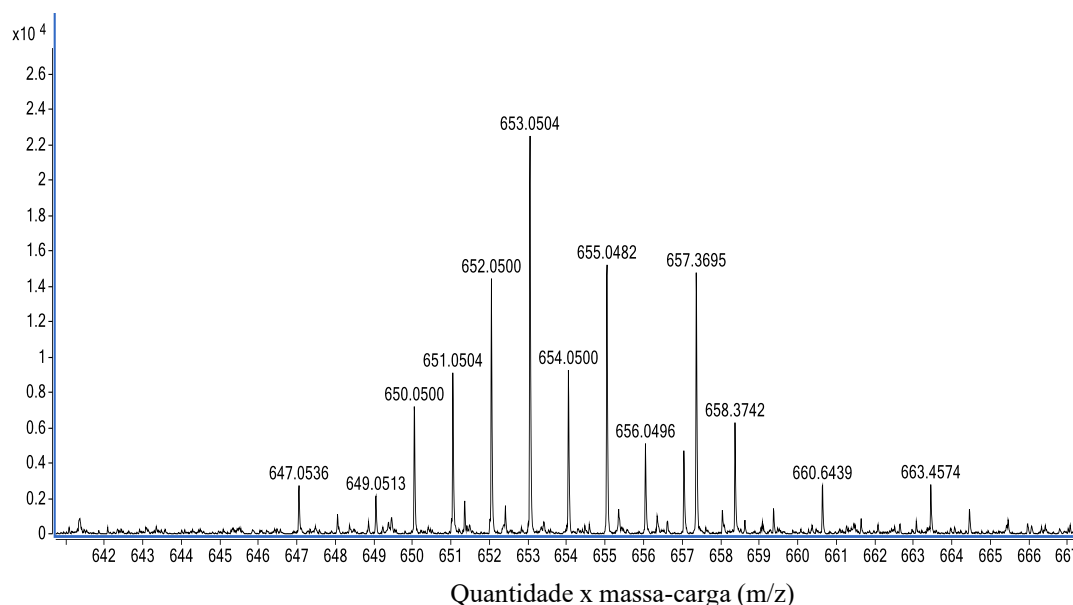
Fonte: A autora.

Figura 17. Espectrometria de massas do complexo **PR01** em água.



Fonte: A autora.

Figura 18. Espectrometria de massas do complexo **PR02** em água.



Fonte: A autora.

4.1.6 Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica apresenta grande relevância para diversos estudos de química inorgânica, pois fornece dados referente à natureza redox do complexo, bem como sua reatividade, em certos casos. Assim, foram realizadas medidas de voltametria cíclica para os complexos **PR** e **PR01** no solvente DMF em 0,1 mol L⁻¹ de PTBA a 100 mV s⁻¹, ilustrado nas figuras 19 e 20, tendo como padrão interno ferroceno. Para o complexo **PR02** foi utilizado como eletrólito suporte uma solução aquosa contendo NaTFA 0,1 mol L⁻¹ em pH 4,0, cuja medida foi realizada a 25 mV s⁻¹, como ilustrado na figura 20.

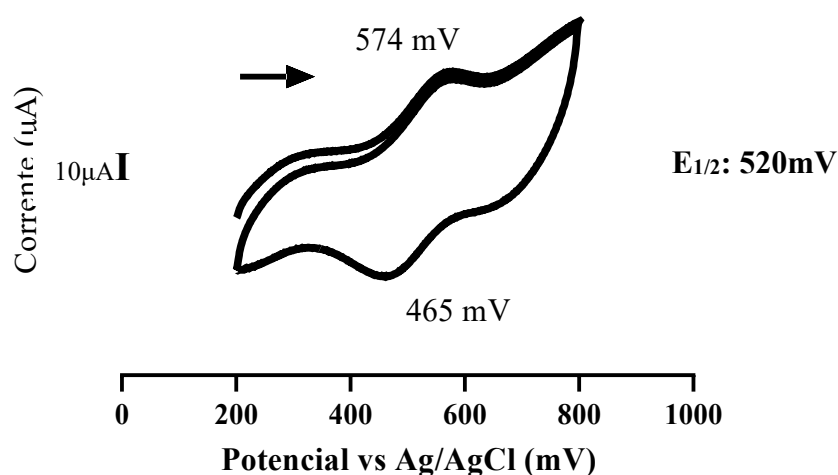
No voltamograma cíclico contendo o íon complexo **PR** observou-se um processo referente ao par redox Ru^{III}/Ru^{II} com potencial de meia onda em 520 mV vs Ag/AgCl. Com base nesses resultados, pode-se observar que esse complexo apresenta uma maior estabilidade do centro metálico na forma reduzida, esse potencial se torna ainda maior quando os ligantes SO₃²⁻ e NO₂⁻ (**PR01**) (E_{1/2}= 685 mV) substituem os ligantes cloretos. Esse fenômeno se torna extremo no caso do ligante nitrosil (**PR02**), não sendo mais possível observar o processo de oxidação do centro metálico na faixa de trabalho (-1000 até 1000). Todavia, observa-se um

processo redox com $E_{1/2} = -237$ mV referente ao processo centrado no ligante nitrosil NO^+/NO^0 , estes valores estão apresentados na Tabela 5.

Considerando o complexo **PR02** (figura 21), que contém o ligante sulfito e nitrosil, observa-se uma diminuição no potencial redox do NO em relação aos outros complexos análogos, em particular os complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ (SILVA, 2017; SILVA, 2004). O ligante sulfito deve ter um papel crucial, em associação com os ligantes periféricos, que no caso desse trabalho um dos ligantes bidentados foi alterado por um dppz. Com isso, deve haver um aumento de densidade eletrônica no NO^+ , provocado pela natureza da vizinhança, assim diminuindo o potencial de redução do ligante nitrosil.

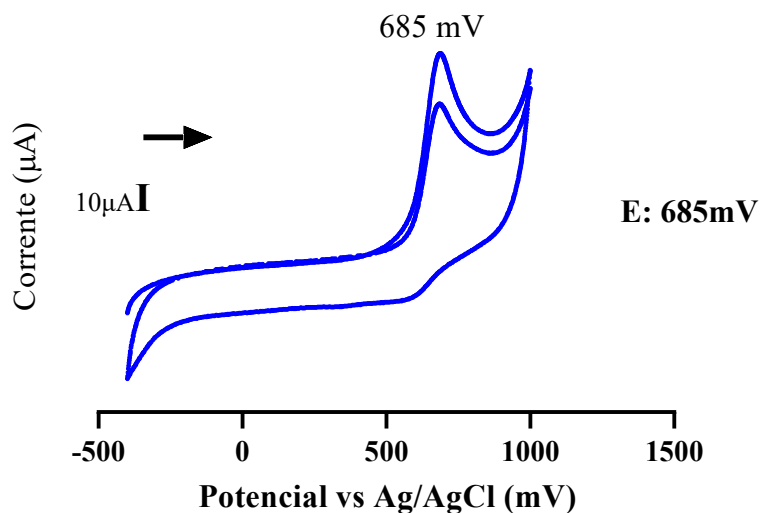
Interessante comparar esse comportamento com o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)$, cujo valor do potencial redox para NO^+/NO^0 foi de -140 mV (SILVA, 2004). Isso mostra como a mudança do ligante bpy para o ligante dppz afeta as propriedades do composto, indicando que o dppz influencia a retrodoação do metal para o ligante nitrosil (CÂNDIDO *et al.*, 2015). Esse perfil de reatividade é consistente com os valores dos potenciais redox para o par NO^+/NO^- dos complexos análogos (SILVA, 2017; SILVA, 2004).

Figura 19. Voltamograma cíclico do complexo precursor **PR**, obtidos em DMF contendo PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (eletrólito suporte) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se Ferroceno como padrão interno de calibração.



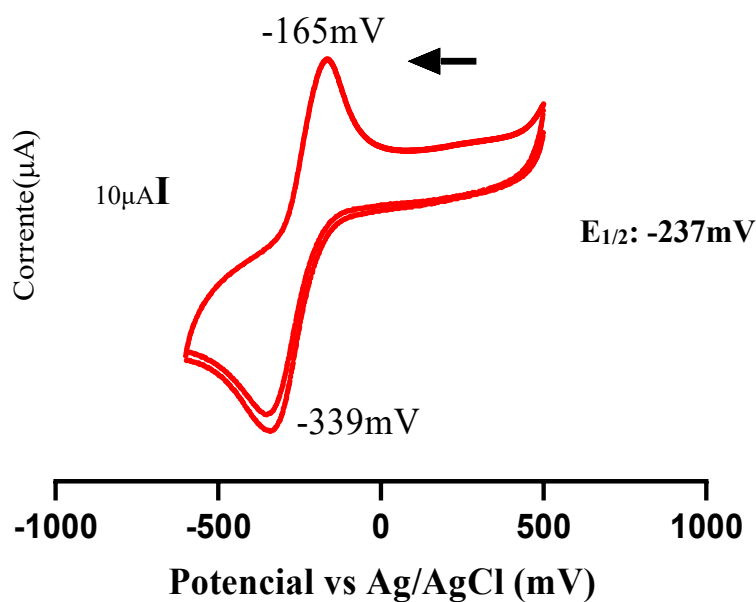
Fonte: A autora.

Figura 20. Voltamograma cíclico do complexo **PR01** obtido em DMF contendo PTBA 0,1 mol L⁻¹ (eletrólito de suporte) com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se Ferroceno como padrão interno de calibração.



Fonte: A autora.

Figura 21. Voltamograma cíclico do complexo **PR02** obtido em NaTFA 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0, com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹, utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se Ferroceno como padrão interno de calibração.



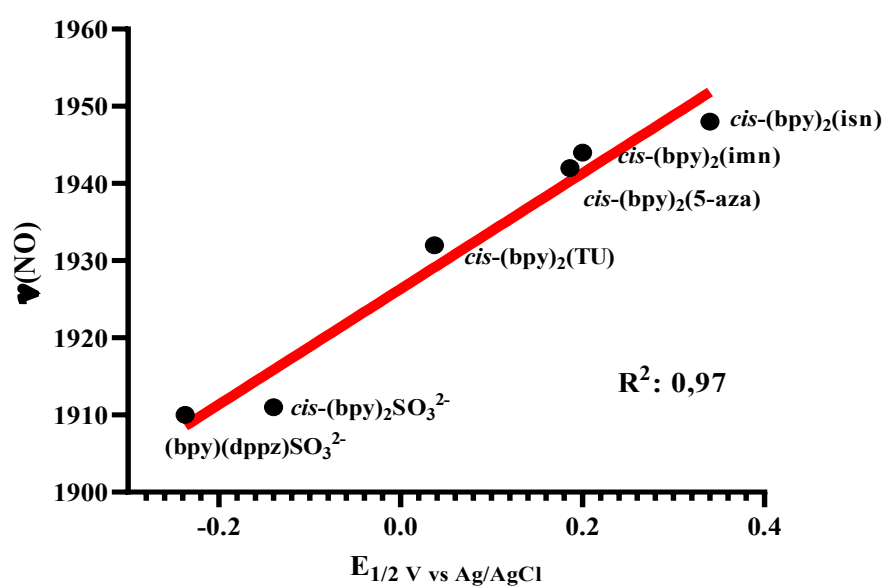
Fonte: A autora.

Tabela 7. Voltametria cíclica dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02** (mV vs Ag|AgCl).

COMPLEXOS	Ru(^{III/II})	NO(^{0/+})
[Ru(bpy)(dppz)Cl ₂] - PR	520	-
[Ru(bpy)(dppz)SO ₃ NO ₂] - PR01	685	-
[Ru(bpy)(dppz)SO ₃ NO] - PR02	-	-237
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ Cl ₂](SILVA, 2004)	590	-
<i>cis</i> -Na[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO ₂](SILVA, 2004)	450	-
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO](PF ₆)(SILVA, 2004)	-	-140
<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (tu)(NO)](PF ₆) ₃ (SILVA, 2017)	-	-240

Fonte: A autora.

Os valores encontrados na voltametria cíclica do complexo **PR02** apresentam uma satisfatória correlação com o modo vibracional do ligante NO de complexos similares ao desse trabalho (SILVA, 2004). A figura 22 mostra alguns complexos desenvolvidos pelo grupo de Bioinorgânica e que apresentam significativa correlação dos ligantes em *cis* e em seus valores de estiramento do ligante NO, assim como o desse trabalho.

Figura 22. Correlação entre $\nu(\text{NO})$ para complexos *cis*-[Ru(L)₂(L)NO](PF₆)_n e $E_{1/2}$ para a reação redox *cis*-[Ru^{II}(bpy)₂LNO⁺]⁺ⁿ, vs Ag/AgCl.

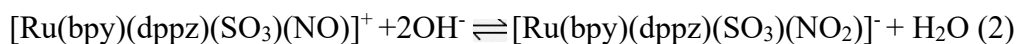
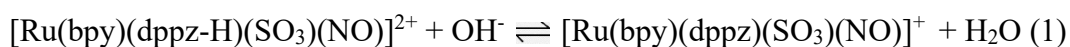
Fonte: A autora.

4.2 Determinação da constante de equilíbrio de interconversão de NO⁺/NO₂⁻

O estudo de interconversão nitrosil/nitro para o complexo *cis*-[Ru(bpy)(dppz)(NO)]⁺ foi realizado empregando-se o método espectrofotométrico, acompanhando-se a variação da absorbância no comprimento de onda de 430 nm. Essa banda indica a interconversão do NO⁺ a NO₂⁻, sendo relativa à transferência de carga do metal para ligante nos nitrosilo complexos.

O estudo da dependência desse equilíbrio com o pH para o complexo **PR02** foi realizado com a finalidade de obter informações sobre sua reatividade e estabilidade, auxiliando nas expectativas de seu emprego em condições fisiológicas. Verificou-se no gráfico da figura 23 a presença de duas regiões de variação intensa de absorbância, às quais foram atribuídas a duas reações envolvendo processo ácido-base. Assim, com um ajuste sigmoidal foi possível determinar os valores de pH para ambos os processos, sendo o primeiro, possivelmente correspondente ao pKa do ligante dppz (reação 1).

Determinação da constante de equilíbrio para a reação 1



A

B

Esse ligante possui pelo menos um nitrogênio com par de elétrons disponíveis para processos ácido-base (DA SILVA *et al.*, 2020), sendo possível observar a sua desprotonação durante a titulação efetuada, cujo valor de pKa medido foi de 5,94. Importante considerar que o valor do pKa do ligante dppz livre, de acordo com a literatura, corresponde a 3,35 (DA SILVA *et al.*, 2020). Apesar da expressiva diferença do dppz livre versus coordenado ao rutênio, um maior valor de pKa para ligantes coordenados é esperado em sistemas sujeitos a retrodoação, que enriquecem eletronicamente ligante N-heterocíclicos aromáticos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

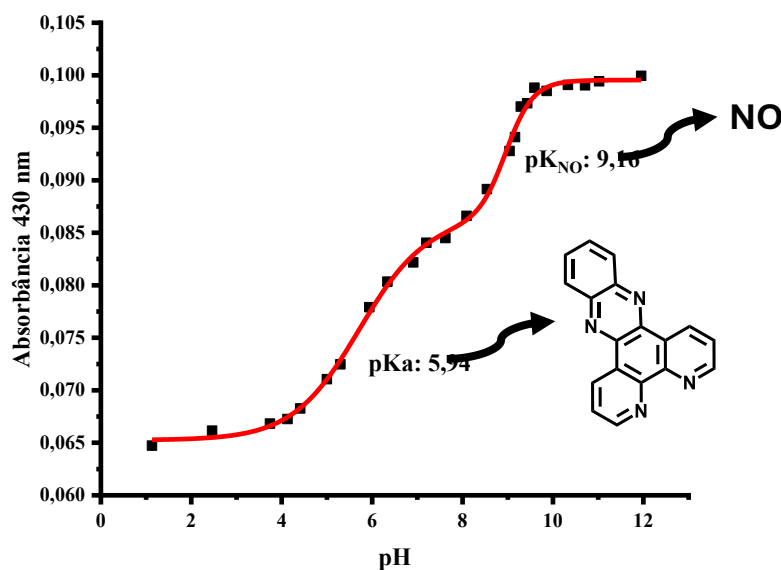
Esse perfil é plenamente justificável, já que a densidade eletrônica, influenciada pelo metal, se altera de forma acentuada em relação ao ligante livre. Com relação ao segundo processo dependente do pH, a presença do ligante sulfito deve ter um papel fundamental influenciando o valor elevado do pH de conversão nitrosil/nitro, processo esse também

dependente do pH e amplamente descrito para outros complexos metalonitrosilo. (MUNIZ CARVALHO *et al.*, 2021; SILVA, 2017)

Para complexos que apresentam ligantes nitrogenados observa-se a conversão ocorrendo em valores inferiores a pH 6. Contudo, essa alteração para pH mais elevado no composto **PR02**, se deve, possivelmente, pela influência do ligante sulfito, pela sua capacidade de manter a espécie nitrosil nessa forma em pHs mais elevados, tornando-a majoritária sob condições fisiológicas (pH 7,4). Isso pode ser uma das razões que justificam as propriedades biológicas promissoras desse tipo de complexo, tornando o ligante sulfito tão relevante (MUNIZ CARVALHO *et al.*, 2021).

Para a interconversão nitrosil/nitro, obteve-se o valor de pH de conversão de 50% das espécies em 9,16. A literatura também mostram valor de pH de interconversão próximo desse valor para o complexo análogo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)](PF₆) (pH = 10,35) e para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(tu)(NO)]³⁺ (pH = 8,0). (SILVA, 2017; SILVA SOUSA *et al.*, 2016)

Figura 23. Dependência do pH para o complexo **PR02**.



Fonte: A autora.

A possível justificativa para a variação nos valores de constante de equilíbrio de interconversão nitrosil/nitro para complexos tão similares deve estar associada a diferença da capacidade π -receptores dos ligantes auxiliares, em particular a alteração de uma bpy por um dppz. A reação entre o ligante nitrosil e o íon hidróxido (OH⁻) em meio aquoso será tanto maior quanto maior for o caráter eletrofílico do grupo NO⁺. A constante de equilíbrio obtida para esse

complexo foi o valor K_{eq} : $4,789 \times 10^9$, esse valor corrobora com dados descrito na literatura para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)](PF₆) que apresentou pH de conversão 10,35 e constante $1,74 \times 10^7$ (CÂNDIDO *et al.*, 2015).

Logo, ligantes que competem por densidade π desfavorecem a retrodoação de carga do metal para o ligante nitrosil (π -receptores fortes), diminuindo a densidade eletrônica no NO. Esse processo deve torná-lo com maior carga positiva e assim mais propício ao ataque nucleofílico do íon OH⁻. Isso resulta em valores de pH mais baixos (CÂNDIDO *et al.*, 2015) para a interconversão NO⁺/NO₂⁻, justificando o valor de pH de conversão diferente para o complexo **PR02**, cujo valor foi menor que o do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ (SILVA *et al.*, 2006; SILVA SOUSA *et al.*, 2016).

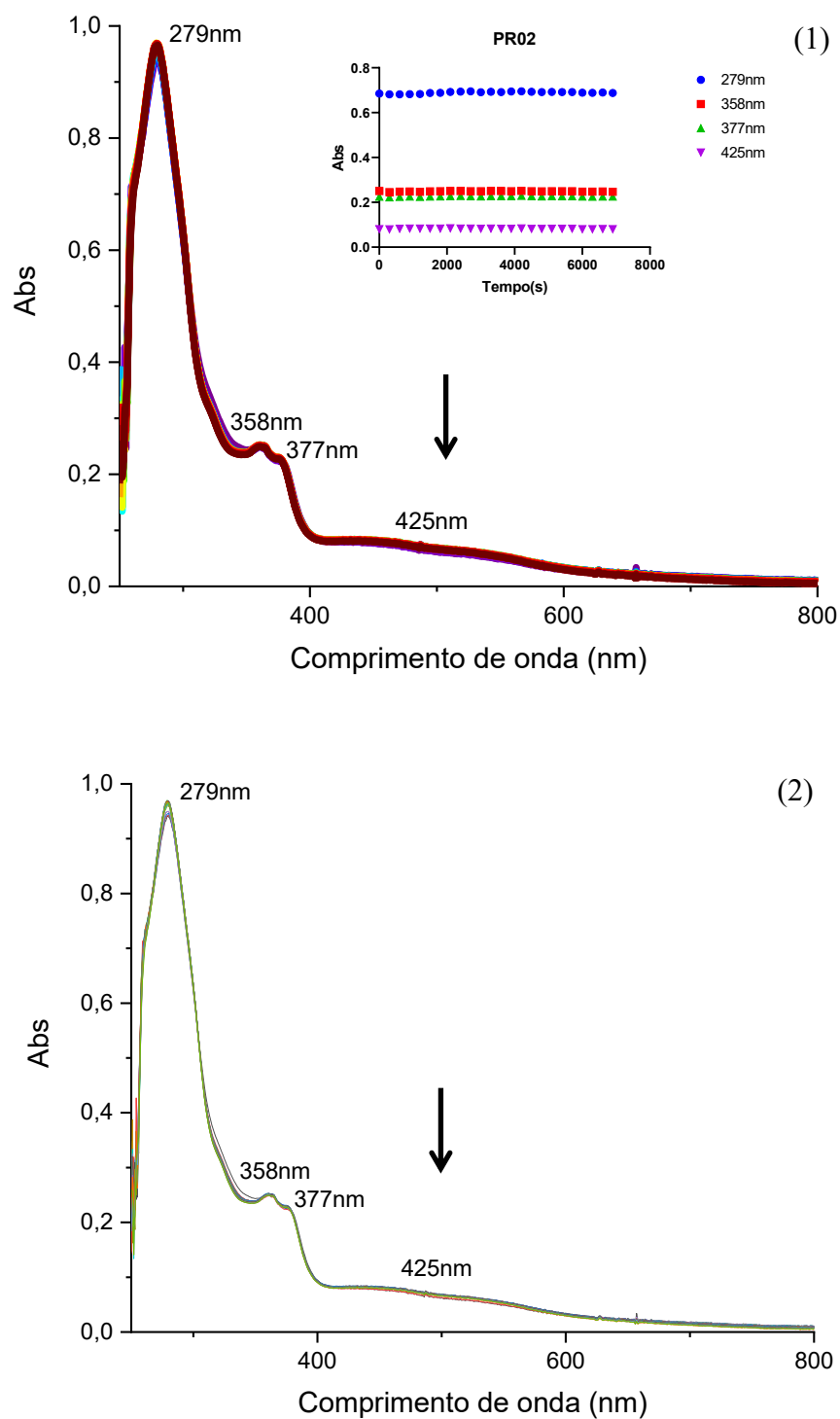
Isso ilustra como a mudança do ligante bpy para o ligante dppz afeta as propriedades do composto, indicando que o dppz desfavorece a retrodoação do metal para o ligante nitrosil, resultando no valor de pH de interconversão mais baixo para o complexo **PR02** estudado (CÂNDIDO *et al.*, 2015; MUNIZ CARVALHO *et al.*, 2021). Esse perfil de reatividade é consistente com os valores dos potenciais redox para o par NO⁺/NO⁻ dos complexos análogos.

Contudo, esse resultado se mostrou ainda atrativo devido apresentar valor de pH de interconversão significativamente acima do pH fisiológico, tornando-o bastante promissor para posteriores estudos biológicos. Isso define qual espécie em pH fisiológico predominará, se NO⁺ ou NO₂⁻, o que modula a própria liberação do NO e sua reatividade (MUNIZ CARVALHO *et al.*, 2021).

4.3 Estudos de reatividade do NO

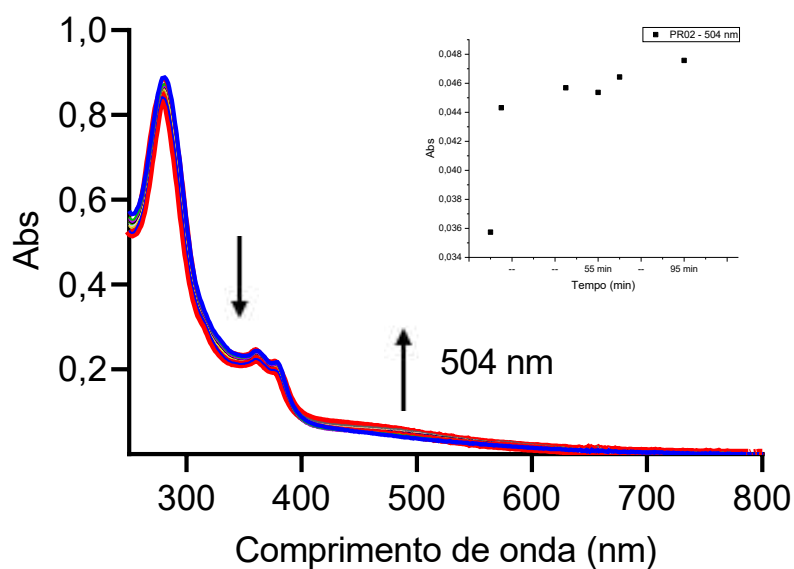
A fim de investigar a estabilidade dos complexos sob condições experimentais distintas foram conduzidos uma série de estudos cinéticos. Os espectros eletrônicos do complexo **PR02** foram coletados e monitorados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 em 5% de DMSO na ausência e presença de luz (figura 24), comparativamente foi realizado o mesmo estudo com os complexos **PR** e **PR01** (apêndice O), solução aquosa de NaTFA pH 4,0 (figura 25) e na presença de glutathione reduzida (GSH) na ausência e presença de luz azul (figura 26). Os complexos se mostraram estáveis termicamente a 24°C em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, NaTFA e na presença de (GSH) sem que houvesse mudanças significativas nos espectros eletrônicos após 2h, sem irradiação e sob irradiação com luz azul.

Figura 24. Estudo cinético do complexo **PR02** na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 em 5% de DMSO na ausência (1) e presença de luz (2), monitorado por 2h.



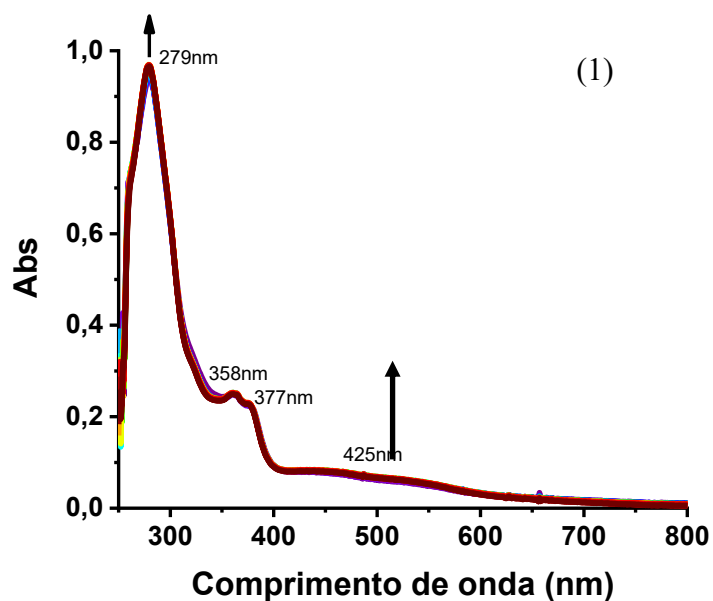
Fonte: A autora.

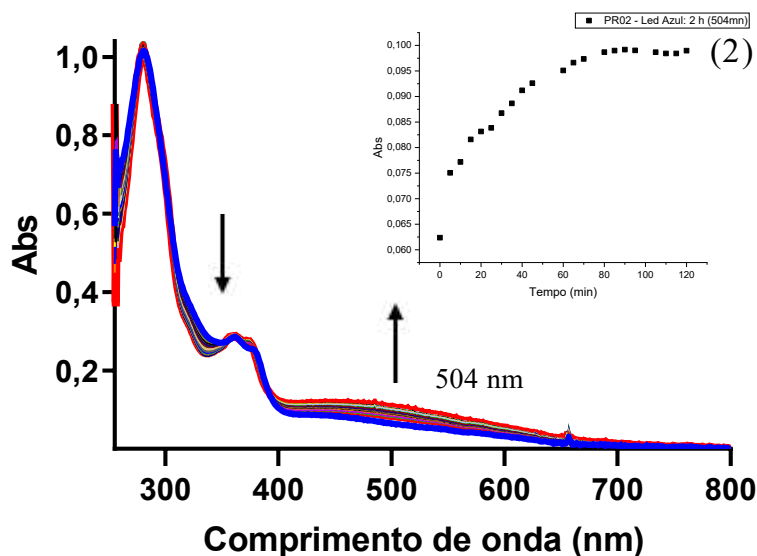
Figura 25. Estudo cinético do complexo **PR02** $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em NaTFA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0 irradiado por 2 h com LED azul.



Fonte: A autora.

Figura 26. Estudo cinético do complexo **PR02** $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, na presença de GSH ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) sem irradiação (1) e com irradiação de luz azul por 2h (2).





Fonte: A autora.

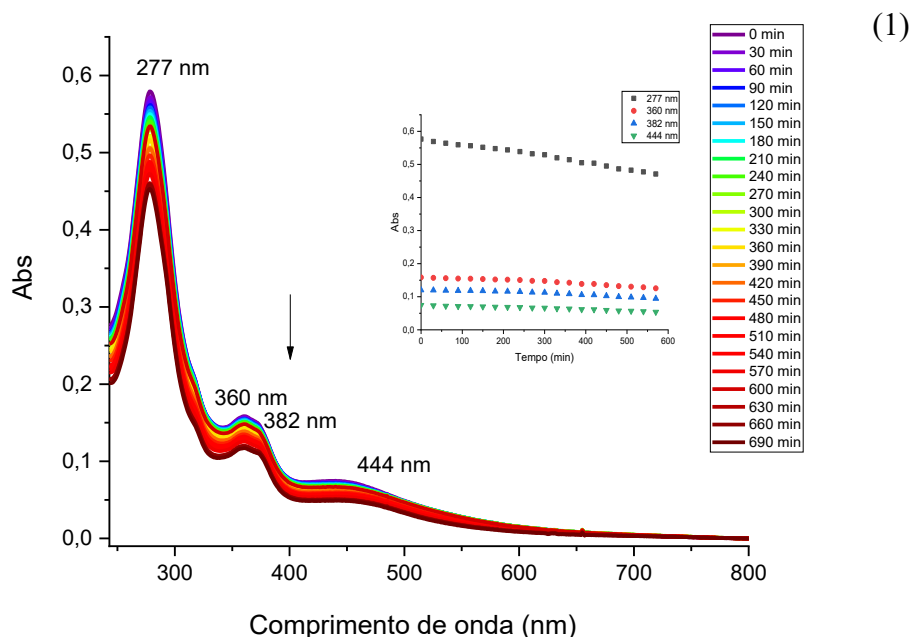
Procedimento semelhante foi realizado com todos os complexos monitorados por um tempo mais longo, 12h e à 37 °C. Os espectros eletrônicos do complexo **PR02** foram monitorados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 em 5% de DMSO, na ausência e presença de luz (figura 27), na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (figura 27), e em glutathione reduzida (GSH) na ausência e presença de luz azul, sendo comparados os complexos **PR02** e *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ (figura 28). Os complexos foram analisados com adição de glutathione (GSH), devido sua capacidade de reagir com diversos complexos metálicos nitrosilados, promovendo a liberação do NO, adicionalmente tem sido descrita como supressora de espécies reativas de oxigênio (ROS)(MARTINS et al., 2023).

A utilização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi feita por ser um agente biologicamente relevante que pode promover clivagem de DNA através da geração induzida de radicais livres(CAULFIELD, 1991). A utilização do GSH ou H₂O₂ mostraram alteração espectral indicando que a liberação do ligante nitrosil é lenta na presença de GSH, precisando de maior tempo para que ocorra liberação. Contudo, após 12h, observou-se a existência de um precipitado na cubeta, indicando que mesmo solubilizando completamente no início do experimento, após tempo prolongado ocorre a precipitação na concentração empregada de 20 μmol L⁻¹.

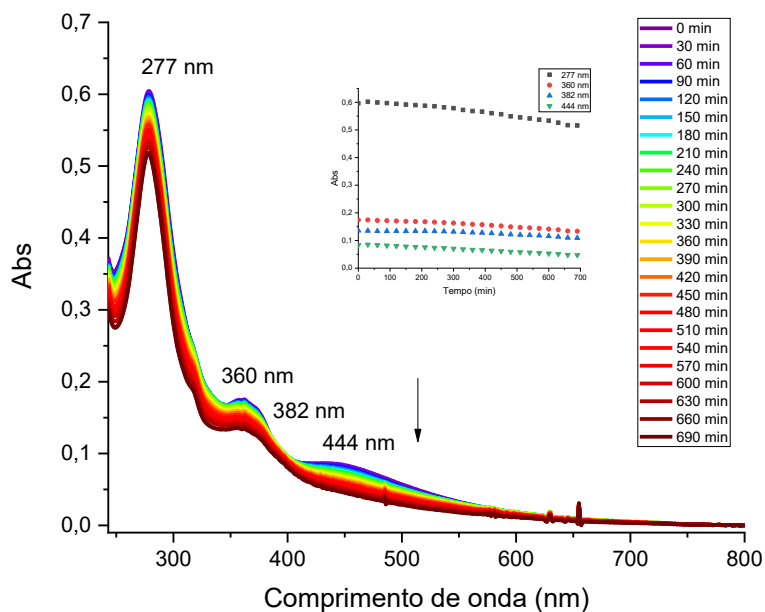
Os estudos realizados sem irradiação e irradiados com led azul mostraram mudanças espectrais para o complexo **PR02** sob irradiação (figura 28), podendo indicar algumas alterações na sua formulação (ex. troca de ligantes, como substituição do ligante NO por água), influenciando seu espectro eletrônico, mas que podem ser decorrentes de precipitação do fotoproduto. De acordo com a literatura, nitrosilo complexos de rutênio podem liberar óxido nítrico quando irradiados por luz, geralmente na faixa do azul ou ultravioleta. Esse processo ocorre pelo fato da grande parte desses compostos apresentarem bandas de absorção nessas regiões, as quais se referem a bandas de transferência de carga metal-ligante ou ligante-ligante (SILVA *et al.*, 2006), com maior contribuição do ligante NO⁺, entretanto nesse sistema isso se mostrou muito pouco eficiente.

Observa-se que os nitrosilo complexos apresentam um deslocamento típico das bandas de absorção do complexo para o azul, referentes às transições de transferências de carga metal-ligante do tipo $d\pi Ru^{II} \rightarrow \pi^*(bpy)$ (SILVA, 2004). Nos processos de fotoliberação assume-se que ocorra uma transição eletrônica que provoque a oxidação do centro metálico e possível redução do ligante NO⁺ a NO⁰, levando assim a consequente liberação do ligante NO. Apesar dessa descrição mecanística, existem outras propostas na literatura, inclusive buscando explicar como esses complexos, após a liberação de NO, se apresentaria reduzidos (LACROIX *et al.*, 2022)

Figura 27. Estudo de estabilidade térmica do complexo **PR02** 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4 e 5% de DMSO sem irradiação (1) e com irradiação com LED azul por 720 min (12h) à 37°C (2).



(2)

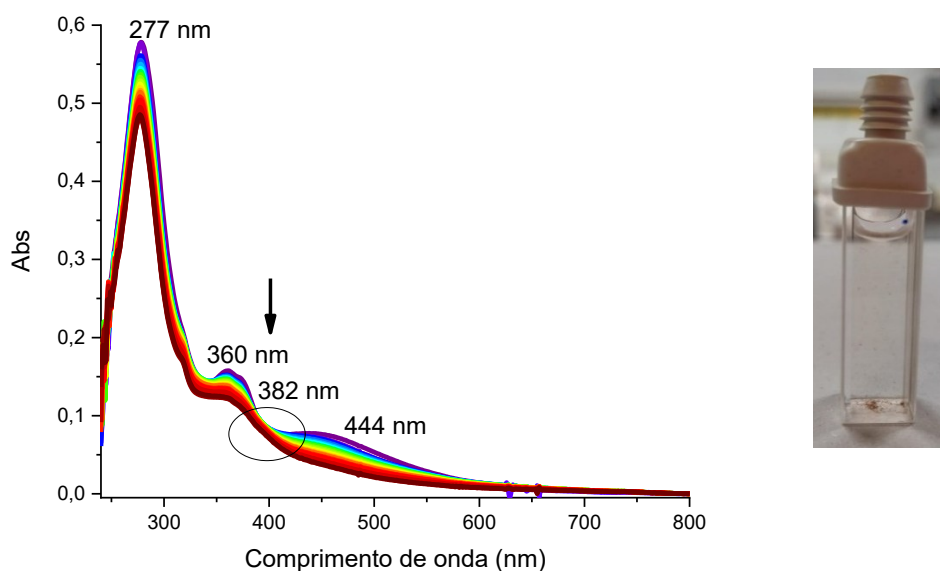


Fonte: A autora.

O estudo de estabilidade com utilização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (figura 28) foi realizado devido a capacidade do H_2O_2 na presença de metais de transição poderem induzir a formação do radical $\text{OH}^\cdot$, onde o H_2O_2 atuará como agente oxidante mudando o estado de oxidação do metal (METZLER-NOLTE *et al.*, 2009).

No estudo realizado observou-se que o H_2O_2 reagiu rapidamente com o complexo, e durante os primeiros 30 min havia reagido completamente com o complexo, diferente do que foi observado com os outros experimentos, a aplicação do H_2O_2 promoveu uma reação rápida, possivelmente pela geração de radicais e da liberação do ligante nitrosil, após esse período de 30 min, observou-se que as bandas do complexo começam a diminuir, além do surgimento de precipitado.

Figura 28. Estudo de estabilidade térmica do complexo **PR02** frente a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,4 e 5% de DMSO sem irradiação por 720 min (12h) à 37°C.

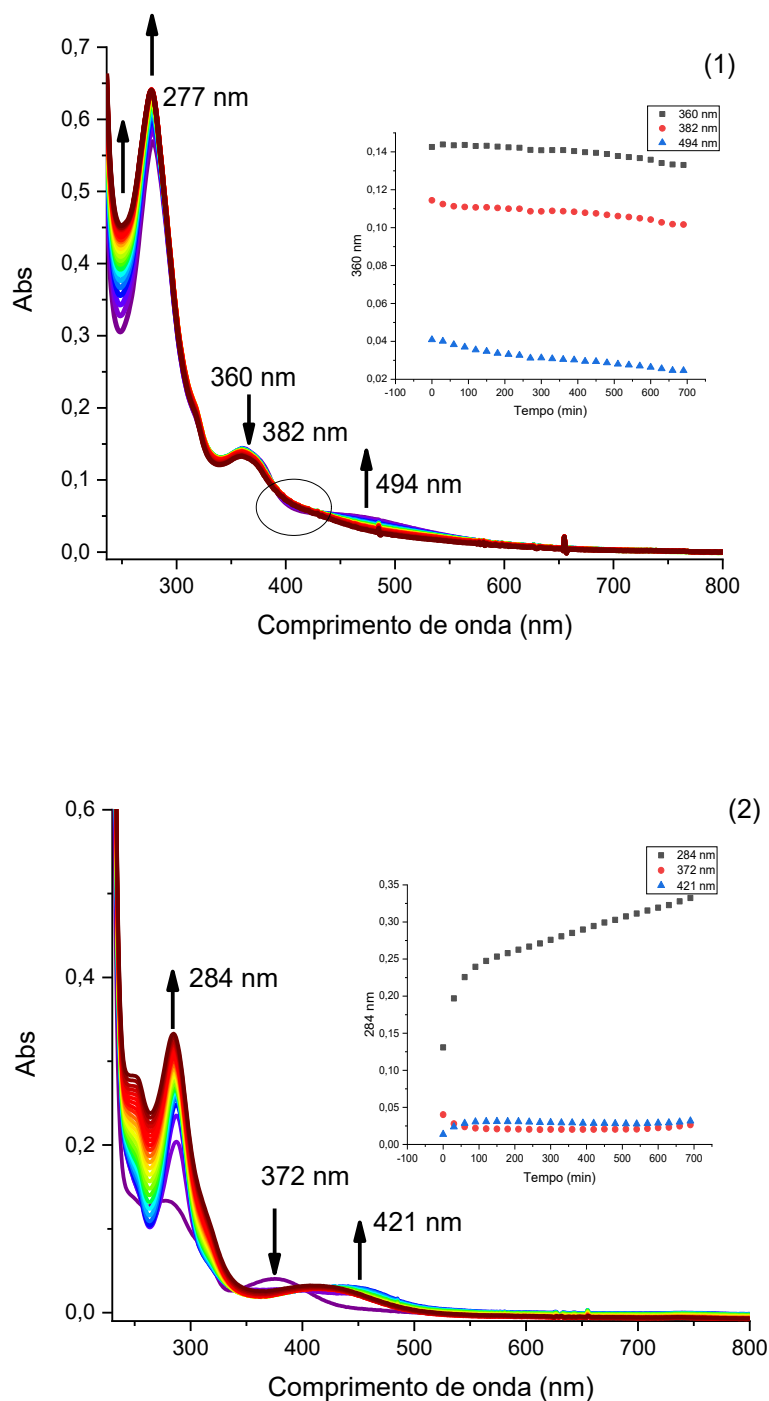


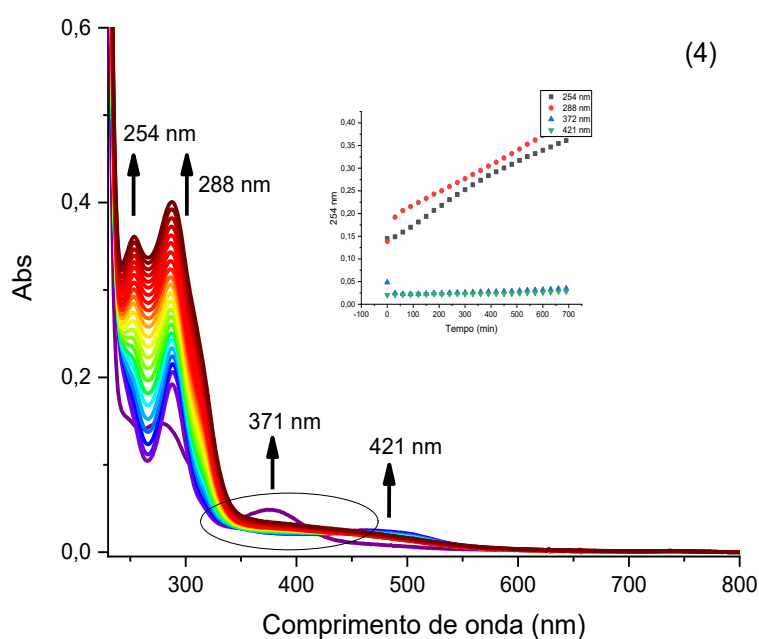
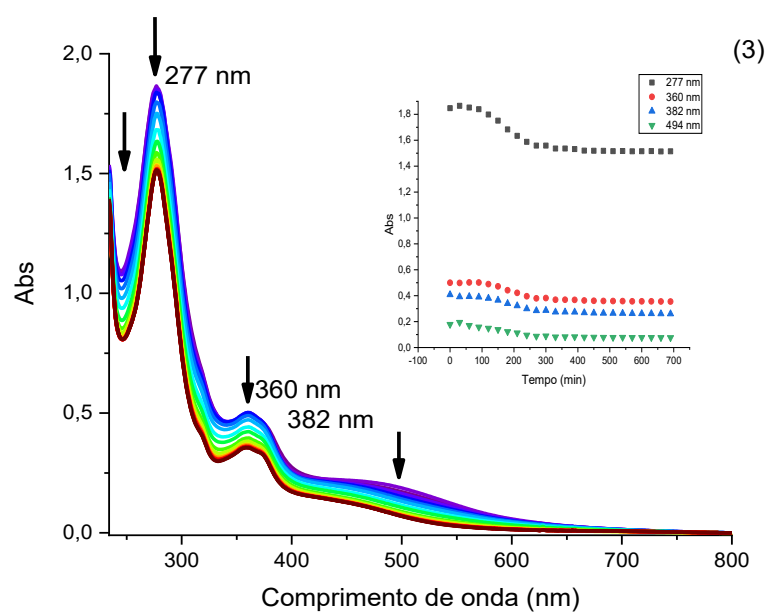
Fonte: A autora.

Por outro lado, a fim de reduzir o grupo nitrosil (NO^+) coordenado pode-se empregar processos químicos, o que frequentemente pode ser feito usando a capacidade redutora da glutathiona (GSH). Dessa forma, realizou-se um estudo, inicialmente, apenas com o complexo **PR02** e GSH por 120 min sem irradiação de luz (1) e nas mesmas condições, porém irradiando com luz (2), comparativamente foi realizado o mesmo experimento com o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$.

Considerando que o GSH se encontra em quantidades relativamente elevadas (1 – 10 mmol L^{-1}) no meio celular, tal estudo se faz relevante por mimetizar condições fisiológicas. Nesse processo, observou-se mudanças espectroscópicas com o tempo (figura 29). Curiosamente, em sistema análogo (*cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$), observou-se uma reação bem mais rápida com esse mesmo redutor levando a liberação de NO/HNO (SILVA *et al.*, 2011).

Figura 29. Estudo de estabilidade térmica do complexo **PR02 (1)** e *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ **(2)**, com adição de glutathiona (GSH) 1,5 mmol L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,4 e 5% de DMSO sem irradiação **(3)** e com irradiação com LED azul por 720 min (12h) a 37 °C **(4)**.





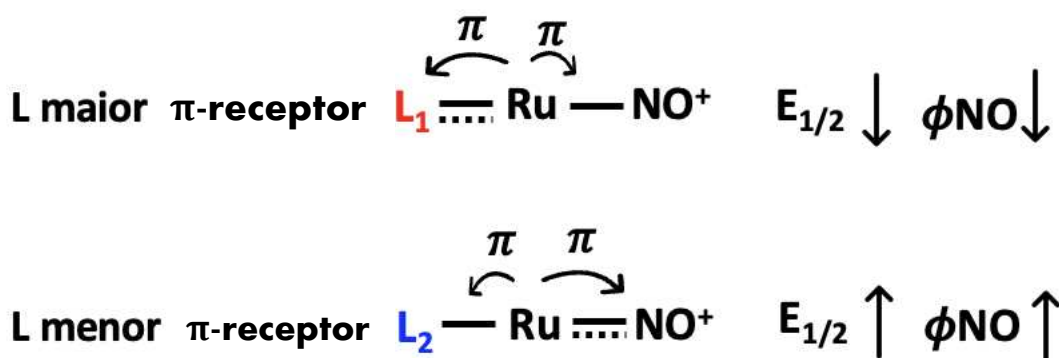
Fonte: A autora.

Esse resultado indica que a liberação do NO (e/ou HNO) é significativamente mais lenta para o **PR02** em todos os estudos de estabilidade, quando comparado ao complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺, exigindo assim mais tempo para que se evidencie quaisquer alterações espectrais completas. Apesar disso, foi observado, de forma mais pronunciada, a intensificação da banda em 277 nm, mesmo sem ocorrer alterações significativas nas bandas no visível, provavelmente devido a cinética de liberação de NO/HNO ser muito lenta. O uso da luz também

causou poucas alterações espectroscópicas, ainda que haja significativa absorção de luz, mesmo em 458 nm (LED azul).

Esse comportamento poderia ser justificado considerando que o rendimento quântico de liberação de NO (Φ_{NO}) para *cis*-[Ru(L)(bpy)₂(NO)]³⁺ diminui à medida que o caráter π -receptor do ligante L aumenta, sendo observado no composto na substituição do ligante bpy pelo dppz, que possui um caráter π -receptor maior. Esse perfil seria consistente com a diminuição da densidade eletrônica no ligante nitrosil, nesse sentido a liberação de NO deve ser maior quanto mais forte for a *back-bonding* $d\pi(\text{Ru(II)})-\pi^*(\text{NO}^+)$ o que não ocorre quando se tem menor *back-bonding* $d\pi(\text{Ru(II)})-\pi^*(\text{Ligante L})$, o caso do uso de dppz (SAUAIA *et al.*, 2003).

Tal comportamento pode ainda ser correlacionado a outras propriedades do complexo como o potencial redox do par $\text{NO}^{+/0}$, que também indica a natureza maior ou menor de densidade eletrônica nesse ligante. Apesar disso, a natureza dos orbitais envolvidos na transição eletrônica usada na fotoliberação também devem ter sua influência nesse processo, sendo observado para o complexo **PR02** que as transições mais próximas do visível são atribuídas em sua maioria para processos centrados nos ligantes orgânicos, com pequena influência aparente no Ru e NO. Esse perfil se altera bastante significativamente com o complexo análogo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺.



Estudos prévios mostraram que a reação de complexos nitrosilados com excesso de glutathione reduzida tem como produto a liberação de HNO, seguido da entrada de uma molécula do solvente (SILVA SOUSA *et al.*, 2016). Apesar de não termos nesses experimentos comprovado a liberação de NO e/ou HNO as alterações espectroscópicas são sugestivas da possível eliminação do ligante nitrosil coordenado. Nos sistemas análogos, essa liberação já foi

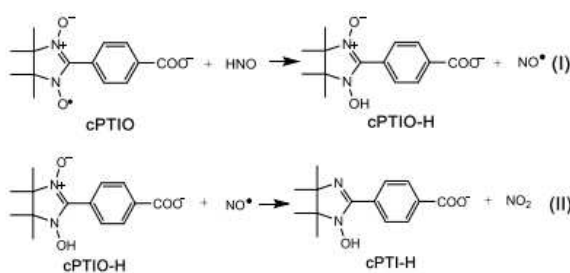
extensivamente comprovada sugerindo que nesse caso devamos ter também esse processo ocorrendo, entretanto com uma cinética bem mais lenta (apêndice AA (2)). O pH de conversão nitro-nitrosil poderia ser empregado como um indicativo do caráter eletrofílico do NO coordenado (maior caráter $-\text{NO}^+$), o qual poderia estar menos apto para reagir com GSH. Infelizmente, essa expectativa não parece corresponder com as observações experimentais em que mesmo ligantes N-heterocíclicos, com baixos valor de pH de conversão muito baixo (pH <4), ainda assim tem expressivas velocidades de reação com GSH, não justificando a baixa reatividade do **PR02**.

4.4 Investigação da geração seletiva para NO ou HNO

A utilização de sondas químicas seletivas tem como finalidade detectar NO ou HNO liberado através da reação rápida e estequiométrica com NO e HNO, originando perfis espectroscópicos distintos. Nesse ensaio empregou-se o sal 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-óxido-3-óxido de potássio (cPTIO) (SAMUNI *et al.*, 2010; ZAPATA *et al.*, 2013) como sonda seletiva para NO ou HNO, frequentemente descrita na literatura. O mecanismo de reação desse reagente, que pode também ser usado como um *scavenger* de NO ou HNO, é bem descrito na literatura (SAMUNI *et al.*, 2010; SMULIK-IZYDORCZYK *et al.*, 2021; ZAPATA *et al.*, 2013).

O cPTIO apresenta característica seletividade frente ao óxido nítrico, além de ser uma reação rápida e estequiométrica, possui a capacidade de detectar as duas espécies reativas de nitrogênio, tanto o NO quanto NO^- (HNO). Entretanto, ao reagir com alguma dessas espécies (reação 4), o cPTIO apresenta características espectrais bem definidas, cujo comportamento mostra diminuição das bandas em 360 e 560 nm (GOLDSTEIN *et al.*, 2003; SAMUNI *et al.*, 2010). Apesar dessa seletividade, certos agentes redutores podem reagir com cPTIO levando ao desaparecimento de sua banda em 560 nm, tal como ácido ascórbico e glutathiona, quando empregados em largo excesso e em pH mais básicos.

Reação 2



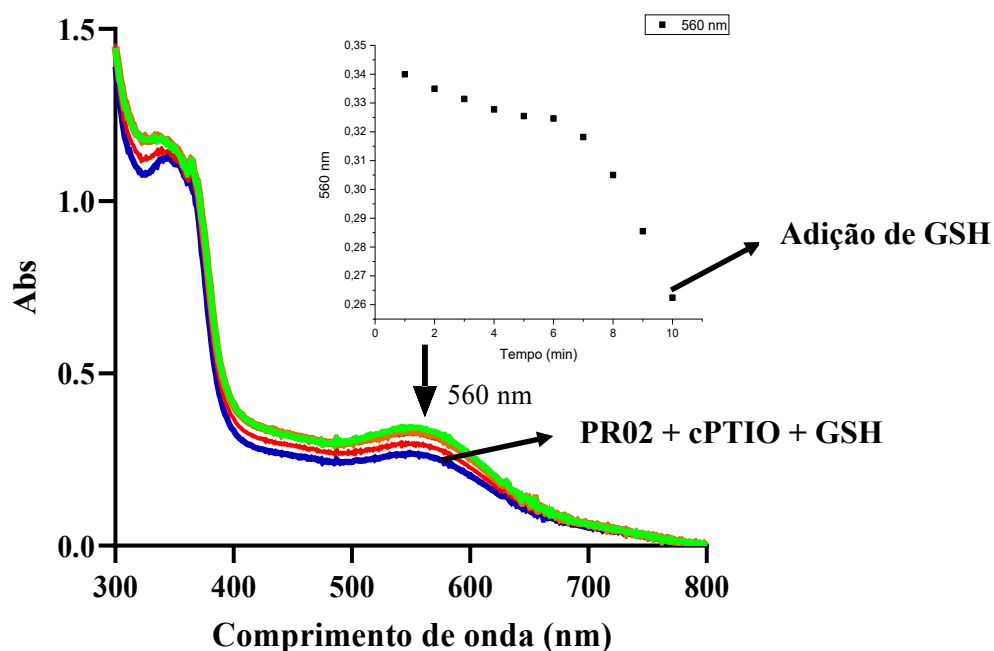
Fonte: A autora.

Estudos mais detalhados da reação de fotólise do complexo **PR02**, sob irradiação de luz UV (máx. 350 nm), foi realizada empregando-se a sonda cPTIO e monitorando por espectroscopia eletrônica (figura 29). Nesse estudo empregou-se as concentrações de 190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cPTIO e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo **PR02**, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. A reação foi monitorada sob irradiação de luz UV por 80 minutos, esse tempo foi usado uma vez que se esperava um processo mais rápido ao se usar luz mais energética.

No entanto, mesmo em baixo comprimento de onda o processo de fotólise do composto foi lento. A mudança espectral observada foi bastante sutil, indicando que a possível reação de liberação de NO/HNO é ainda bastante lenta para esse complexo, em consistência com os estudos feitos também com luz azul, conforme mencionado nos ensaios com o complexo **PR02** e GSH sem irradiação e irradiado (figura 29), mostrando a liberação lenta do ligante nitrosil. Entretanto, ainda é possível observar a redução característica da banda correspondente ao cPTIO em 560 nm, indicando a conversão de cPTIO em cPTIO-H (BOBKO *et al.*, 2013; SAMUNI *et al.*, 2010).

Adicionalmente, ao se empregar glutathiona (GSH), ao invés da irradiação com luz UV, pode-se observar a redução da banda em 560 nm de maneira mais pronunciada, indicando que deve estar ocorrendo a liberação de NO ou HNO pelo complexo **PR02** (figura 30). Esses resultados indicam a possível liberação de NO (ou HNO) mediada por tióis fisiológicos, ainda que em discretas quantidades, em analogia ao observado em sistema similar (Silva *et al.*, 2011).

Figura 30. Estudo de liberação de NO/HNO através da reação do complexo **PR02** ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) com cPTIO ($190 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 sob irradiação na região do UV ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$). Monitorando variações espectrais na região do UV-vis variando de (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 20 min, (—) 30 min, (—) 40 min, (—) 50 min, (—) 60 min, (—) 60 min + GSH (1). Gráfico (2) da velocidade da reação de liberação do complexo **PR02** em NBT $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e glutatona (GSH) $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$



Fonte: A autora.

O monitoramento espectroscópico apresentado na figura 29 indica que o NO (ou HNO) está sendo liberado lentamente pelo complexo **PR02** também quando estimulado por luz na região de 350 nm. Ao lado foi adicionado o gráfico (2) que mostra a velocidade de reação do complexo com cPTIO e GSH, sugerindo que a cinética de liberação se torna mais rápida com a adição de GSH, confirmando a importância de tiois na liberação de NO/HNO.

Convém mencionar que a diminuição da banda em 560 nm é indicativo da reação do cPTIO tanto com NO quanto com HNO, no último espectro medido, após 60 min de irradiação com luz UV, foi adicionado GSH com a finalidade avaliar se haveria uma posterior geração de NO/HNO no meio, o que foi observado com uma redução bem mais significativa da banda em 560 nm. Estudos realizados com o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ mostraram que sob irradiação com luz azul (463 nm) liberou-se NO o que foi detectado pela reação com cPTIO (SILVA SOUSA *et al.*, 2016). Em compensação, a presença de tiois (por exemplo, GSH)

com o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO]⁺ levou a liberação de HNO (SILVA SOUSA *et al.*, 2016). Infelizmente, a natureza dessas espécies não pode ser plenamente confirmada para o composto **PR02**, mas não se espera mudanças bruscas nesse perfil de reação exceto sua cinética. De qualquer forma, o que observamos em resumo é que o nitrosilo complexo **PR02** é expressivamente menos reativo e pouco capaz de liberar seja NO ou HNO por estímulos diversos.

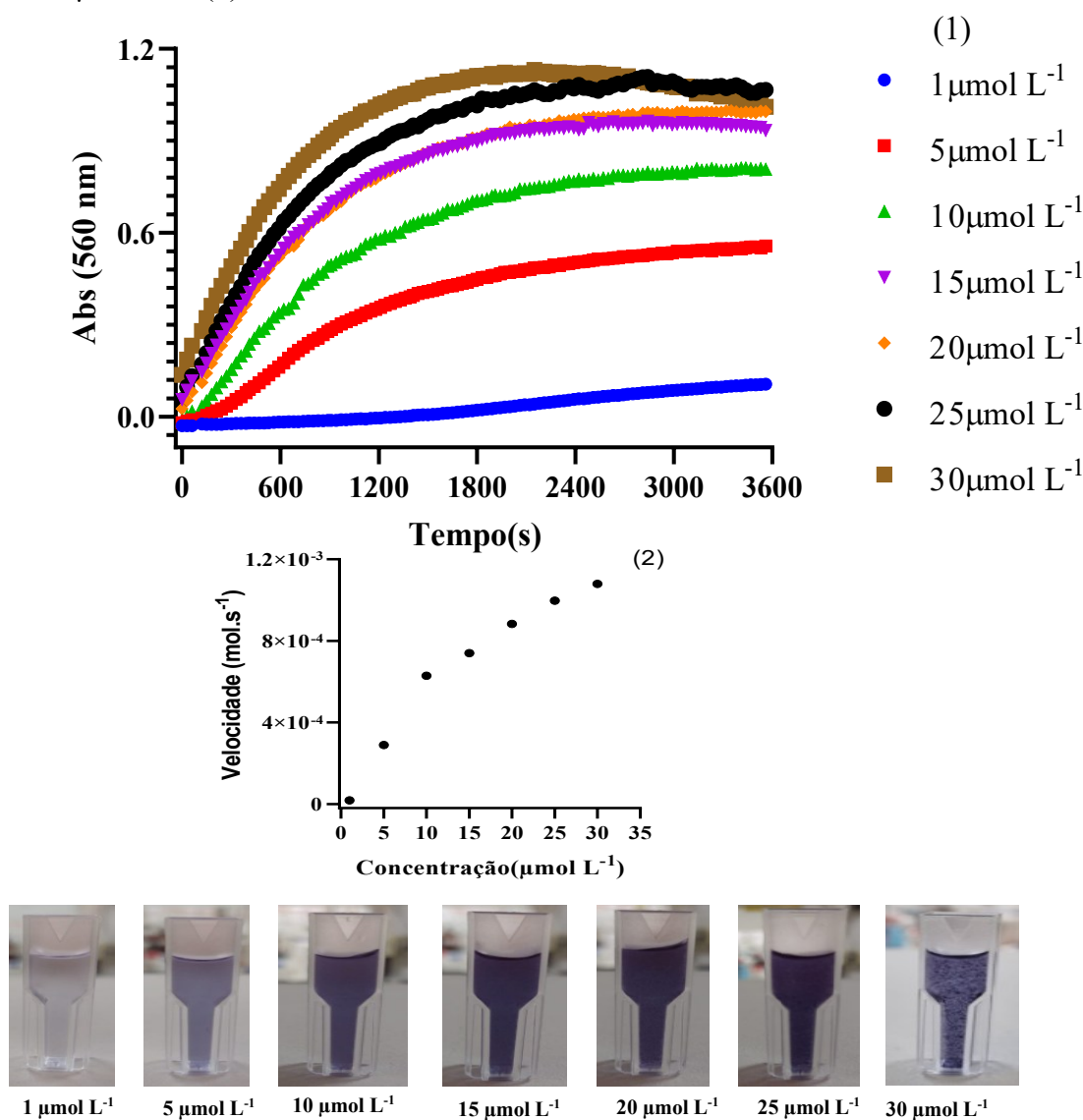
4.5 Estudo de geração de radical superóxido

O radical ânion superóxido (O₂^{•-}) é geralmente produzido pela redução de oxigênio molecular, por meio da adição de um elétron ao orbital $\pi^*(2p)$ da molécula (HALLIWELL *et al.*, 2015). Apesar de ser um fraco oxidante (SHIMADA *et al.*, 2015), o íon O₂^{•-} pode ocasionar sérios danos em biomoléculas quando associado com outras espécies radicalares. Essa espécie atua como redutor em reações contendo metais de transição, geralmente Fe³⁺ e Cu²⁺, e também na produção de fortes oxidantes denominados de radical hidroxila (•OH) e peroxinitrito (ONOO⁻), essa última a partir da reação com o NO (BECKMAN *et al.*, 1990; ESPEY *et al.*, 2002).

Com o objetivo de detectar a possível geração de radical superóxido (íon O₂^{•-}) foi utilizado a sonda azul de nitro-tetrazólio (NBT), que ao reagir com íon O₂^{•-} gera um produto azul (formazan) que eventualmente precipita (DEHNE *et al.*, 2001). Alguns metalocompostos podem gerar superóxido sob reação com redutores como glutathione (GSH). Uma vez que esse redutor biológico já tem sido bastante utilizado em estudos com complexos nitrosilados, torna-se razoável considerá-lo nesses estudos de geração de superóxido. Isso se torna ainda mais relevante quando se observou modesta reação com o complexo **PR02**, com eventual liberação discreta de NO ou HNO.

Nesse estudo, a reação do complexo **PR02** com glutathione na presença da sonda NBT foi monitorada durante 1 h, empregando-se crescentes concentrações do complexo (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Essa reação empregou GSH (1,5 mmol L⁻¹) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 e NBT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), sob condições aeróbicas. A Figura 31 mostra as alterações colorimétricas e traços cinéticos, referentes à reação do nitrosilo complexo com o tiol na presença de NBT.

Figura 31. Curva cinética correspondente às variações espectrais da banda em 560 nm do NBT, durante reação do complexo **PR02**, nas concentrações de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—), $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—), $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—), $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—), $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—) e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—), com glutathiona (GSH, $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de NBT ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4. Os espectros eletrônicos originais foram obtidos a cada 30s durante 3600s (1) e gráfico da velocidade da reação de formação provável de superóxido com o complexo **PR02** em tampão fosfato pH 7,4 e glutathiona (GSH) $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ na presença de NBT $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. (2)



Fonte: A autora.

Observou-se que o aumento da concentração de complexo provocou um correspondente aumento na velocidade de redução do corante NBT, sugerindo um aumento na geração de radical superóxido pelo complexo **PR02** em reação com GSH.

Esse resultado sugere que há possivelmente a influência da presença do NO nesse processo e mesmo a partir da concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi possível identificar a provável geração desse radical com a redução do NBT, gerando uma espécie final de coloração azul, consistente com formazan.

O mesmo ensaio foi realizado com o complexo precursor **PR** (apêndice P), que não tem o ligante NO, e não foi observada nenhuma variação, reforçando que a mudança espectral foi ocasionada pela reação com GSH e o grupo nitrosil. Um possível mecanismo que poderia estar ocorrendo seria o GSH reagindo com o complexo **PR02** reduzindo NO^+ a NO^0 e este último reduzindo o oxigênio a superóxido e retornando a NO^+ .

Convém mencionar que para esse complexo a concentração máxima usada foi de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, uma vez que valores mais elevados promoveram um rápido decaimento da curva cinética decorrente da formação de precipitado, indicando excesso do produto formazan. A figura 30 ilustra o perfil da velocidade inicial de redução do NBT na presença de NBT e GSH em concentrações crescentes do complexo **PR02**. Esse resultado mostrou uma correlação entre a concentração do complexo na velocidade de reação do NBT alcançando possivelmente um *plateau*, que, infelizmente, não foi possível de ser medido experimentalmente devido à formação rápida de precipitado.

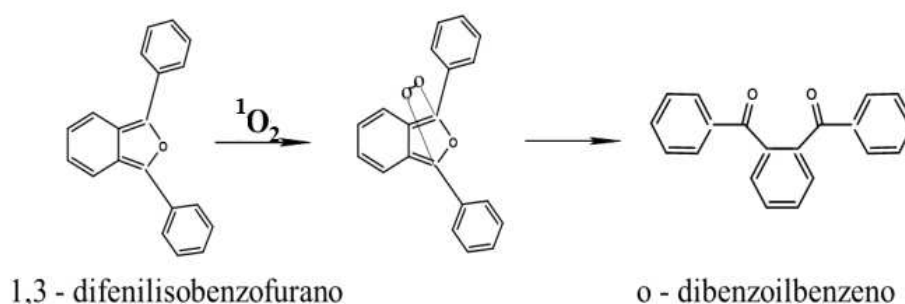
Esse comportamento global é bastante interessante e reforça a promissora aplicação desses compostos em meio fisiológico, uma vez que glutathione é encontrada em altas concentrações e também promoveriam a liberação de NO(HNO) em conjunto com a geração de superóxido (SILVA *et al.*, 2011). Importante mencionar que o mesmo experimento foi realizado com o complexo **PR** na presença de NBT (Apêndice M), não sendo observado nenhuma mudança espectral, assim como a realização do experimento apenas com GSH e NBT, que não mostrou nenhuma alteração, o que reforça a necessidade de GSH para que a reação ocorra. Esses resultados sugerem que há a necessidade do NO coordenado para que a reação ocorra.

4.6 Estudo de geração de oxigênio singleto

O estudo de geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) foi realizado empregando a sonda seletiva 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), a qual foi monitorada por fluorescência. O consumo de DPBF é quantificado pela diminuição da intensidade da sua banda de fluorescência no máximo de emissão, devido à sua reação de oxidação com $^1\text{O}_2$, podendo ser expresso como

uma função do rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Φ_{Δ})(DING *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2016). A figura 32 ilustra a equação química que representa a reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singleto.

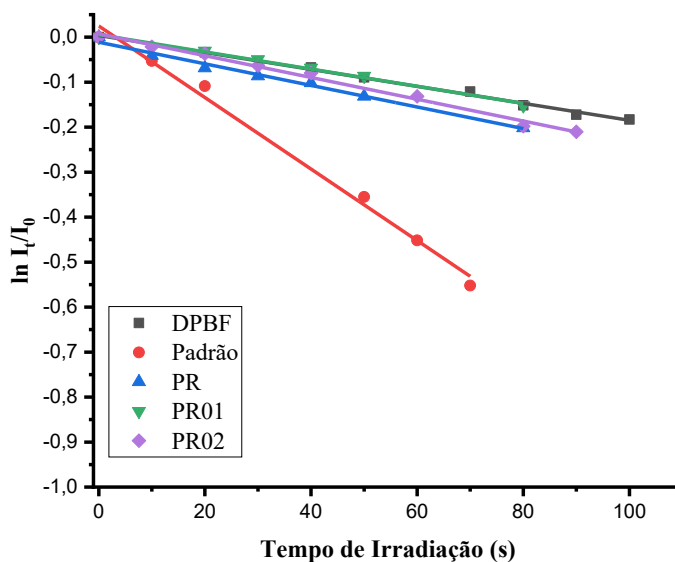
Figura 32. Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singleto.



Fonte: A autora.

Os espectros de emissão do DPBF, na ausência e presença dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02** na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e do $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Padrão: fotogerador de ${}^1\text{O}_2$), que foram irradiados com LED azul, são apresentados no apêndice Q. Os valores de Φ_{Δ} foram calculados usando a inclinação da reta obtida da regressão linear de $\ln(I_t/I_0)$ vs tempo, mostrado na figura 33, que representa a constante cinética observada e ao serem aplicadas na equação 2 originam esses rendimentos quânticos. O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ foi usado como composto padrão para irradiação no azul, cujo valor de rendimento quântico em etanol é de $\Phi_{\Delta} = 0,84$ (DEROSA *et al.*, 2002; TANIELIAN *et al.*, 1996).

Figura 33. Curvas cinéticas do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul).



Fonte: A autora.

As tentativas de medição de rendimento quântico de produção de oxigênio singlete indicaram (Tabela 8) valores bem discretos, ainda que um pouco maiores para os complexos **PR** e **PR02**. Para o complexo **PR01** o rendimento quântico obtido foi similar ao decréscimo do sinal do próprio DPBF, indicando que não deve ocorrer geração de oxigênio singlete por esse complexo. Esses valores observados são esperados para os complexos que possuem ligantes NO_2^- e NO , como já descrito na literatura para outros complexos, uma vez que outras rotas de desativação estão concorrendo (PEREIRA, 2013). Nesses casos observou-se rendimento quântico reduzido ou mesmo inexistentes, em estudos sob condições similares e na presença de oxigênio (DELEO *et al.*, 2000).

Tabela 8. Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02**.

COMPLEXOS	Φ_{Δ} (AZUL)
PR	0,0735
PR01	0,0028
PR02	0,0707
trans-[RuCl(anenN ₄)NO] ²⁺ (PEREIRA, 2013)	0,0600
[Ru(cyclam)(NO)Cl] ²⁺ (PEREIRA, 2013)	0,1600

DPBF: Φ_{Δ} (AZUL): 0,00189

Fonte: A autora.

Os complexos estudados apresentaram baixo ou nenhum rendimento quântico, no entanto foram irradiados com LED azul (458 nm). Alguns estudos mostraram que o rendimento quântico de certos complexos podem ser melhorados sob irradiação de luz em menores comprimentos de onda $\lambda_{\text{irradiação}} = 355 \text{ nm}$ (RAMOS *et al.*, 2018). Como os complexos estudados nesse trabalho também apresentam bandas de transição eletrônica em menores comprimentos de onda não seria inesperado que ao usar luz mais energética melhorasse o rendimento quântico.

Estudos desenvolvidos com o complexo [Ru(NO)(ONO)(pc)] demonstram o efeito sinérgico do NO e oxigênio singlete produzido pela fotossensibilização do complexo. No entanto, devido às bandas apresentadas por esse complexo, a irradiação de luz foi realizada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 660 nm. Esse complexo apresentou efeitos consideravelmente

benéficos em termos de viabilidade celular melhorando ainda mais o potencial fotocitotóxica do compostos (CARNEIRO *et al.*, 2011). Esses dados mostram que a combinação da liberação do NO e oxigênio singlete mediada pela irradiação do complexo, podem tornar o complexo **PR02** promissor para estudos biológicos.

4.7 Estudos de interação e danos ao DNA

4.7.1 Medição da Constante de Associação (K_b) ao DNA

A intensidade da interação entre os complexos de rutênio e o DNA de timo de bezerro (*calf thymus*, CT DNA) vem sendo determinada, tal como nesse trabalho, por titulação espectrofotométrica (MAHADEVAN *et al.*, 1997). Foram realizadas adições sucessivas de DNA numa amostra contendo o complexo metálico e analisadas suas mudanças espectrais. Com a finalidade de calcular a constante intrínseca de associação ao DNA, K_b , utilizou-se a equação 3 para o tratamento dos dados (ver seção experimental). Os valores calculados para os K_b dos complexos metálicos, assim como de complexos que apresentam estruturas similares, encontram-se na tabela 9. Esses valores estão de acordo com dados da literatura para outros metalocompostos intercaladores semelhantes (BURYA *et al.*, 2011). Importante mencionar que houve uma melhora expressiva de interação dos complexos metálicos finais ao DNA em relação ao complexo precursor **PR**.

Esse comportamento pode nos levar a esperar melhores atividades biológicas, em particular maior citotoxicidade. Adicionalmente, é importante mencionar que os complexos metálicos têm cargas bastante distintas (**PR** neutro, **PR01** negativo, **PR02** positivo), mas **PR01** e **PR02** em tampão devem se encontrar em equilíbrio, assim não foi observado expressivas diferenças entre eles, como se poderia antecipar. Os valores de constante de associação ao DNA, K_b , obtidos para os complexos metálicos na ordem de 10^4 - 10^5 , são comparáveis com alguns observados em outros sistemas com interações não covalentes e aparentemente superior ao de interações puramente eletrostáticas, esses últimos comumente na ordem de 10^3 (SILVA, H. V. R. *et al.*, 2018).

Estudo mostraram que a substituição de uma bipyridina do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ por dois ligantes menores e altamente polares (NO^+ e SO_3^{2-}) pode ter influenciado nos efeitos estéricos (reduzido) e permitido interações mais específicas com a estrutura do DNA (MARTINS *et al.*, 2023). Outros complexos metálicos análogos de bipyridina de rutênio contendo um ou duas posições lábeis demonstraram se ligar ao DNA através de interação

covalente (DE SOUSA *et al.*, 2020; GARNER *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2004). Além disso, a modificação covalente do DNA também foi relatada anteriormente para os dois complexos metálicos de rutênio icônicos: NAMI-A e KP1019 (MALINA *et al.*, 2001).

Tabela 9. Constante de ligação ao DNA (K_b) para diferentes complexos metálicos de rutênio.

COMPLEXOS	K_b
[Ru(bpy)(dppz)Cl ₂] - PR	$6,92 \times 10^4$
Na[Ru(bpy)(dppz)SO ₃ (NO ₂)] - PR01	$1,25 \times 10^5$
[Ru(bpy)(dppz)SO ₃ (NO)] ⁺ - PR02	$1,29 \times 10^5$
(<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(NO)] ⁺)(MARTINS <i>et al.</i> , 2023)	$0,79 \times 10^4$
[Ru(bpy) ₂ (dppz)] ²⁺ (BURYA <i>et al.</i> , 2011)	$3,20 \times 10^6$
[Ru(phen)(dppz) ₂] ²⁺ (AMBROISE <i>et al.</i> , 2000)	$2,10 \times 10^6$
[Ru(bpy) ₃] ²⁺ (PERDISATT <i>et al.</i> , 2018)	$9,00 \times 10^4$

Fonte: A autora.

4.7.2 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) foi empregado para fornecer mais informações sobre a interação dos complexos metálicos com o DNA. Evidências experimentais *in vitro*, obtidas por dicroísmo circular sugerem que o principal modo de interação entre DNA de fita dupla (dsDNA) e complexos metálicos catiônico, que possuem ligantes aromáticos planares é através da intercalação. Por outro lado, os DNAs do tipo G-quadruplex (G4), como HTG-21 e o DNA C-myc, com cadeias de forte interação com um núcleo catiônico interno, como o K⁺ e Na⁺, tem menor tendência a sofrer intercalação, sendo as interações de empilhamento e ligações por sulcos dominantes (ANG *et al.*, 2020).

A espectroscopia CD pode ser usada para caracterizar a topologia dos G4, uma vez que esses apresentam diferentes estruturas espaciais originando característicos espectros de CD. Pelo menos duas estruturas de cadeia simples típicas são descritas chamadas de paralelo e antiparalelo. O espectro da estrutura G4 antiparalela tem uma banda positiva com pico em 290-295 nm e uma banda negativa mais fraca em 260-265, enquanto a de conformação paralela tem

uma banda positiva em 260-265 nm e uma banda negativa em 240-245 nm (CARVALHO *et al.*, 2017; PARAMASIVAN *et al.*, 2007).

O espectro CD do DNA de salmão consiste em uma banda positiva em 275 nm por causa do empilhamento de base e uma banda negativa em 245 nm devido à helicidade do DNA, que é característica do DNA na forma B (BEHERA *et al.*, 2023). Em relação ao G4 tipo HTG-21 encontramos uma banda positiva em 213 nm e uma banda positiva mais intensa em aproximadamente 260 nm, além de outra banda negativa em 234 nm, todos indicativos de formação de quadruplex paralelo. Adicionalmente, o G4 C-myc apresenta uma banda intensa entre 250-300 nm apresentando um máximo em 265 nm e uma banda negativa entre 200-250 nm, consistente com a formação de uma estrutura paralela (CARVALHO *et al.*, 2017; MI *et al.*, 2019). Quando os sítios de interação de empilhamento são preenchidos ocorre uma interação adicional através da ligação por sulco, alongando assim a estrutura do G4 DNA, resultando em perda de atividade ótica e redução da magnitude ou deslocamento da banda (ANG *et al.*, 2020; JANGIR *et al.*, 2012).

Seguindo a adição dos complexos metálicos **PR**, **PR01** e **PR02** ao DNA duplex, notamos mudanças expressivas no sinal de CD, indicando sua interação com as macromoléculas estudadas. Importante mencionar que os três complexos metálicos não apresentaram sinais no espectro de CD, sugerindo se tratar de uma mistura racêmica, considerando que deveriam dispor de isomerismo ótico. Todos os complexos usados nesse estudo indicaram alteração na conformação do DNA duplex, consistente com sua interação. Os complexos **PR** e **PR01** provocaram alterações mais significativas no DNA de salmão (figura 34), ainda que os valores de Kb medidos por espectroscopia eletrônica estejam próximos para todos os compostos. Esse comportamento pode ser decorrente de modos e/ou regiões de interação distintos do DNA, ainda mais que há diferenças de carga e polaridades.

Em relação ao complexo **PR01** (figura 34) o dicroísmo circular apresentou interação e mudança na conformação do DNA duplex assim como G-quadruplex HTG-21 e C-myc DNA utilizado nesse estudo. O comportamento observado em relação a interação desse complexo com ambos os G4 DNA, ocorrendo mudança conformacional mostrando a interação do complexo com tais estruturas essas alterações são indicativas que ocorreu possível interação com o DNA, pois ocorreu alteração dos sinais e redução da atividade optica do DNA, principalmente o DNA de salmão e o HTG-21.

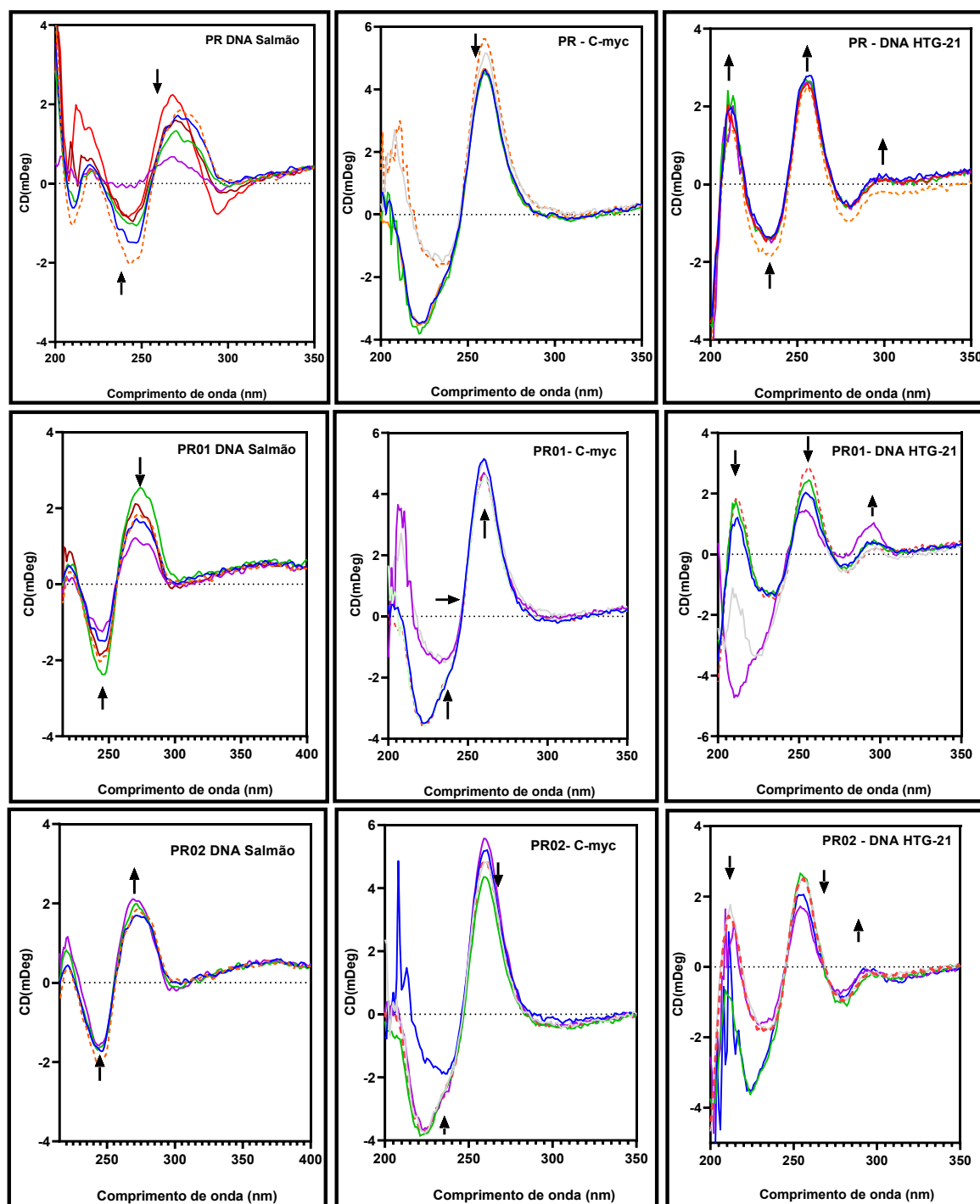
O complexo **PR02** (figura 34) mostrou interação com o dsDNA, indicando mudança na conformação do DNA devido ao possível surgimento da forma B, e empilhamento

das bases do DNA por causa da helicidade. Em relação ao DNA G-quadruplex HTG-21, conforme aumento da concentração do complexo, observou-se redução da banda em aproximadamente 260 nm que se trata de um forte indicativo que está ocorrendo alteração geral da estrutura quadruplex paralela. Essa diminuição em ambas as bandas do CD em concentração crescente, pode ser devido a indução da mudança na conformação do DNA para a forma quadruplex paralela.

Esse resultado está em conformidade com estudo realizados com os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ e [Ru(bpy)₂(SO₃)(H₂O)], quando se observou alteração na conformação do DNA duplex promovida por esses complexos, ao mostrar alteração e deslocamento nos sinais da banda positiva em 275 nm e da banda negativa em 245 nm de acordo com o aumento da concentração (MARTINS *et al.*, 2023), cujas estruturas são bastante semelhantes. Entretanto, esses complexos se diferenciam particularmente com respeito à presença do ligante bipyridina ao invés do dppz, esse último já bem descrito por favorecer interações ao DNA (LI *et al.*, 2016).

Estudos mostraram que o complexo de rutênio [Ru(TAP)₂(11-CN-dppz)]²⁺ (TAP=1,4,5,8-tetraazafenantreno, dppz=dipiridofenazina) incubado com DNA G-quadruplex paralelo d(TAGGGTTA) em concentrações na proporção 4:1 (Complexo:DNA) resultou na alteração da conformação do DNA, adotando uma topologia paralela e o aparecimento de um ombro em aproximadamente 300 nm, o que foi observado em todos os complexos analisados nesse estudo em relação ao G4 - HTG-21 (ANG *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2017; MCQUAID *et al.*, 2019).

Figura 34. Dicroísmo circular com DNA de salmão ($350 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de bases), DNA G4 C-myc ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base) e DNA G4 HTG-21 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base) com os complexos **PR**, **PR01** e **PR02**, que foram adicionados até a concentração máxima de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: A autora.

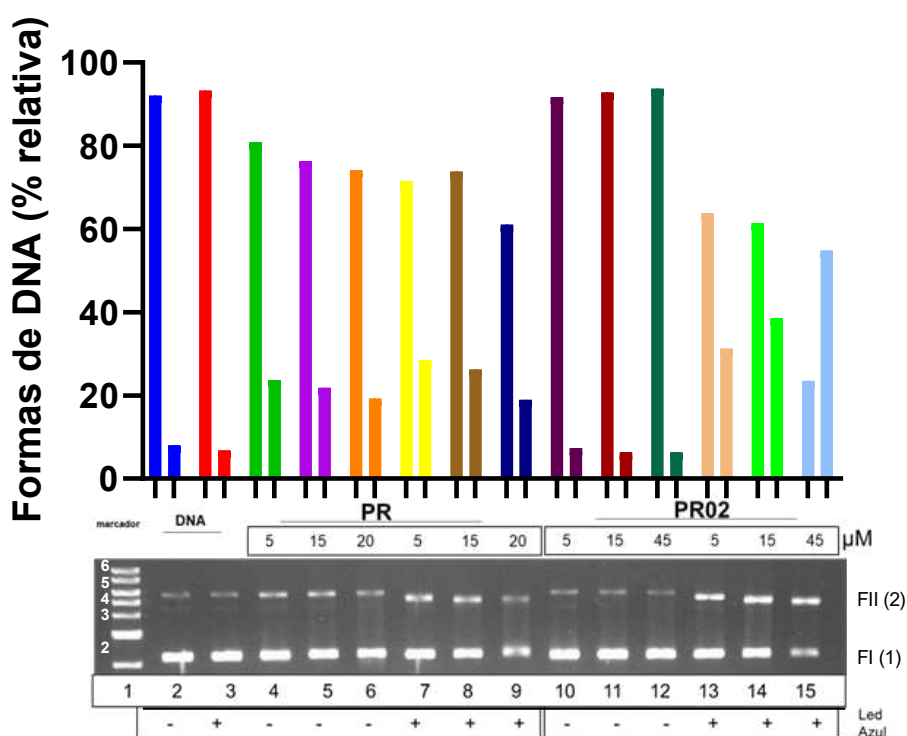
4.7.3 Eletroforese em gel de agarose

4.7.3.1 Investigação da interação e clivagem de DNA na ausência e presença de Luz

A eletroforese em gel de agarose do DNA circular pBR322 foi realizada com a finalidade de investigar a possível degradação dessa amostra através da sua interação com o complexo metálico, e sujeito também a estímulos como irradiação com luz azul (LED, $\lambda_{\text{max}} = 458 \text{ nm}$). O DNA plasmidial pode se apresentar de três formas distintas: forma I, forma II e forma III. A forma I se refere à forma superenovelada e intacta com respeito as suas duas fitas, as quais quando rompidas em uma das fitas é denominada circular aberta ou relaxada (forma II), e quando rompida nas duas fitas origina a fita linear (forma III). Nesse estudo foram empregados os controles negativos desse DNA sem e com irradiação de luz no mesmo tempo de incubação e na ausência dos complexos metálicos, poço 2 (figura 35).

Com o interesse de avaliar a influência da concentração dos complexos na interação e possíveis danos ao DNA no escuro e sob irradiação foi realizado o experimento de eletroforese (figura 35), que mostra os efeitos gerados por esses complexos nessas condições. Esse estudo foi realizado para todos os compostos, sendo apresentado no Apêndice O a eletroforese do complexo **PR01** nas mesmas condições utilizadas na eletroforese seguinte, observou-se a interação/clivagem do DNA promovida pelos complexos irradiados a partir da concentração $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Estudo adicional foi realizado com os complexos **PR** e **PR02** irradiados com led verde (520 nm) e led vermelho (693 nm) (apêndices P e Q), apenas o complexo **PR** mostrou interação/clivagem do complexo com o DNA, nos comprimentos de onda utilizados nas concentrações a partir da concentração $5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 35. Ensaio de fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de bases) na presença dos complexos **PR** e **PR02** em tampão Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,4 diferentes concentrações no escuro e após 120 min de irradiação usando LED azul. Poços 1: DNA marcador (fitas linearizadas), Poço 2: Apenas DNA pBR322 escuro e Poço 3: Apenas DNA pBR322 irradiado; Poços 4 - 15: Complexos + DNA pBR322 nas concentrações de 5, 15, 20 e $45 \mu\text{mol L}^{-1}$. O gráfico de quantificação mostra na mesma cor a forma I e II, apresentadas de forma seguidas.



Legenda: (-) sem irradiação; (+) irradiação com LED azul – 120 min.

Fonte: A autora.

Os complexos no escuro não apresentaram interação ou clivagem expressiva com o DNA, ainda que haja interação moderada com o DNA como medido pelo K_b (tabela 9). Interações não covalentes com o DNA podem alterar inclusive o perfil migratório em gel de agarose, o que já foi observado em outros sistemas análogos, entretanto não com esses compostos. Outros tipos de interação não covalente não necessariamente são capazes de alterar de maneira expressiva as migrações, portanto, os resultados obtidos dão indícios de que não haja interações covalentes. O ensaio mostrou que, nas concentrações utilizadas, há necessidade de aplicação de irradiação luminosa para que seja possível observar interação/clivagem do DNA

(SILVA, H. V. R. *et al.*, 2018). Esse comportamento torna esses compostos promissores para os estudos de fotoclivagem, já que mostraram alteração na mobilidade ou interação com o DNA após irradiação. Convém mencionar que foi possível observar uma tendência de aumento de clivagem do DNA com aumento da concentração nos complexos sob irradiação luminosa, com o surgimento da fita II

O complexo **PR**, na concentração $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, já mostrou a formação da forma FII, indicando que há modificação do DNA mesmo em baixa concentração, mostrando possível degradação do DNA. Isso ocorre provavelmente devido ao efeito de interação do complexo já que é possível observar a modificação da migração da FII do DNA nessa concentração, provavelmente provocado pelo efeito do dppz auxiliando sua interação com o DNA, indicando a possível formação do aduto covalente com o DNA (FRIEDMAN *et al.*, 1990). Diversos estudos mostraram a expressiva interação de complexos metálicos contendo dppz com várias formas de DNA, assim como o DNA dupla hélice tipo B (Friedman et al., 1990)(ABREU *et al.*, 2017).

Esse resultado mostra a diferença na interação do complexo devido a mudança no ligante, contudo para complexos que possuem o ligante nitrosil, observa-se que a interação do complexo com o DNA ocorre devido a liberação do ligante e posterior interação com o DNA, como foi observada no complexo similar *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺(MARTINS *et al.*, 2023). Outra característica observada no complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ é a necessidade de usar concentrações elevadas, chegando ao máximo de $240 \mu\text{mol L}^{-1}$. Contudo, o complexo **PR** na concentração $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, mostrou a importante influência do intercalante dppz na interação do complexo com o DNA, potencializando seus efeitos de interação/clivagem.

Em relação ao complexo **PR02** foi possível observar que sem irradiação não ocorreu clivagem do DNA mesmo incubando por 120 min. No entanto, sob irradiação de luz azul foi observado clivagem, consistente também com o concomitante ao aumento da concentração do composto. Trata-se de um comportamento interessante para sua utilização nos estudos de fotoclivagem de DNA, já que o efeito de interação/clivagem só foi observado após irradiação luminosa. A forma II do DNA foi evidenciada na concentração de $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo, e mesmo na concentração mais reduzida ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), já se observa a mudança da mobilidade e formação inicial da forma II, indicando possivelmente interações que podem ser através de ligações covalente entre o complexo e as bases nitrogenadas ou grupo fosfato do DNA, ou por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas do complexo-DNA (WENDE *et al.*, 2014).

Comparando esse sistema aos complexos metálicos similares em que ao invés do dppz se tem bpy, observa-se a necessidade de concentração mais elevada do composto para que surja qualquer efeito no DNA, certamente também devido a sua menor afinidade (MARTINS *et al.*, 2023). Além do ligante dppz, presente nos compostos investigados, o complexo **PR02** dispõe do ligante nitrosil, com perfil de ser fotoliberado já descrito em sistemas similares. Esse ligante ao ser liberado pode permitir a interação do complexo (na forma de aquo) com o DNA, tornando-os promissores agentes para aplicação em fototerapia (CRESPY *et al.*, 2010).

Ainda de acordo com os valores de constante de ligação obtidos, na ordem de 10^4 para o complexo **PR** e 10^5 para o complexo **PR02**, isso pode evidenciar que a substituição dos ligantes cloretos do complexo promoveu uma melhora na interação do complexo-DNA. Contudo mesmo apresentando interação moderada com o DNA, essa degradação tem a capacidade de danificar e quebrar a fita, podendo ser através do processo oxidativo ou hidrolítico (DA SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017), frente ao complexo **PR**. Isso mostraria que o complexo **PR02** possui capacidade de forte interação e clivagem do DNA apenas após irradiação luminosa. É possível que a saída do NO desse complexo proporcione atividade clivadora do DNA e eventualmente induza sua ligação não-covalente (CARVALHO, 2015).

4.7.3.2 Estudo com supressores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

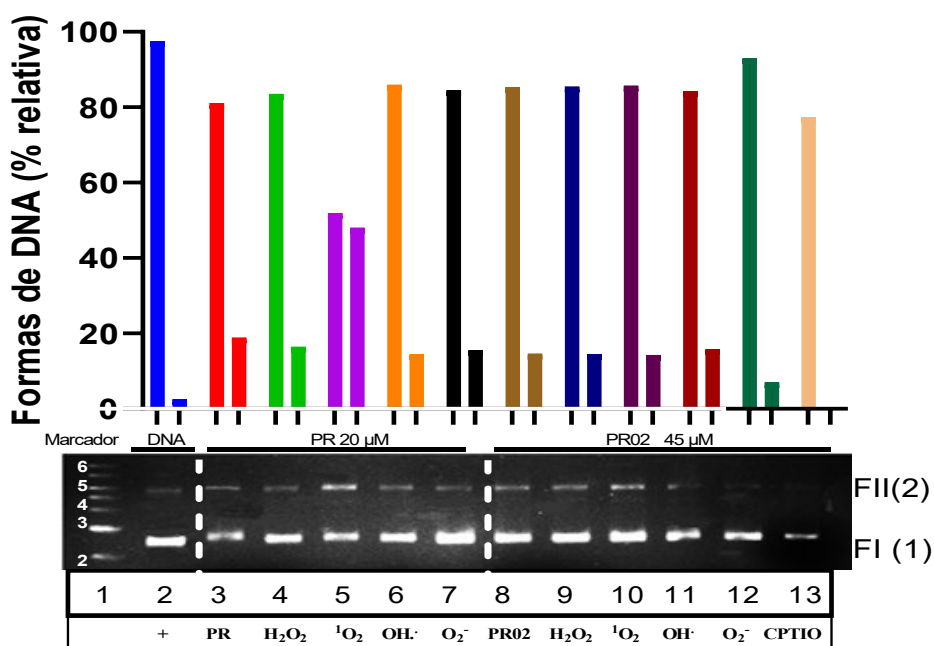
Com a finalidade de investigar os possíveis mecanismos de fotoclivagem do DNA promovida pelos complexos foi realizado um estudo com inibidores de espécies reativas. A clivagem de DNA pode ocorrer por dois mecanismos distintos: hidrolítico ou oxidativo. O mecanismo hidrolítico ocorre devido ao ataque de uma molécula de água ao fosfato ligado a pentose do ácido nucléico, formando um intermediário fosfato pentacoordenado, o que provocará a ruptura da ligação fosfodiéster P- O- 5' ou P- O- 3', dependendo do mecanismo desenvolvido pela nuclease sintética (BELOUSOFF *et al.*, 2008).

No caso do mecanismo oxidativo, este ocorre devido a produção de espécies reativas a partir de uma reação de oxi-redução entre o metal e a espécie reativa de oxigênio, como exemplo, a produção de oxigênio singleto que atacam preferencialmente a desoxirribose do DNA (TAN *et al.*, 2009) ou as bases nitrogenadas. Esse mecanismo oxidativo possivelmente é que ocasionou a clivagem do DNA nos dois complexos estudados, **PR** e **PR02**. Os inibidores dessas espécies reativas foram empregados na concentração de 50 mmol L^{-1} juntamente com $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo **PR** ou $45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo **PR02**. Esses sistemas foram

irradiados com LED azul por 120 min, com o objetivo de identificar possíveis espécies reativas fotogeradas que ocasionariam a clivagem do DNA, sendo suprimidas seletivamente.

Na Figura 36 pode-se observar o efeito provocado pela adição desses supressores no perfil de clivagem do DNA. Para o complexo **PR** foi utilizado um controle positivo sem adição desses supressores. Conforme relatado em experimento anterior nessa faixa de concentração ocorre clivagem do DNA fotoinduzida pelo complexo **PR**, o que gerou o início da conversão a fita II.

Figura 36. Ensaio de fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **PR** e **PR02** após 120 min de irradiação usando LED azul e adição de supressores de radicais. Poços 1: DNA marcador (fitas linearizadas), Poço 2: Apenas DNA pBR322 irradiado; Poço 3: Complexo **PR** irradiado; Poços 4 - 7: Complexo **PR** + DNA pBR322 na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adição dos supressores piruvato, histidina, manitol e TIRON, respectivamente; Poço 8: Complexo **PR02** irradiado; Poços 9 - 13: Complexo **PR02** + DNA pBR322 na concentração de $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adição dos supressores piruvato, histidina, manitol e TIRON, respectivamente.



Fonte: A autora.

Em relação ao complexo **PR**, o controle positivo foi pouco clivado, mas ainda assim não foi observado efeitos inibitórios significativos provocados pelos supressores. O poço em que se observou perfil anômalo em que houve um aumento de clivagem foi com a histidina,

que é supressora de oxigênio singlete. Esse resultado indica que a clivagem pode ser ocasionada por outro mecanismo, ou que haja a possibilidade de formar complexos com a histidina coordenada e seu perfil de reação seja distinto do complexo **PR**, não servindo como supressora seletiva. A ausência de um perfil de supressão de clivagem oxidativo poderia sugerir que não seja uma rota oxidativa, mas eventualmente pelo mecanismo hidrolítico. Nesse caso, ele ocorre devido ao ataque de uma molécula de água, que faz parte da estrutura do complexo, ao fosfato ligado a pentose do ácido nucleico, formando um intermediário fosfato pentacoordenado, o que provocará a ruptura da ligação fosfodiéster P- O- 5' ou P- O- 3', dependendo do mecanismo desenvolvido pela nuclease sintética (BELOUSOFF *et al.*, 2008).

Estudos similares foram realizados com o complexo **PR02**, para esse complexo observou-se que dois supressores aparentemente inibiram a clivagem do DNA. Um deles se trata do Tiron, que é um sequestrador de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que inibiu a formação da FII, indicando que seja um possível mecanismo de clivagem do DNA.

Enquanto isso, o outro inibidor que se mostrou eficiente foi o cPTIO, que é utilizado para a supressão/detecção de NO/HNO. Esse supressor mostrou que a clivagem do DNA possivelmente ocorre devido a liberação do NO após irradiação do complexo, porém também pode estar ocorrendo devido a supressão por ligação ao complexo.

Os demais supressores, como piruvato, que provoca o desproporcionamento do H_2O_2 , a histidina que é supressor de oxigênio singlete, e o manitol, como inibidor da formação de radicais hidroxila, esses supressores não inibiram a formação desses radicais. Esse perfil pode ser justificado possivelmente pela ausência de formação de radicais, que não funcionaria como competidor para sua interação com o DNA. A diferença observada diante da adição de supressores sugere que o ligante NO ao ser liberado por fotoindução promova um tipo de ligação ou interação diferente do complexo **PR02** remanescente, da que é promovida pelo complexo **PR**, sendo possivelmente responsável pela diferença observada na clivagem do DNA.

A fotogeração de mais de uma espécie reativa não é incomum e decorre de várias rotas de desativação fotoquímicas disponíveis, sendo que algumas espécies podem gerar oxigênio singlete e radical hidroxila. O NO também pode ser liberado nesses processos, e sua associação a outras espécies fotogeradoras podem conduzir a formação de espécies oxidantes, tais como peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$), formado a partir da reação do NO com o $O_2^{\bullet-}$ (RADI, 2000). Esses estudos corroboram com ensaios realizados com o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺,

que mostrou a possível influência do ligante NO no efeito de interação/clivagem do DNA (MARTINS *et al.*, 2023).

4.7.3.3 Estudo com adição de peróxido de hidrogênio

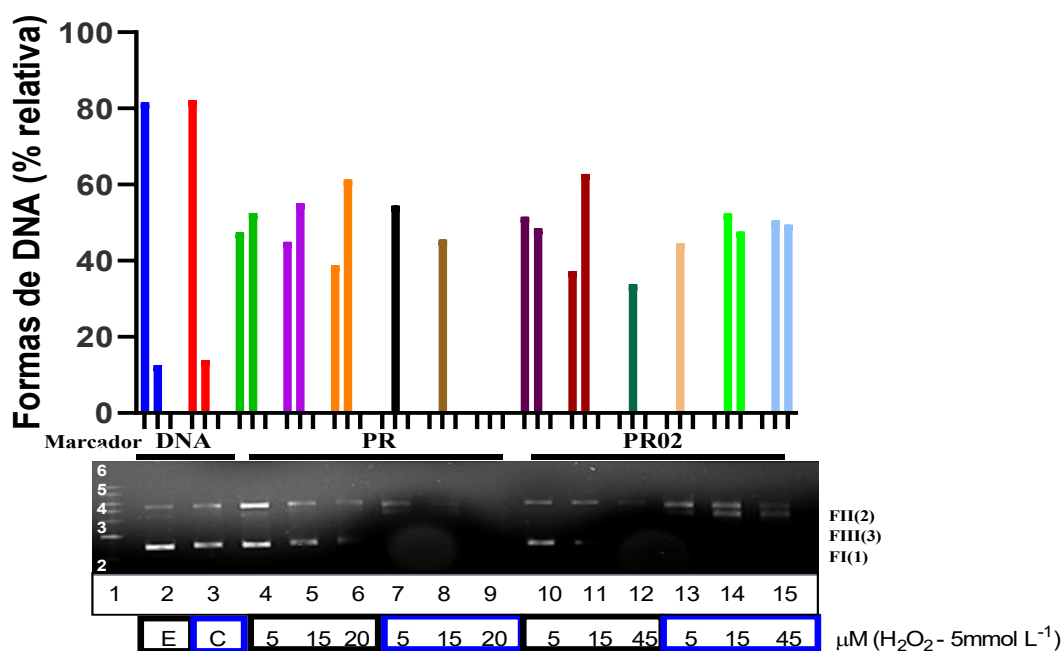
Com o intuito de investigar outras formas de indução à clivagem do DNA foi realizado um estudo sobre o possível dano ao DNA utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença dos complexos metálicos **PR** e **PR02**.

Além da luz, outros agentes biologicamente relevantes como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) poderiam promover clivagem de DNA através da geração induzida de radicais livres (CAULFIELD, 1991). O peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição podem induzir a formação do radical $OH^\bullet$, sendo que o H_2O_2 atuará como agente oxidante e redutor mudando o estado de oxidação do metal de forma catalítica (METZLER-NOLTE *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 1990).

Desta forma, avaliou-se o efeito que o peróxido de hidrogênio apresentaria em conjunto com os complexos **PR** e **PR02** (Figura 37), sem e com irradiação de luz azul por 120 min, com a finalidade de comparar também o efeito em conjunto, eventualmente potencializando a clivagem do DNA. Ao analisarmos as imagens dos géis, verificou-se a marcante influência do H_2O_2 e a dependência da concentração dos complexos **PR** e **PR02** que leva a expressiva diminuição da fita I e o consequente aumento referente à formação da fita II e, inclusive, de fita III.

Esses resultados confirmam que ocorreu clivagem do DNA influenciado pela adição do H_2O_2 na ausência de luz, o que foi potencializado com a irradiação de luz, sugerindo que possivelmente ocorreu, após liberação dos ligantes originais, a formação de radicais que promoveram a clivagem do DNA, conforme estudos realizados em outros sistemas (URSO *et al.*, 2003). Nota-se que somente o peróxido de hidrogênio é incapaz de promover o mesmo efeito, conforme indicado pela amostra controle.

Figura 37. Ensaio de fotoclivagem do DNA pBR322 ($20\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **PR** e **PR02** nas concentrações de 5, 15, 20 e $45\mu\text{mol L}^{-1}$ após 120 min de irradiação usando LED azul e adição de 5 mmol L^{-1} peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Poços 1: DNA marcador (ladder), Poço 2 e 3: Apenas DNA pBR322 escuro + H_2O_2 e irradiado + H_2O_2 , respectivamente. Poços 4 - 6: Complexos **PR** + DNA pBR322 e adição de H_2O_2 sem irradiação; Poços 7 - 9: Complexos **PR** + DNA pBR322 e adição de H_2O_2 irradiado; Poços 10 - 12: Complexos **PR02** + DNA e adição de H_2O_2 sem irradiação; Poços 13 - 15: Complexos **PR02** + DNA pBR322 e adição de H_2O_2 irradiado.



Legenda: Variação de concentração dos complexos 5, 15, 20 e $45\mu\text{mol L}^{-1}$, contorno preto sem irradiação e contorno azul irradiado com LED azul

Fonte: A autora.

Uma análise mais cuidadosa mostra que o complexo **PR** provocou efeito um pouco mais pronunciado que o **PR02**, sendo possível observar a total degradação do DNA, particularmente quando essa amostra foi irradiada com luz azul. Nesse caso não foi possível observar nenhuma das formas de DNA nas concentrações mais elevadas do complexo metálico **PR**. Em relação ao complexo **PR02** observou-se o surgimento da fita totalmente linear (FIII) nas concentrações $15\mu\text{mol L}^{-1}$ e $45\mu\text{mol L}^{-1}$, somente quando irradiado com luz. Essa fita III foi validada como linear pelo marcador linear de DNA, sendo consistente com o tamanho do plasmídeo linearizado (4,4 kb), apresentando-se correndo entre 4 kb e 5 kb do marcador linear (Figura 34(YAO *et al.*, 2008)).

Esses resultados são bastante animadores, considerando que peróxido de hidrogênio seja gerado biologicamente, em particular durante um processo de defesa celular, sugerindo que tais compostos possam auxiliar na eliminação de células ou agentes infecciosos via dano ao DNA.

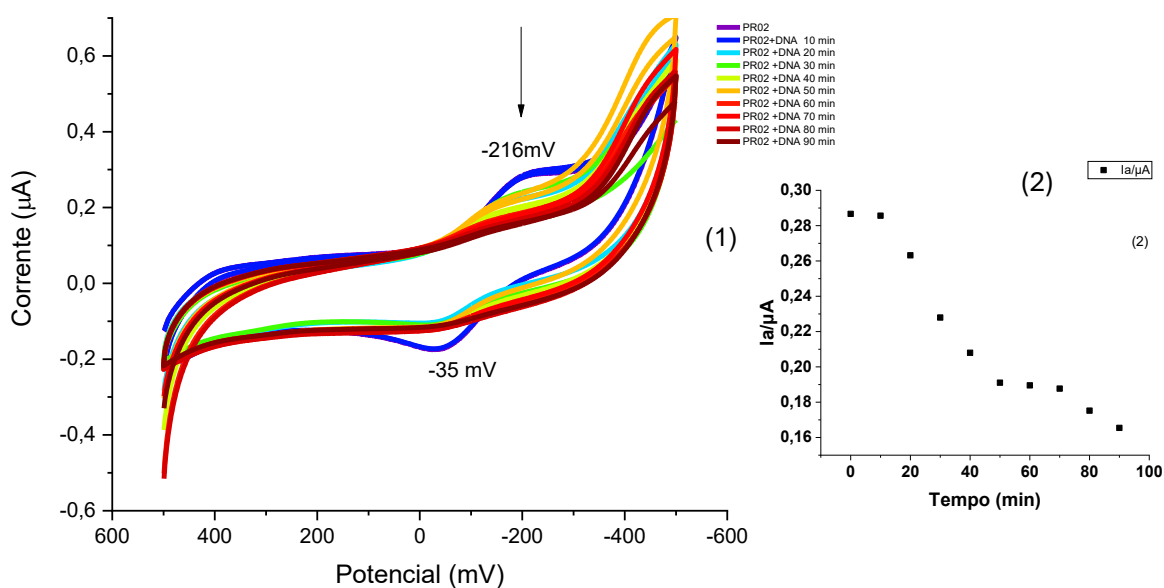
4.7.4 Estudos de interação com DNA por eletroquímica

Nos últimos anos, observou-se um crescente interesse na investigação eletroquímica da interação entre drogas anticancerígenas e DNA. Uma das aplicações práticas das medidas eletroquímica se dá na determinação de processos redox na superfície dos eletrodos. Devido à semelhança existente entre as reações eletroquímicas e biológicas, pode-se supor que os mecanismos de oxidação que ocorrem no eletrodo e no organismo vivo compartilhem princípios semelhantes (KALCHER *et al.*, 1995); SÜZEN *et al.* (2003).

Estudos usando medidas eletroquímicas são usados para analisar a interação de complexos metálicos com DNA, essas interações podem fornecer um interessante complemento aos métodos espectroscópicos, enquanto mesmo espécies espectroscopicamente inativas poderiam fornecer informações sobre o mecanismo de interação e a formação de adutos droga-DNA(YAO *et al.*, 2008) (ERB *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 1996).

Com a finalidade de reforçar os estudos bioquímicos, foram realizados ensaios usando a técnica de voltametria cíclica e DP (pulso diferencial) com o objetivo de analisar a interação do complexo **PR02** com o DNA (figura 38).

Figura 38. Voltamograma cíclico do complexo **PR02** ($100\mu\text{mol L}^{-1}$) obtido em tampão fosfato (PBS) $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, na presença de DNA (1 mmol L^{-1} em pares de base, salmão) e irradiado com luz azul durante 90 min (1), e gráfico de corrente de pico versus tempo (2), com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.



Fonte: A autora.

O estudo realizado mostrou a alteração no sinal de corrente do voltamograma cíclico, que inicialmente apresentou o potencial de $E_{1/2}$: $-125,5\text{ mV}$, quando o DNA foi adicionado. Observou-se o deslocamento do potencial e redução da corrente do complexo que já mostra o indício de interação do complexo com o DNA. Estudos realizados com o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ mostraram a influência da concentração do DNA na interação do complexo, indicando que ocorreu maior saturação de sítios de acordo com a concentração de DNA (YAO *et al.*, 2008), o complexo estudado possui nitrogênios livres, assim como o complexo **PR02** estudado neste trabalho. Esses nitrogênios livres localizados no ligante dppz podem influenciar na interação do DNA ao complexo, provocando o deslocamento do potencial, conforme alteração observada nesse estudo.

De acordo com o estudo de Yao *et al.*, o íon complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ em solução tampão adere inicialmente à superfície do eletrodo, em seguida o DNA se liga ao complexo através de interação eletrostática e ligações de hidrogênio intermolecular ou pela interação conjugada. Então, as moléculas de DNA ao se ligarem ao complexo

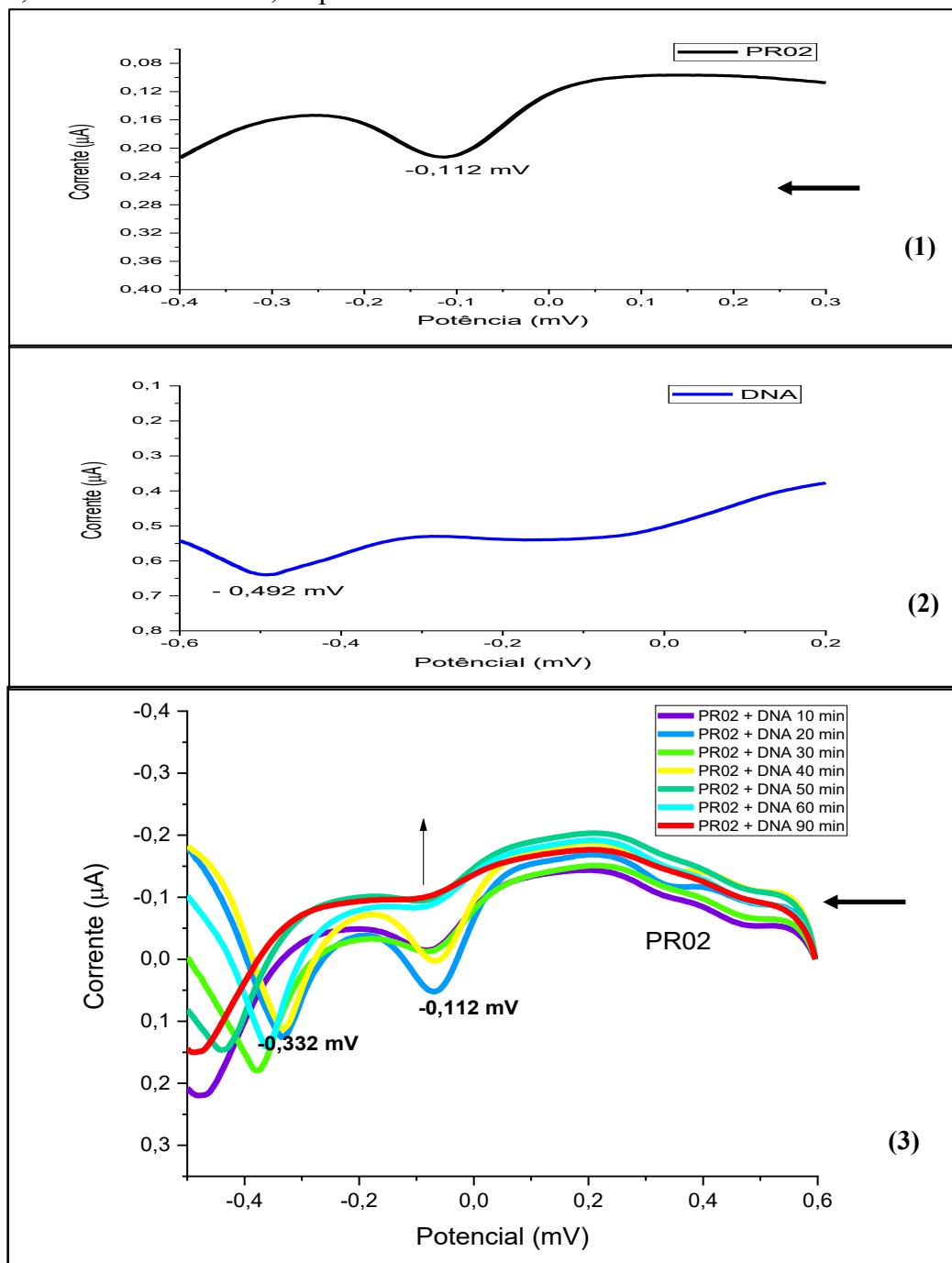
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ mostrará a interação através das alterações nos processos eletroquímicos (YAO *et al.*, 2008).

Durante esse experimento esse complexo foi irradiado (figura 38) com a finalidade de potencializar a sua possível interação covalente com o DNA, assim como foi realizado anteriormente em outros estudos biológicos que evidenciaram a influência e melhoria da interação do complexo com o DNA, já que a irradiação promove a liberação do ligante nitrosil, que pode influenciar na interação do complexo com o DNA (MARTINS *et al.*, 2023).

Ensaaios realizados mostraram que a redução da corrente de pico dos processos de oxidação-redução e deslocamento no sinal do voltamograma para valores positivos, deslocamento anódico, indicam intercalação do complexo com o DNA, porém mudanças para valores negativos, deslocamento catódico, indicam interação eletrostática (RAMOTOWSKA *et al.*, 2021). Com o complexo **PR02** foi observado um sutil deslocamento anódico, o que significa para valores mais positivos de potencial eletroquímico. Como as concentrações do complexo e DNA foram elevadas, ocorreu esse indicativo de intercalação, no entanto a constante de equilíbrio de ligação obtida tem valores mais frequentemente observados para interação eletrostática (RAMOTOWSKA *et al.*, 2021).

Dessa forma, para analisar com mais detalhismo foi realizado o experimento em voltametria de pulso diferencial devido a sua alta sensibilidade, tornando possível observar as mudanças decorrentes da interação do complexo com o DNA de maneira mais evidente (figura 39).

Figura 39. Voltamograma pulso diferencial do complexo **PR02** 4 mmol L^{-1} obtido em tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, na presença de DNA 1 mmol L^{-1} com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.



Fonte: A autora.

Foram adicionados os voltamogramas separados do complexo **PR02** (1) e apenas do DNA (2) para que fossem observadas as mudanças decorrentes da interação do complexo com DNA (3) e, conforme observado na voltametria cíclica, observou-se que a presença do

DNA com o complexo promoveu deslocamento do potencial do complexo em -0,2 V para regiões mais negativas, bem como redução do pico de corrente. Esse comportamento indica que deve ter ocorrido interação não-covalente entre o complexo e o DNA, corroborando com os valores modestos da constante de equilíbrio de ligação obtida para esse complexo (RAMOTOWSKA *et al.*, 2021).

4.8 Lipofilicidade (Log P)

A lipofilicidade de um composto é quantificada como o logaritmo do coeficiente de partição de uma molécula entre a fase orgânica e a fase aquosa (octanol e água). As moléculas lipofílicas possuem logP positivo, enquanto moléculas hidrofílicas apresentam valores negativos.

O estudo da lipofilicidade dos complexos metálicos, bem como de moléculas puramente orgânicas, se trata de um importante tópico que pode ser relacionado a potencialidade de seu uso biológico, uma vez que tal propriedade pode estimar a possível distribuição do complexo em um sistema vivo. A lipofilicidade pode ser alterada fundamentalmente variando-se a hidrofobicidade dos ligantes nos complexos metálicos (GILL *et al.*, 2012).

O aumento da lipofilicidade do complexo poderá permitir o aumento da sua absorção pelas células via difusão passiva, como também o aumento da probabilidade de interação com outros sítios hidrofóbicos de DNA e proteínas (LEESON *et al.*, 2007; SVENSSON *et al.*, 2010). Todavia, compostos excessivamente hidrofóbicos também poderão ser inadequados para uso biológico, devido à baixa solubilidade nos fluidos e possível forte interação com proteínas do plasma.

A quantificação dos complexos metálicos nos meios aquoso e orgânico foi realizada através de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis utilizando a equação 5. A concentração do complexo na fase orgânica foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a final na fase aquosa (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Para a quantificação dos complexos na fase aquosa, foi inicialmente traçada uma curva de calibração (Absorbância x [Complexo]) (Apêndices S, T, U).

A tabela 10 nos mostra a diferença de log P dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02**, ilustrando como a inserção dos ligantes: sulfito, NO₂⁻ e NO levaram a valores bem distintos desse parâmetro. Para os complexos **PR** e **PR02** observou-se valores de log P negativos,

indicando que esses complexos têm comportamento hidrofílico. Estudos descritos na literatura mostraram que a eficiência em facilitar a absorção celular de complexo de Ru(II)-dppz depende do tipo de ligante presente na sua estrutura.

No caso de complexos contendo co-ligantes fenóis policlorados, como o complexo de rutênio pentaclorofenol (PCP), que mesmo apresentando log P negativo, mostrou interação com biomoléculas, como o DNA, quando comparado a lipofilicidade do complexo polipiridínico $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]\text{Cl}_2$ (CHAO *et al.*, 2019). Esse tipo de resultado é bastante curioso pois o fato de apresentar log P negativo não impede sua interação com biomoléculas como o DNA, ainda que o log P envolva fundamentalmente a partição nos fluidos, valores bem distintos desse parâmetro podem sugerir possíveis tendência a interação com biomoléculas, mas naturalmente, essa suposição é sujeita a extremos desvios, como o caso descrito.

Apesar de tudo, o complexo **PR01** apresentou valor de log P positivo, que condiz com o comportamento de molécula lipofílica. Esse valor positivo também foi observado para outros complexos com certa analogia, como o *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]\text{PF}_6$ (FOR711A) que apresenta também o ligante nitrito em sua esfera de coordenação, e que apresentou resultados relevantes como vasodilatador (DE OLIVEIRA NETO *et al.*, 2022).

Os valores de log P estão associados a entrada passiva desses compostos nas células, no entanto há a necessidade de equilíbrio entre o tempo de permanência (biodisponibilidade) e a ação do composto no organismo para que se obtenha o efeito necessário a que se destina no organismo, envolvendo fenômenos de farmacocinética e farmacodinâmica, que são mais complexos de serem previstos. De qualquer forma, para alcançar maior expectativa de permeabilidade celular é geralmente preciso que os compostos devam ter valores moderados de log P (0 – 3).

Assim, pode-se notar que o complexo **PR01** apresentou comportamento promissor por apresentar uma expectativa de taxa de permeabilidade melhor que os outros complexos estudados neste trabalho. O complexo **PR02** apresentou uma sutil melhora em relação ao complexo **PR**, apresentando valor mais positivo provavelmente devido à substituição dos ligantes cloretos. Esses valores ainda são bem melhores do que o valor apresentado para o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$, que apresentou log P bastante negativo (Tabela 10), indicando que seja bem menos lipofílico que os complexos estudados neste trabalho. Podemos então concluir que esses complexos provavelmente terão melhor taxa de permeabilidade nas biomembranas hidrofóbicas (POYNTON *et al.*, 2017).

Outro aspecto curioso é que em todos os complexos estudados neste trabalho, o ligante dppz está presente na esfera de coordenação e comparando o log P apenas desse ligante ($\log P = 2,77$ (TAHGHIGHI, 2014)) com os dos complexos (tabela 10) observamos que ocorreu uma expectativa de melhora na sua biodisponibilidade na forma de complexo. Isso pode ser entendido uma vez que deve haver um equilíbrio de partição durante a entrada do complexo através da membrana, é interessante que esse valor seja intermediário na faixa de 0 – 3, na escala de lipofilicidade, sendo que valores muito próximos à 3 mostram-se muito lipofílicos e podem não ser tão seletivo em relação ao local de atuação na membrana.

A lipofilicidade da molécula de NO é um fator significativo em seu papel como mensageiro biológico, com uma alta lipofilicidade juntamente com seu tamanho pequeno permite que o NO atravesse membranas biológicas facilmente (IGNARRO, 2000; LEHNERT *et al.*, 2021). As propriedades da molécula de NO são relevantes para o seu transporte passivo através de membranas biológicas descrita na literatura (ABRAHAM *et al.*, 2000).

A lipofilicidade calculada do óxido nítrico, como coeficiente de partição água-octanol, é pequeno, com o valor encontrado de log P de 0,58, aproximadamente o mesmo que argônio ou nitrogênio (ABRAHAM *et al.*, 2000). Sendo assim, quando o NO está ligado ao centro metálico, é possível inferir que o NO sofrerá grande influência dos outros ligantes, como seria de se esperar, o que deve interferir no efeito da lipofilicidade do complexo (HUGHES, 2008). Esse efeito global é observado se compararmos o log P do NO livre (0,58) e o log P obtido para o complexo estudado **PR02** (tabela 10). Nesse caso observamos a completa mudança de comportamento quando esse ligante está inserido na esfera de coordenação do Ru(II) gerando um log P de -0,17, mostrando a obtenção de um complexo hidrofílico, ao combinar as propriedades dos ligantes e complexo.

Tabela 10. Valores de coeficientes de partição (log P) para os complexos.

COMPLEXOS	LOG P
[Ru(bpy)(dppz)Cl ₂] - PR	- 0,26 (H)
Na[Ru(bpy)(dppz)(SO ₃)(NO ₂)] - PR01	+0,10 (L)
[Ru(bpy)(dppz)SO ₃ (NO)] ⁺ - PR02	- 0,17 (H)
(<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(NO)] ⁺) _(MARTINS <i>et al.</i>, 2023)	- 0,01 (H)
[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(H ₂ O)] _(MARTINS <i>et al.</i>, 2023)	+0,11 (L)
[Ru(bpy) ₂ (dppz)] ²⁺ _(POYNTON <i>et al.</i>, 2017)	- 2,50 (H)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (2-MIM)(NO ₂)]PF ₆ _(DE OLIVEIRA NETO <i>et al.</i>, 2022)	1,29 (L)

(H) – Hidrofílico; (L) – Lipofílico.

Fonte: A autora.

Estudos realizados com o complexo [Ru(bpy)₂(dppz)]Cl₂ mostraram de forma bastante evidente que a absorção do complexo, atravessando a membrana celular, está correlacionada positivamente com sua capacidade de ligação às biomoléculas, mas inversamente com a lipofilicidade. Portanto, a eficiência na absorção pelo núcleo celular de um complexo metálico, em grande parte, pode estar correlacionada tanto com a afinidade de ligação às biomoléculas quanto pela lipofilicidade (CHAO *et al.*, 2019).

Os valores de log P indicam que os complexos **PR** e **PR02** são mais hidrofílicos, assim se espera uma permeabilidade celular menor. Porém os resultados obtidos nos estudos de atividade bacteriana mostraram que tais complexos **PR** e **PR02** tiveram melhores efeitos diante da atividade antibacteriana (tabela 11), enquanto o complexo **PR01**, mais lipofílico, apresentou pouca atividade. Essas observações sugerem que o efeito biológico se deve a uma combinação de fatores, dentre esses o log P, mas que ainda assim pode não ser o principal, até mesmo porque existem outras vias de internalização de compostos além da via passiva em alinhamento com o log P.

4.9 Ensaios de atividade antibacteriana

Os ensaios realizados têm a finalidade de investigar se os complexos metálicos sintetizados apresentam atividade biológica diante de diversas espécies de agentes patogênicos bacterianos. Assim, foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) com bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* com e sem irradiação de luz azul, cujos resultados são apresentados na tabela 11.

Os resultados obtidos mostraram que os complexos **PR**, **PR01** e **PR02** não dispõem de atividade antibacteriana em relação à bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, mesmo com irradiação de luz azul. No entanto, apresentou atividade em relação às outras espécies de bactérias estudadas, inclusive mostrando significativa melhoria se comparado ao complexo precursor **PR**. A atividade antibacteriana observada é bastante atrativa, havendo para o complexo **PR** uma modesta melhoria na sua atividade com irradiação de luz em algumas cepas bacterianas, o que é potencialmente interessante em fototerapia (CÂNDIDO *et al.*, 2015; SVENSSON *et al.*, 2010). Nesse tipo de terapia deseja-se que a atividade ocorra de forma seletiva com a luz, nesse caso temos uma melhoria de uma atividade existente.

Em relação ao complexo **PR02** foi observado um comportamento peculiar, pois mostrou melhor atividade mesmo sem irradiação de luz, podendo ser um indicativo que o NO na esfera de coordenação é mais benéfico do que sua liberação, talvez facilite a ação bactericida do complexo como um todo. Talvez proporcionando a geração de radical superóxido, como previamente observado nessa tese.

Entretanto, com irradiação de luz e possível liberação do NO, que poderia promover uma diminuição da lipofilicidade e consequentemente da ação promovida pelo complexo, colocando esse ligante diretamente relacionado a essa atividade. Os resultados com o complexo **PR02** indicaram que a substituição dos ligantes cloretos pelo óxido nítrico e sulfito promoveram melhoria na atividade bactericida, mostrando-se cerca de 4 vezes mais eficiente que o complexo **PR**.

O efeito dos complexos nas linhagens de bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentaram melhorias significativas e concentrações muito menores para atividade antibacteriana do que com as bactérias Gram-negativas citadas anteriormente. Essas atividades foram inclusive melhores para o complexo **PR02**, mesmo sem irradiação, sendo que o complexo **PR02** apresentou resposta no escuro com uma concentração significativamente baixa

(4,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Curiosamente, esse valor é 4 vezes menor do que com uso de irradiação luminosa. Essa melhoria de atividade possivelmente ocorre devido à necessidade do óxido nítrico se manter coordenado ao complexo, facilitando talvez a entrada do complexo através da parede celular e membrana plasmática (HUGHES, 2008) e ou facilitando geração de íons superóxido. Seria possível que a liberação do NO, sob irradiação, provoque uma redução da lipofilicidade do composto, assim mantê-lo intacto auxiliaria sua atividade.

Além disso, é possível que a pequena liberação de NO sob irradiação de luz cause pouco efeito antibacteriano e não compense a alteração de lipofilicidade e carga. Para o complexo **PR01** foi observada atividade antibacteriana apenas para *E. coli* numa concentração inibitória mínima (MIC) significativamente elevada (188 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e sem distinção se medido com ou sem irradiação de luz. Esse complexo apresentou o maior valor de lipofilicidade, sendo esperado, baseado somente naquele parâmetro, que teria maior acessibilidade. Todavia, se sua atividade biocida for significativamente menor esse maior acesso ao citosol não auxiliaria numa melhor atividade. Infelizmente, não dispomos de medidas quantitativas de absorção dos complexos nesses sistemas, o que auxiliaria nessa discussão.

O comportamento apresentado por esse complexo estimula posteriores estudos a fim de elucidar tal atividade bem como novas investigações envolvendo outras bactérias e parasitas patogênicos distintos.

Tabela 11. Atividade antibacteriana dos compostos **PR**, **PR01** e **PR02**.

COMPLEXOS		ESPÉCIES					
IRRADIAÇÃO		<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>P.</i>	<i>E.coli</i>
		<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>epidermidis</i>	<i>epidermidis</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
		ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
		25923	700698	12228	35984	27854	11303
PR	SIM	MIC	15,6 (25,55)	125 (204,75)	31,2 (51,10)	31,2 (51,10)	ND (204,75)
		MBC	15,6 (25,55)	125 (204,75)	31,2 (51,10)	31,2 (51,10)	ND
	NÃO	MIC	15,6 (25,55)	125 (204,75)	62,5 (102,37)	31,2 (51,10)	ND (204,75)
		MBC	15,6 (25,55)	ND	62,5 (102,37)	62,5 (102,37)	ND
	PR01	MIC	ND	ND	ND	ND	125 (187,78)
		MBC	ND	ND	ND	ND	ND
		MIC	ND	ND	ND	ND	125 (187,78)
		MBC	ND	ND	ND	ND	ND
PR02	SIM	MIC	15,6 (19,63)	31,2 (39,26)	31,2 (39,26)	15,6 (19,63)	ND (168,31)
		MBC	15,6 (19,63)	31,2 (39,26)	31,2 (39,26)	15,6 (19,63)	ND
	NÃO	MIC	3,9 (4,9)	31,2 (39,26)	15,6 (19,63)	15,6 (19,63)	ND (168,31)
		MBC	3,9 (4,9)	31,2 (39,26)	15,6 (19,63)	31,2 (39,26)	ND

Concentração inibitória mínima (MIC); Concentração bactericida mínima (MBC) são expressas em µg/mL (µmol L⁻¹). (ND) Não detectado mesmo na mais alta concentração usada.

Fonte: A autora.

Em resumo, observamos que os complexos **PR** e **PR02** foram bastante eficientes em bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e moderadamente eficiente em uma Gram-negativa (*E. coli*). O complexo **PR02** apresentou os melhores resultados sem a necessidade de irradiação, tornando-o promissor para a continuidade desses estudos. Um

composto com comportamento análogo foi observado para $\text{ct-[RuCl(NO)(dppb)(4,4'-Mebipy)](PF}_6)_2$ que mostrou atividade contra bactérias Gram-positivas, possivelmente pela presença do ligante nitrosil que teve efeito antibacteriano mais pronunciado do que seu precursor sem NO ($\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]$). Esse resultado reforça o importante papel do NO de se manter coordenado nesse processo (DE SOUSA *et al.*, 2020).

4.10 Ensaio de inibição da formação do biofilme e quantificação de biomassa

Biofilme é uma organização complexa de micróbios que aderem a uma superfície sólida e uns aos outros, produzindo substâncias poliméricas extracelulares. Estas substâncias poliméricas são produzidas pelos próprios microrganismos, com a finalidade de aumentar a sua chance de sobrevivência em um determinado meio (LI, P. *et al.*, 2023). A formação de biofilme está diretamente relacionada a várias doenças infecciosas através da colonização em dispositivos médicos (HALL *et al.*, 2014; SERBANESCU *et al.*, 2023).

Várias bactérias patogênicas são capazes de formar biofilmes; entre elas estão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (LEANSE *et al.*, 2022). Portanto, com a finalidade de avaliar os efeitos dos complexos utilizados nesse trabalho, foram realizados ensaios que avaliaram o efeito desses complexos **PR**, **PR01** e **PR02** na inibição da formação de biofilmes e quantificação de biomassa das cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Nas figuras 40, 41 e 42 encontram-se os resultados dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02**, respectivamente, em termos de inibição da formação de biofilmes, quantificados pelo método colorimétrico CV, bem como da enumeração de células viáveis do biofilme, pelo método de contagem das UFCs.

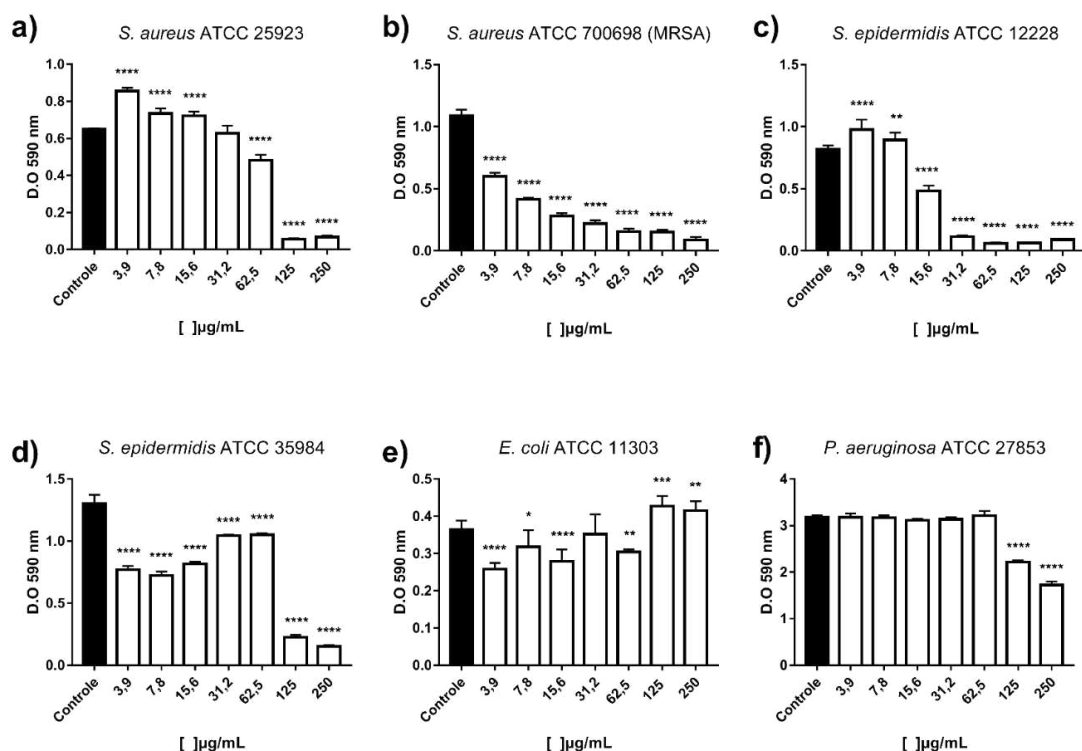
O complexo **PR** reduziu a formação de biomassa principalmente nas cepas *S. epidermidis* 35984, com níveis de redução entre 41 % na concentração de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($6,38 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 88 % na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($410 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figuras 33 A, B, C e D). A cepa *S. aureus* ATCC 700698 se mostrou um pouco mais sensível a este complexo, apresentando redução de 45 % de sua biomassa na concentração de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($6,38 \mu\text{mol L}^{-1}$) e de 92 % na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($410 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 39 B).

Na cepa *S. aureus* 25923 a redução de biofilme foi de 3,5 % na concentração $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($51 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo o maior valor de inibição de 90 % na concentração máxima de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($410 \mu\text{mol L}^{-1}$), o mesmo comportamento foi observado na cepa *S. epidermis* 12228, cuja redução de 41 % ocorreu a partir de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($25,55 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo obtida a

maior inibição de 89% na concentração máxima utilizada de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($410 \mu\text{mol L}^{-1}$). A cepa *P. aeruginosa* 27853 não mostrou inibição na formação de biofilme em todas as concentrações, sendo o maior valor de inibição observado de 46 % na concentração máxima $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($410 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Para a cepa de *E. coli* 11303 observou-se um padrão variável, com inibição da formação da biomassa de 29 % para as concentrações mais baixa de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($6,38 \mu\text{mol L}^{-1}$), 13 % e 23 % nas concentrações de 7,8 ($12,77 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($25,55 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente. Nas concentrações mais elevadas, essa cepa apresentou uma quantidade maior de biomassa, chegando a ultrapassar o controle da bactéria sem tratamento, fato que pode estar relacionado ao estresse causado pelo complexo sobre a bactéria testada, levando a produzir mais matriz extracelular como descrito em outros sistemas (LEANSE *et al.*, 2022; STEPANOVIĆ *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2014) (Figura 40 A, B, C e D).

Figura 40. Efeito do complexo de rutênio PR sobre a formação de biofilmes de *Staphylococcus* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa*.

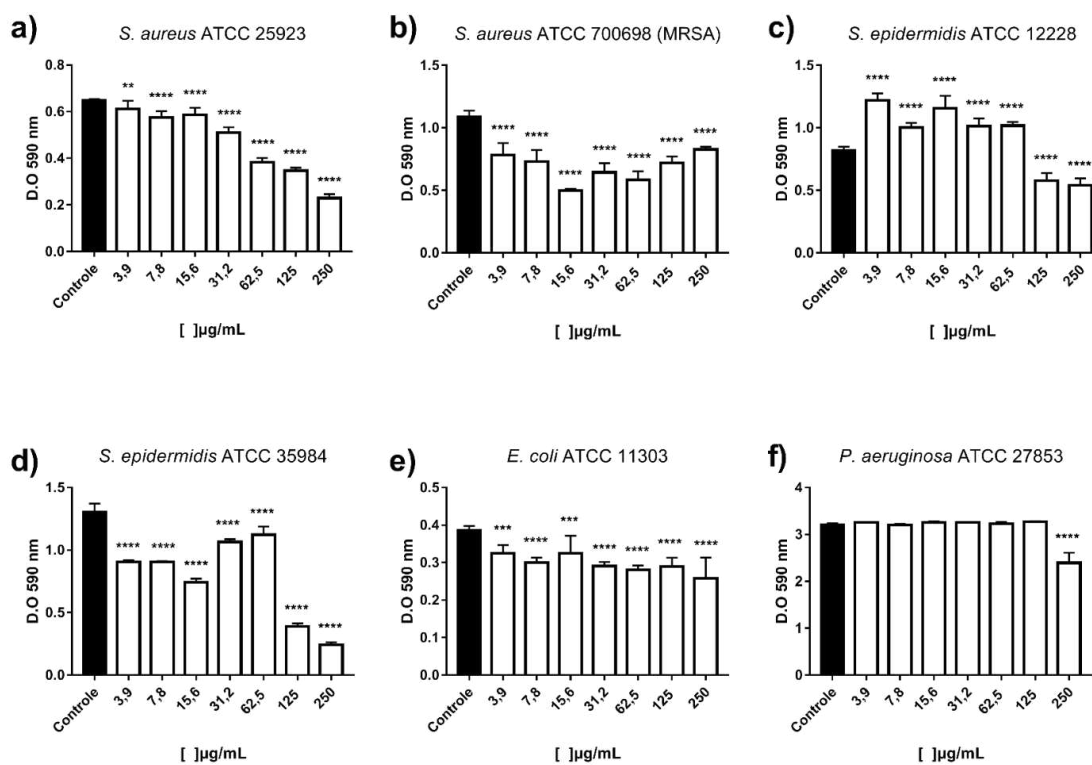


Fonte: A autora. Quantificação da biomassa. Barras brancas representam bactérias tratadas com complexos de rutênio PR, barras pretas representam bactérias sem tratamento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$ comparado ao controle.

O complexo **PR01** reduziu a formação da biomassa principalmente nas cepas *S. epidermis* 35984, com níveis de redução entre 30 % na concentração $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,85 \mu\text{M}$) e 81 % na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($374,97 \mu\text{mol L}^{-1}$), mostrando-se mais sensível ao complexo dentre as demais cepas (Figuras 40 A, B, C e D). A cepa *S. aureus* 25923 também mostrou redução do biofilme, apresentando redução de somente 5,9 % de sua biomassa na concentração de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,85 \mu\text{mol L}^{-1}$) e de 64,70% na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($375 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 40 B). Na cepa *S. aureus* 700698, a maior redução de biofilme foi de 54 % na concentração $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($23 \mu\text{mol L}^{-1}$). A cepa de *E. coli* 11303 apresentou inibição da formação da biomassa de 16 % para a concentração mais baixa de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,85 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo a maior inibição observada para essa cepa de 33 % na concentração $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($375 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Entretanto, as cepas *P. aeruginosa* 27853 e *S. epidermis* 12228 mostraram maior resistência ao contato com o complexo **PR01**, principalmente nas menores concentrações, contudo nas concentrações mais elevadas mostrou redução do biofilme em 25 % e 34 % na concentração $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($375 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente. Em determinadas concentrações verificou-se que algumas cepas, como no caso das cepas *P. aeruginosa* 27853 e *S. epidermis* 12228, apresentaram uma quantidade maior de biomassa, chegando a ultrapassar o controle de bactéria sem tratamento. Como mencionado anteriormente, esse fato que pode estar relacionado ao estresse causado pelo complexo sobre a bactéria testada, levando a produzir mais matriz extracelular, entretanto em valores mais elevados do composto o efeito inibitório se sobressai. (Figura 41 A, B, C e D).

Figura 41. Efeito do complexo de rutênio **PR01** sobre a formação de biofilmes de *Staphylococcus* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa*.



Fonte: A autora. Quantificação da biomassa. Barras brancas representam bactérias tratadas com complexos de rutênio PR01, barras pretas representam bactérias sem tratamento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$ comparado ao controle.

O complexo **PR02** apresentou o melhor percentual de inibição, reduzindo a formação da biomassa principalmente nas cepas *S. epidermidis* 35984 em 52% já na concentração de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 90% na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($314 \mu\text{mol L}^{-1}$). Perfil semelhante foi observado com a cepa *S. aureus* ATCC 700698 que se mostrou bastante sensível a este complexo, apresentado redução de 52 % de sua biomassa na concentração de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,90 \mu\text{mol L}^{-1}$) e de 91 % na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($314 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 41 B).

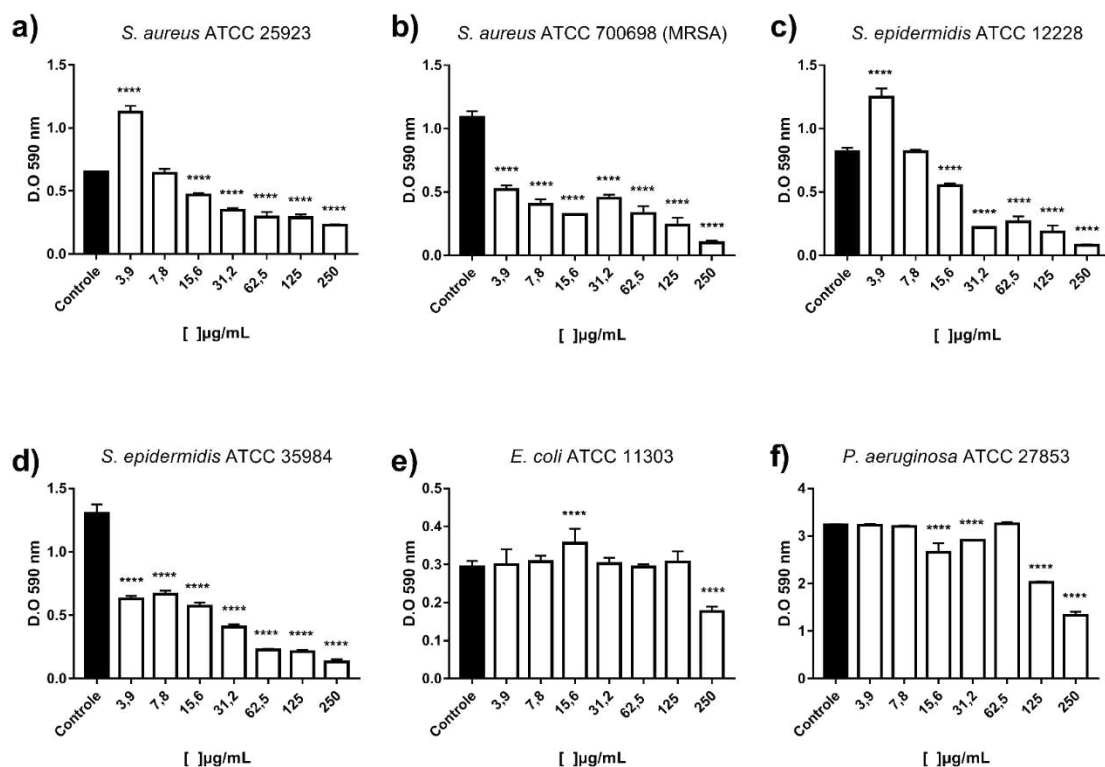
Efeitos bastante discretos ou pouco expressivos foram observados com a cepa *S. aureus* 25923, que teve pequena redução de biofilme de 1,2% ocorrendo na concentração de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($9,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) chegando ao maior valor de inibição de 65 % na concentração máxima de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($314 \mu\text{mol L}^{-1}$). O mesmo comportamento foi observado na cepa *S. epidermidis* 12228, cuja redução desprezível de 0,51 % ocorreu em $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($9,81 \mu\text{mol L}^{-1}$) e a maior inibição de 90 % na concentração máxima utilizada de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($314 \mu\text{mol L}^{-1}$).

A cepa *P. aeruginosa* 27853 mostrou modesta ou nenhuma inibição dependendo da concentração empregada, alcançando o maior valor de inibição de 59 % na concentração máxima 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (314 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

A cepa de *E. coli* 11303 apresentou efeito de inibição do biofilme apenas na concentração mais elevada de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (314,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$) reduzindo a biomassa em 40 %. Nas concentrações menores, essa cepa apresentou uma quantidade maior de biomassa, chegando a ultrapassar o controle de bactéria sem tratamento, fato que pode estar relacionado ao estresse causado pelo complexo sobre a bactéria testada, levando a produzir mais matriz extracelular. (Figura 42 A, B, C e D). Contudo foi observado que o complexo **PR02** (figura 41), que apresenta o ligante nitrosil, obteve um efeito melhor que os demais complexos indicando há influência desse ligante no efeito de redução de biomassa, mostrando-se eficiente em todas as cepas utilizadas nesse estudo.

Esses resultados corroboram com os obtidos na atividade bacteriana (tabela 11), em que se observou efeitos similares nas cepas *S. epidermis* 35984, *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* 25923, *S. epidermis* 12228, em relação a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 com os estudos de biomassa foi possível observar uma modesta atividade, inexistente nos ensaios antibacterianos. A cepa *E. coli* 11303 manteve a tendência nos experimentos de atividade antibacteriana, cujo modesto efeito só foi observado em elevadas concentrações.

Figura 42. Efeito do complexo de rutênio **PR02** sobre a formação de biofilmes de *Staphylococcus* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa*.



Fonte: A autora. Quantificação da biomassa. Barras brancas representam bactérias tratadas com complexos de rutênio PR02, barras pretas representam bactérias sem tratamento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$ comparado ao controle.

4.11 Avaliação do efeito dos complexos de rutênio combinado aos antibióticos clínicos

Entre os complexos de metais de transição, os complexos à base de rutênio foram amplamente estudados e alguns exibiram atividade biológica significativa (SUBHASH *et al.*, 2023). Isso pode ser devido à sua capacidade de se ligar fortemente a ácidos nucleicos e proteínas, à cinética de troca de ligantes semelhante à de seus equivalentes de platina, prevalência de dois estados de oxidação principais (II e III) e a propriedade de imitar o ferro quando ligado a moléculas biológicas (ALLARDYCE *et al.*, 2001; FREI *et al.*, 2023; ZEGLIS *et al.*, 2007).

Além de se ligar a estruturas de DNA duplex gerais, complexos inertes de rutênio foram também projetados para se ligar especificamente em estruturas de DNA não convencional, como os DNAs do tipo G-quadruplexes (CHENG *et al.*, 2023). Diversos estudos mostraram que certos complexos de rutênio mononucleares que continham derivados do ligante dppz ou o

ligante 2-fenil-imidazo-1,10-fentrolina tiveram atividade moderada (KUMAR *et al.*, 2013). Já os complexos aridina ou 1,10-fenantrolina e bdppz (9a,13a-dihidro-4,5,9,14-tetraaza-benzotrifênileno-11-il)-fenil-metanona apenas apresentaram atividade antimicrobiana significativa a 1500 mg ml^{-1} contra *S. aureus* e *E. coli*, apesar da ligação ao DNA com afinidade razoável (ASHWINI KUMAR *et al.*, 2009; PRIYA *et al.*, 2023). Baseando-se nesses estudos foram realizados ensaios com os complexos **PR**, **PR01** e **PR02** com a finalidade de analisar o efeitos desses complexos diante de cepas bacterianas, tais como as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303, combinados com os antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA), já que são menos susceptíveis a ambos antibióticos analisados (KASSIM *et al.*, 2016).

Os resultados da atividade antimicrobiana dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02** sobre o crescimento planctônico dos microrganismos testados foram avaliados através dos ensaios de determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC), Concentração Bactericida Mínima (MBC), previamente apresentado, e o efeito sinérgico associado quando combinados aos antibióticos. O estudo mostrou que todos os complexos de rutênio (**PR**, **PR01**, **PR02**) tiveram alguma ação bacteriostática e bactericida, bem como uma mistura de efeitos quando usados combinados com antibióticos, sejam eles efeito sinérgico, aditivo ou antagônico. Os complexos mostraram atividade significativa em bactérias Gram-positivas (Tabela 12).

Conforme a tabela 12, três cepas mostraram índices de suscetibilidade resistentes frente aos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) de acordo com as recomendações e pontos de cortes (Quadro 3) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (CLSI, 2015). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303 se mostraram ser menos susceptíveis a ambos os antibióticos testados (CLSI, 2015; EUCAST, 2015).

De acordo com os valores da MIC o complexo **PR** foi avaliado em combinação com os dois antibióticos também testados neste estudo, no intuito de potencializar o efeito bacteriostático de ambos. Conforme a tabela 11, esse composto associado com ampicilina apresentou efeito sinérgico sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 (ICIF = 0,310), e efeito indiferente sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698 (ICIF = 0,562).

Ao analisarmos o MIC individual da ampicilina, percebemos sua considerável redução quando combinada com a MIC do complexo **PR**, especialmente em relação à cepa que apresenta níveis de suscetibilidade resistente. A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, que apresentou MIC individual para ampicilina no valor de $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, teve uma melhoria em 4 vezes quando combinada com o complexo **PR**, alcançando MIC de $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($410 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}$)

(Tabela 11). Por outro lado, já para a cepa de *S. aureus* ATCC 700698 o resultado foi indiferente.

Em associação com a tetraciclina, este mesmo complexo apresentou efeito sinérgico (Tabela 12) com ICIF de 0,312 para a cepa de *S. aureus* ATCC 700698, mostrando uma redução da MIC observado na combinação deste complexo com a tetraciclina, ocorrendo uma redução a MIC deste antibiótico a 1/4 do valor da CIM individual. Apresentando resultado de indiferente na combinação com ICIF de 1,06 para a cepa de *S. epidermidis*.

Tabela 12. Efeito do complexo **PR** irradiado por luz led azul combinado aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra), sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO			EFEITO	
	PR			Amp				
	CIM ^a µg/mL (individual)	CIM ^b µg/mL (combinado)	CIF	CIM ^a µg/mL (individual)	CIM ^b µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	125	7,8	0,062	50	25	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	31,2	1,9	0,060	1.000	250	0,25	0,310	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	125	>250	>2,0	0,39	>0,78	>2,0	>4,0	Antagonismo

	PR			Tetra				
	CIM ^a µg/mL (individual)	CIM ^b µg/mL (combinado)	CIF	CIM ^a µg/mL (individual)	CIM ^b µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	125	7,8	0,062	100	25	0,25	0,312	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	31,2	1,9	0,060	0,78	0,78	1,0	1,06	Indiferente
<i>E. coli</i> ATCC 11303	125	>250	>2,0	0,78	>1,56	>2,0	>4,0	Antagonismo

Fonte: A autora. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (MIC), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM^b), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice da Combinação Inibitória Fracionada (ICIF). ICIF ≤ 0,5 efeito sinérgico, ICIF > 0,5 ≤ 4,0 efeito indiferente, ICIF > 4,0 efeito antagônico.

De forma similar ao descrito anteriormente, o complexo **PR02** foi avaliado em combinação com dois antibióticos (tabela 13), sendo observado que associado à ampicilina apresentou efeito sinérgico sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 (ICIF = 0,371), e efeito indiferente sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698 (ICIF = 0,562). Houve uma considerável redução do CIM quando combinado, análogo ao observado para o **PR**, especialmente em relação à cepa resistente. A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, similarmente ao **PR** teve redução de 4 vezes no CIM individual para ampicilina e 16 vezes para o MIC individual do composto **PR02** (Tabela 13). Para a cepa de *S. aureus* ATCC 700698 o resultado da combinação foi indiferente.

Em associação com a tetraciclina, este mesmo complexo apresentou efeito indiferente (Tabela 13) com ICIF de 0,560 para a cepa de *S. aureus* ATCC 700698 e ICIF de 0,75 para a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984.

Tabela 13. Efeito do complexo **PR02** irradiado por luz azul combinado aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra) e investigados com *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO			EFEITO	
	PR02			Amp				
	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	31,2	1,9	0,060	50	25	0,5	0,560	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	15,6	1,9	0,121	1.000	250	0,25	0,371	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	125	>250	>2,0	0,39	>0,78	>2,0	>4,0	Antagonismo

	PR02			Tetra				
	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	31,2	1,9	0,060	100	50	0,5	0,560	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	15,6	3,9	0,25	0,78	0,39	0,5	0,75	Indiferente
<i>E. coli</i> ATCC 11303	125	>250	>2,0	0,78	>1,56	>2,0	>4,0	Antagonismo

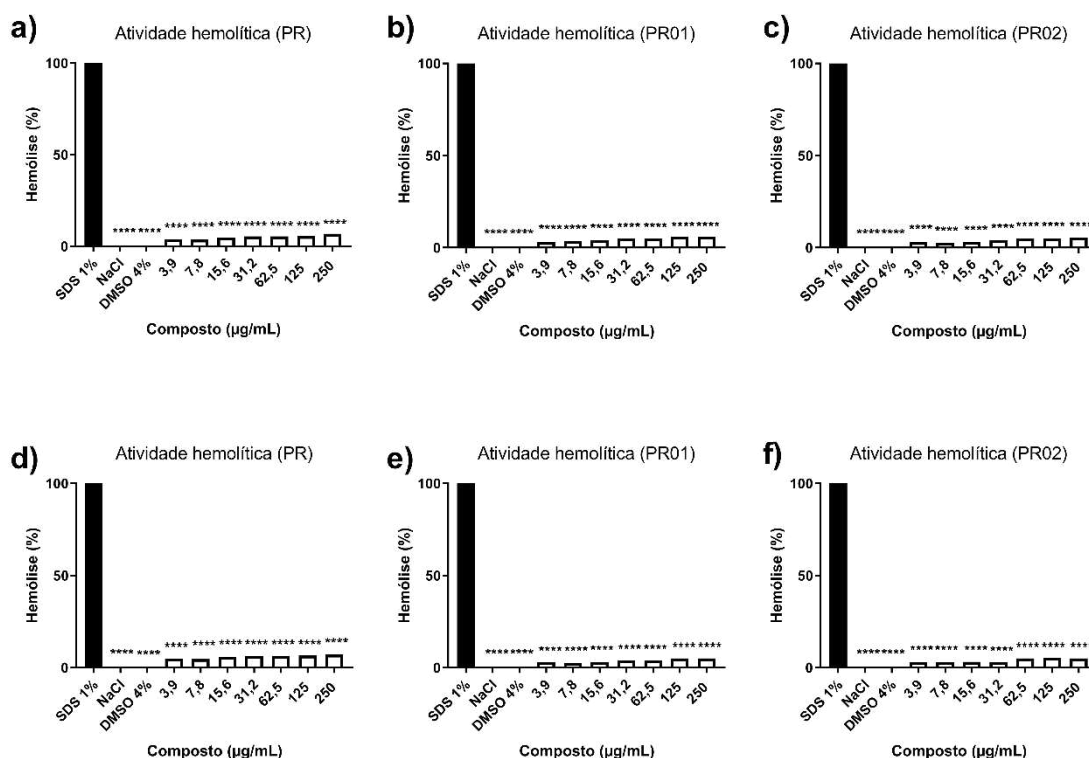
Fonte: A autora. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice da Combinação Inibitória Fracionada (ICIF). ICIF $\leq 0,5$ efeito sinérgico, ICIF $> 0,5 \leq 4,0$ efeito indiferente, ICIF $> 4,0$ efeito antagonístico. (*) Perca da atividade bacteriostática.

4.12 Atividade Hemolítica

A administração de fármacos pode ser feita por várias vias, entretanto, em sua maioria há contato com componentes do sangue, particularmente hemácias, que são células sanguíneas responsáveis por realizar o transporte de oxigênio. Portanto, se mostra relevante avaliar os efeitos de candidatos a drogas em hemácias. Ensaio de hemólise *in vitro* é uma ferramenta de triagem amplamente aceita para prever um dos perfis de toxicidade *in vivo* de um composto (CHAUDHARY *et al.*, 2024; SAYES *et al.*, 2007).

O ensaio de atividade hemolítica mostrado na figura 43 foi realizado para avaliar a citotoxicidade dos complexos **PR**, **PR01** e **PR02** tanto irradiados por luz azul, quanto na ausência de luz em concentrações que variaram de 250 a 3,9 µg mL⁻¹.

Figura 43. Atividade hemolítica dos complexos de rutênio **PR**, **PR01** e **PR02**.



Fonte: A autora. (a), (b) e (c) sangue tratado com os complexos **PR**, **PR01** e **PR02** irradiados com LED de luz azul, enquanto (d), (e) e (f) sangue tratado com os complexos PR, PR01 e PR02 na ausência de luz. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle.

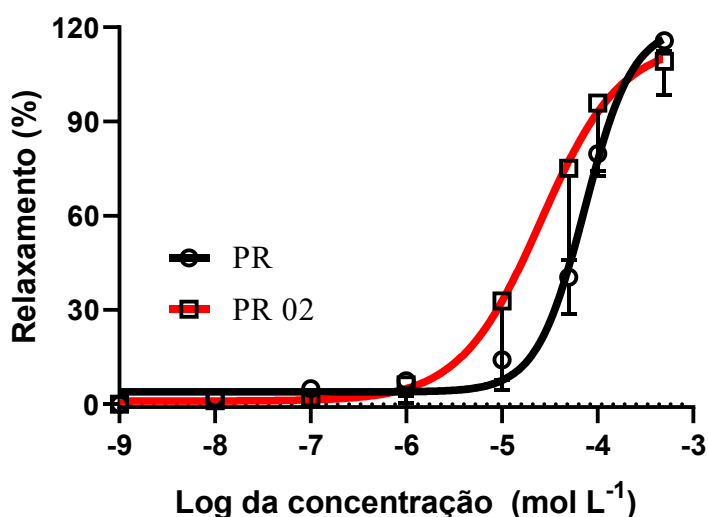
Os resultados mostraram que o processo de hemólise é quase insignificante mesmo nas mais altas concentrações quando se observa entre 5% e 6% de hemólise (31,2 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que testes realizados com a doxorrubicina, uma droga anticâncer amplamente usada, mostrou 42% de hemólise na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ALI *et al.*, 2014). Esse resultado sustenta indicativos de que os complexos metálicos estudados neste trabalho possuem baixa citotoxicidade, sendo bastantes promissores para estudos biológicos. Nenhuma hemólise foi observada nos controles de NaCl 9% ou DMSO 4%, enquanto o controle positivo (SDS 1%) mostrou 100% de hemólise durante esses ensaios.

4.13 Ensaios de vasodilatação para os complexos PR e PR02

Com a finalidade de avaliar o potencial vasodilatador dos complexos **PR** e **PR02** foram realizados ensaios de vasodilatação empregando-se anéis de aorta de ratos pré-contraídos com 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fenilefrina. O ensaio foi realizado por meio de medições de dose-resposta,

utilizando o nitroprussiato de sódio (SNP) como controle. Além disso, foram realizadas 7 medidas independentes, preparadas a partir de diferentes animais para obtenção de dados estatisticamente confiáveis. As curvas de relaxação estão ilustradas na figura 44. Essas medidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal (UECE, coordenado pelo Prof. Dr. Nilberto do Nascimento).

Figura 44. Curvas de dose-resposta para ensaio de vasodilatação em aorta de rato com os complexos **PR** e **PR02**. As respostas de relaxamento são expressas em percentual de relaxamento versus concentração de complexos.



Fonte: A autora.

O valor de EC_{50} , que corresponde à concentração mínima de complexo necessária para provocar 50% de vasodilatação, dos complexos estudados apresentaram valores razoavelmente elevados para que se observe o efeito de inibição, indicando que esses complexos apresentam reduzida atividade vasodilatadora. Assim, para o complexo precursor **PR** foi obtido o valor de $73 \mu\text{mol L}^{-1}$, contudo para o complexo **PR02** foi observada melhora na vasodilatação obtendo-se uma concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$. Apesar disso, em ambos os casos foi possível atingir a máxima potência de vasodilatação ($\sim 110\%$), nem sempre apresentada por substâncias investigadas.

Tais resultados evidenciaram que, nessas condições, o complexo **PR02** apresentou melhora de atividade devido, possivelmente, a presença de NO na sua esfera de coordenação. Entretanto, o EC_{50} para a atividade vasodilatadora é bastante reduzida, se comparado com o

nitroprussiato de sódio (SNP) (COBB *et al.*, 2018) que é o padrão utilizado para esses estudos. Apesar disso, esse valor pode ser motivado pela cinética lenta de liberação de NO, como foi evidenciado em estudos prévios *in vitro*.

Esses resultados, apesar de pouco animadores, podem trazer outras perspectivas, uma vez que o complexo **PR02** mostra uma liberação de NO certamente muito mais lenta que o SNP. O SNP apresenta efeitos colaterais devido a liberação do cianeto e liberação muito rápida de NO, promovendo uma hipotensão que precisa ser ajustada (HOTTINGER *et al.*, 2014). Logo, este complexo se trata de um possível agente vasodilatador com menores efeitos colaterais comparado ao SNP e de lenta a longa duração.

Tais observações indicam que o complexo **PR02** pode eventualmente servir como um promissor anti-hipertensivo, possivelmente com baixos efeitos colaterais e menores efeitos bruscos de queda de pressão, que merece posteriores estudos. Contudo esse resultado foi extremamente relevante, pois ao mostrar seu reduzido efeito vasodilatador frente ao SNP, mostrou também que seu efeito citotóxico é reduzido, o que corrobora com o resultado obtido no ensaio de atividade hemolítica, ao mostrar que o complexo **PR02** é bastante promissor para aplicação em ensaios biológicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados, os complexos propostos estão consistentes com as caracterizações, conforme as técnicas descritas (espectroscopia na região do UV-vis e infravermelho, ressonância magnética nuclear, voltametria cíclica e análise elementar).

O estudo de dependência com pH apresentou dois processos, cujo pH em 5,94 se mostrou consistente com o processo ácido-base centrado nos nitrogênios do dppz, enquanto o segundo processo em pH 9,16 seria devido a 50% de interconversão entre as espécies coordenadas $\text{NO}^+/\text{NO}_2^-$. Esse valor de interconversão se mostrou bastante próximo ao encontrado para o complexo análogo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ (pH = 10,35). Esse resultado mostra que o complexo possivelmente possui estabilidade em condições fisiológicas, já que apresentou pH de conversão elevado (pH = 9,16).

Os ensaios de estabilidade mostraram que os compostos são estáveis em DMSO. Em relação ao tampão fosfato, os complexos **PR01** e **PR02** apresentaram estabilidade durante o tempo da análise de 2h e 12h, contudo o complexo **PR** no final das 2h não manteve a estabilidade apresentada pelos outros complexos. O complexo **PR02** apresenta pequena reatividade com GSH, se comparado ao complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$, gerando possivelmente NO/HNO no meio como indicado pela sonda seletiva cPTIO.

Os ensaios indicaram expressiva geração de radical superóxido quando da adição de GSH, mesmo em concentração reduzida do composto **PR02** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), como indicado pela sonda NBT. Essa observação foi confirmada através do ensaio de eletroforese (Apêndice R), que mostrou a interação/clivagem do DNA devido possível geração de íon superóxido na presença dos complexos **PR** e **PR02**.

Os ensaios de interação com DNA monitorado por UV-Vis e qualitativamente medidos por CD mostraram que esses compostos têm satisfatória interação com DNA com constantes de associação (K_b) na ordem de 10^4 para o complexo **PR** e 10^5 para os complexos **PR01** e **PR02**, indicando fraca a moderada intercalação. Os estudos de eletroforese mostraram clivagem do DNA após irradiação com luz dos complexos e possível interação covalente nas fitas clivadas. Esses sistemas também se mostraram capazes de interagir com estruturas de DNA do tipo G-quadruplex abrindo interessantes oportunidades, sendo ainda o complexo **PR02** foi o que provocou maiores alterações.

As clivagens e danos ao DNA foram mais bem observadas para o complexo **PR02** com uso de luz azul, havendo expressiva melhoria ao se combinar com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que mesmo no escuro na concentração de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ e na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ o complexo tem efeito de clivagem desaparecendo a FI e o surgimento da FII e FIII.

Os ensaios de vasodilatação apresentaram melhor resultado para o complexo **PR02** ($\text{EC}_{50} = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$) indicando relaxamento dos vasos, o que possivelmente foi incrementado pela presença da nitrosil coordenada. Esse baixo valor pode servir como indício in vivo de que haja pouca liberação de NO. Os resultados diversos de liberação de NO, espontâneo ou induzido com luz e/ou glutatona já davam esse indício.

Adicionalmente, foram observadas atividades antibacterianas para o complexo **PR** em bactérias Gram-positivas com e sem irradiação de luz azul, enquanto o complexo **PR01** apresentou baixa atividade, sendo eficiente apenas em relação à bactéria *E. coli*. Por outro lado, o complexo **PR02** apresentou atividade frente a todas as bactérias, com exceção da *P. aeruginosa*, que nenhum dos complexos apresentou atividade. Nos ensaios de quantificação de biofilmes e redução de biomassa o complexo **PR02** apresentou um efeito melhor que os demais complexos indicando que ocorre influência desse ligante no efeito de redução de biomassa, mostrando-se eficiente em todas as cepas utilizadas nesse estudo.

O estudo de atividade antimicrobiana mostrou que todos os complexos de rutênio (**PR**, **PR01**, **PR02**) tiveram ação bacteriostática, bactericida e efeito sinérgico em vários casos. Os ensaios de atividade hemolítica mostraram que os complexos **PR**, **PR01** e **PR02** não causaram hemólise, ou seja, ruptura das células, indicando que não provocaram danos as células utilizadas nesse estudo.

Portanto, os complexos sintetizados, principalmente o complexo **PR02** ($[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$, em que combinamos pela primeira vez três características: um ligante à base de fenazina para interação com DNA, óxido nítrico e sulfito como moduladores de reatividade e carga/hidrofilicidade, indicaram resultados bastante promissores. O **PR02** possui um perfil muito distinto de reatividade e atividade biológica se comparado ao $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$, seu sistema análogo contendo 2,2'-bipiridina em vez de dppz.

Na verdade, o ligante fenazínico desativou drasticamente o **PR02** como doador de NO, quase não havendo mais liberação de NO, seja por estímulos térmicos, luminosos ou de agentes redutores (por exemplo, glutatona). Essa aparente desvantagem mostrou um melhor perfil biológico como agente antibacteriano. **PR02** apresentou atividade antimicrobiana expressivamente alta com MIC de apenas $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*S. aureus*) juntamente com

comportamento sinérgico em combinação com um antibiótico conhecido (ampicilina) aumentando sua ação em 4 vezes. Estas sensibilidades quase não foram relatadas para qualquer composto nitrosilo de rutênio.

Além disso, este composto reduziu a produção de biofilme em *S. aureus* e *S. sperdimidis*, o que também é um problema importante para a tolerância bacteriana aos antibióticos, particularmente em ambientes hospitalares. Ainda nos testes de hemólise mostrou-se potencialmente seguro. Portanto, este trabalho forneceu um composto promissor contendo o ligante NO, que após uso pode não afetar significativamente o sistema cardiovascular, mas pode fazer parte de um arsenal necessário para combater cepas bacterianas resistentes. Mais estudos biológicos devem ser realizados a fim de apoiar seu potencial biológico.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. H.; GOLA, J. M.; COMETTO-MUNIZ, J. E.; CAIN, W. S. The solvation properties of nitric oxide. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, [s.l.], n. 10, p. 2067-2070, set. 2000. doi: <https://doi.org/10.1039/B004419I>

ABREU, F. D.; PAULO, T. d. F.; GEHLEN, M. H.; ANDO, R. A. *et al.* Aryl-substituted ruthenium (II) complexes: a strategy for enhanced photocleavage and efficient DNA binding. **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v.56, n. 15, p. 9084-9096, jul. 2017. doi: [10.1021/acs.inorgchem.7b01108](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01108)

ALI, I.; WANI, W.; SALEEM, K.; HAQUE, A. J. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v.13, n.2, p. 296-306, fev. 2013. doi: [10.2174/1871520611313020016](https://doi.org/10.2174/1871520611313020016)

ALI, I.; WANI, W. A.; SALEEM, K.; HSIEH, M.-F. Anticancer metallodrugs of glutamic acid sulphonamides: in silico, DNA binding, hemolysis and anticancer studies. **RSC Advances**, [s.l.], v. 4, n. 56, p. 29629-29641, jun. 2014. doi: <https://doi.org/10.1039/C4RA02570A>

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. 62 - 69 45, abr. 2001. doi: <https://doi.org/10.1595/003214001X4526269>

AMBROISE, A.; MAIYA, B. G. Ruthenium (II) complexes of 6, 7 dicyanodipyridoquinoxaline: synthesis, luminescence studies, and DNA interaction. **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 39, n. 19, p. 4264-4272, set. 2000. doi: [10.1021/ic9914692](https://doi.org/10.1021/ic9914692)

ANG, D. L.; KELSO, C.; BECK, J. L.; RALPH, S. F. *et al.* A study of Pt (II)–phenanthroline complex interactions with double-stranded and G-quadruplex DNA by ESI–MS, circular dichroism, and computational docking. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 429-440, mai. 2020. doi: [10.1007/s00775-020-01773-4](https://doi.org/10.1007/s00775-020-01773-4)

ASENSIO, J. L.; BROWN, T.; LANE, A. N. Solution conformation of a parallel DNA triple helix with 5' and 3' triplex–duplex junctions. **Structure**, [s.l.], v.7, n. 1, p. 1-11, jan. 1999. doi: [10.1016/s0969-2126\(99\)80004-5](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80004-5)

ASHWINI KUMAR, K.; REDDY, K. L.; VIDHISHA, S.; SATYANARAYANA, S. J. Synthesis, characterization and DNA binding and photocleavage studies of [Ru (bpy) 2BDPPZ] 2+,[Ru(dmb)2BDPPZ] 2+ and [Ru (phen)2BDPPZ] 2+ complexes and their antimicrobial activity. **Applied Organometallic Chemistry**, [s.l.], v, 23, n. 10, p. 409-420, set. 2009. DOI: [10.1002/aoc.1534](https://doi.org/10.1002/aoc.1534)

BAILEY, L. E.; ONG, S. D. J. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. **Journal of Pharmacological Methods**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 171-175, ago. 1978. doi:[10.1016/0160-5402\(78\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0160-5402(78)90022-0)

BALZANI, V.; JURIS, A. J. Photochemistry and photophysics of Ru (II) - polypyridine complexes in the Bologna group. From early studies to recent developments. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 211, n. 1, p. 97-115, abr. 2001. DOI: 10.1016/S0010-8545(00)00274-5

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A. *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 87, n. 4, p. 1620-1624, fev. 1990. doi: 10.1073/pnas.87.4.1620

BEEKE, A. D. J. J. C. P. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 98, n. 7, p. 5648-5646, abr. 1993. doi: 10.1063/1.464913

BEHERA, J.; MIR, I. H.; SHYAM, K. T.; GUHA, S. *et al.* Deciphering the calf thymus DNA binding potential of 5FU conjugated copper oxide nanoparticles along with its antiproliferative effects on liver cancer cells: A molecular, in silico, and in vitro approach. **Journal of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1294, p. 136426, dez. 2023. doi:10.1016/j.molstruc.2023.136426

BELOUSOFF, M. J.; TJIOE, L.; GRAHAM, B.; SPICCIA, L. Synthesis, X-ray crystal structures, and phosphate ester cleavage properties of bis(2-pyridylmethyl)amine copper(II) complexes with guanidinium pendant groups. **Inorganic Chemistry Communications**, [s.l.], v. 47, n. 19, p. 8641-8651, out. 2008. doi: 10.1021/ic8004079

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.; BEIJNEN, J. *et al.* Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 106, n. 1, p. 90-99, jan. 2012. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030

BERGAMO, A.; MASI, A.; DYSON, P. J.; SAVA, G. J. I. j. o. o. Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound. **International Journal of Oncology**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 1281-1289, dez. 2008. doi: https://doi.org/10.3892/ijo_00000119

BERTOLINI, W. L. H. M. **Complexos de rutênio com nitrosil como agentes doadores de óxido nítrico. Aspectos químicos e físico-químicos de suas aplicações como agentes terapêuticos**. 2004. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2004. doi:10.11606/D.60.2004.tde-20042006-122601.

BIGNOZZI, C. A.; CHIORBOLI, C.; MURTAZA, Z.; JONES, W. E. *et al.* Photophysical and photochemical behavior of nitro complexes of ruthenium (II). **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 6, p. 1036-1038, mar. 1993. doi:10.1021/IC00058A047

BOBKO, A. A.; IVANOV, A.; KHRAMTSOV, V. V. J. F. r. r. Discriminative EPR detection of NO and HNO by encapsulated nitronyl nitroxides. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 47, n. 2, p. 74-81, fev. 2013. doi: 10.3109/10715762.2012.746460

BORTOLAMIOL, E.; VISENTIN, F.; SCATTOLIN, T. J. Recent Advances in Bioconjugated Transition Metal Complexes for Cancer Therapy. **Applied Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 9, p. 5561, abr. 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/app13095561>

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. J. Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug Resist Updat**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 131-146, jun. 2005. doi: 10.1016/j.drug.2005.04.006

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. J. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resist Updat**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 111-122, jun. 2006. doi: 10.1016/j.drug.2006.05.002

BURYA, S. J.; LUTTERMAN, D. A.; TURRO, C. J. C. C. Absence of quenching by $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ is not proof of DNA intercalation. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 1848-1850, jan. 2011. doi: <https://doi.org/10.1039/C0CC04973E>

CÂNDIDO, M. C.; OLIVEIRA, A. M.; SILVA, F. O.; HOLANDA, A. K. *et al.* Photochemical and Electrochemical Study of the Release of Nitric Oxide from $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)^n$ Complexes (L= Imidazole, 1-Methylimidazole, Sulfite and Thiourea), Toward the Development of Therapeutic Photodynamic Agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 26, n. 9, p. 1824-1830, set. 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150159>

CARNEIRO, Z. A.; DE MORAES, J. C. B.; RODRIGUES, F. P.; DE LIMA, R. G. *et al.* Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex—A system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 105, n. 8, p. 1035-1043, ago. 2011. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.04.011

CARVALHO, E. M. **Reatividade do Nitrosilo Complexo de Ferro trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl₂**. 2015. 169 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

CARVALHO, J.; QUEIROZ, J. A.; CRUZ, C. J. J. o. C. E. Circular dichroism of G Quadruplex: A laboratory experiment for the study of topology and ligand binding. **Journal of Chemical Education**, [s.l.], v. 94, n. 10, p. 1547-1551, ago. 2017. doi:10.1021/ACS.JCHEMED.7B00160

CAULFIELD, J. L. **The chemistry of nitric oxide-induced deamination and cross-linking of DNA**. 1991. 153 f. (Doctor of Philosophy) - Department of Chemistry, University of Richmond, Massachusetts.

CHAO, X.-J.; TANG, M.; HUANG, R.; HUANG, C.-H. *et al.* Targeted live-cell nuclear delivery of the DNA 'light-switching' Ru (II) complex via ion-pairing with chlorophenolate counter-anions: the critical role of binding stability and lipophilicity of the ion-pairing complexes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 47, n. 20, p. 10520-10528, nov. 2019. doi: 10.1093/nar/gkz152

CHEN, M.; LI, H.; SHAO, J.; HUANG, Y. *et al.* Preparation of a $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ -intercalated DNA cast film using a self-standing method and its luminescence tuning by Cu^{2+}

ions and EDTA. **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l], v. 50, n. 6, p. 2043-2045, mar. 2011. doi: 10.1021/ic102128z

CHENG, L.; WANG, Y.; GUO, Y.; ZHANG, S. S. *et al.* Advancing protein therapeutics through proximity-induced chemistry. **Cell Chemical Biology**, [s.l], v. 31, n. 3, p. 428-445, out. 2023. DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.09.004

CHEVALIER, A. A.; GENTIL, L. A.; OLABE, J. A. J. Nitrosyl–nitrite interconversion in pentacyanoruthenate (II) complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, [s.l], n. 8, p. 1959-1963, 1991. doi: <https://doi.org/10.1039/DT9910001959>

CLARKE, M. J.; ZHU, F.; FRASCA, D. R. J. C. R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, [s.l], v. 99, n. 9, p. 2511-2533, set. 1999. doi: 10.1021/cr9804238.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l], v. 232, n. 69, p. 00025-00025, jan. 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00025-5)

COBB, A.; THORNTON, L. J. J. o. P. P. Sodium nitroprusside as a hyperinflation drug and therapeutic alternatives. **Journal of Pharmacy Practice**, [s.l], v.31, n. 4, p. 374-381, ago. 2018. doi: 10.1177/0897190018776396.

COUSSEAU, F. E. M. **Estudo das propriedades antioxidantes de complexos nitrosilados de rutênio**. 2012. 123f. Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

CRESPI, D.; LANDFESTER, K.; SCHUBERT, U. S. e SCHILLER, A. Potential photoactivated metallopharmaceuticals: from active molecules to supported drugs. **Chemical Communications**. v. 46, p. 6651–6662, jul. 2010. doi: 10.1039/C0CC01887B

SILVA, C. F. N.; AL-AFYOUNI, M.; XUE, C.; FERREIRA, F. H. C.; COSTA, L. A. S.; TURRO, NIKOLAOU, S. Syntheses and electronic, electrochemical, and theoretical studies of a series of μ -oxo-triruthenium carboxylates bearing orthometalated phenazines. **Dalton Transactions**, [s.l], v. 49, p. 1688–1698, jan. 2020. doi: <https://doi.org/10.1039/C9DT04435C>

DA SILVEIRA CARVALHO, J. M.; DE MORAIS BATISTA, A. H.; NOGUEIRA, N. A. P.; HOLANDA, A. K. M. *et al.* **New Journal of Chemistry**, [s.l], A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity. v. 41, n. 21, p. 13085-13095, set. 2017. doi: <https://doi.org/10.1039/C7NJ02943H>

DASHDORJ, A.; KR, J.; LIM, S.; JO, A. *et al.* Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. **BMC Medicine**, [s.l], v. 11, n. 1, p. 1-13, ago. 2013. doi: 10.1186/1741-7015-11-178

DE LA CADENA, A.; PASCHER, T.; DAVYDOVA, D.; AKIMOV, D.; HERRMANN, F.; PRESSELT, M.; WÄCHTLER, M.; DIETZEK, B. Intermolecular

exciton–exciton annihilation in phospholipid vesicles doped with $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$. **Chemical Physics Letter**, [s.l.], v. 644, p. 56–61, jan. 2016. doi:10.1016/j.cplett.2015.11.024

NETO, J. O. N.; MARINHO, M. M.; SILVEIRA, J. A. M.; ROCHA, D. G.; LIMA, N. C. B.; JÚNIOR, F. S. G.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S.; MARTINS, A. M. C.; MARINHO, A. D.; JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A. Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 228, p. 111666, mar. 2022. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111666

SOUSA, A. P.; GONDIM, A. C. S.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F.; TEIXEIRA, E. H.; VASCONCELOS, M. A.; MARTINS, P. H. R.; MEDEIROS, E. J. T.; BATISTA, A. A.; HOLANDA, A. K. M.. Biphosphinic ruthenium complexes as the promising antimicrobial agents. **New Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 44, p. 21318–21325 nov, 2020. doi: 10.1039/D0NJ03122D

DEHNE, N.; LAUTERMANN, J.; PETRAT, F.; RAUEN, U.; GROOT, H. Cisplatin Ototoxicity: Involvement of Iron and Enhanced Formation of Superoxide Anion Radicals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 174, p. 27–34. jul. 2001. doi:10.1006/taap.2001.9171

DELEO, M. A.; FORD, P. C. J. C. R. Photoreactions of coordinated nitrite ion. Reversible nitric oxide labilization from the chromium (III) complex $[\text{trans-Cr}(\text{cyclam})(\text{ONO})_2]^+$. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 208, n. 1, p. 47-59, out. 2000. doi:10.1016/S0010-8545(00)00271-X

DENNINGTON, R.; KEITH, T. e MILLAM, J. GaussView, version 5. **Semichem Inc Shawnee, Mission KS**. 2009.

ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Review**, [s.l.], v. 233–234, p. 351–371, nov. 2002. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6

DICKESON, J. e SUMMERS, L. Derivatives of 1,10-Phenanthroline-5,6-quinone. **Australian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 23, p. 1023–1027, dez. 1970. doi: 10.1071/CH9701023

DING, H.-Y.; WANG, X.-S.; SONG, L.-Q.; CHEN, J.-R.; YU, J.-H.; LI, C.; ZANG, B.-W. Aryl-modified ruthenium bis(terpyridine) complexes: Quantum yield of $^1\text{O}_2$ generation and photocleavage on DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Chemistry**, [s.l.], v. 177, p. 286–294, ago. 2006. doi: 10.1016/j.jphotochem.2005.06.008

EMAM, S. H.; SONOUSHI, A.; OSMAN, E. O.; HWANG, D.; KIM, G.-D.; HASSAN, R. A. Design and synthesis of methoxyphenyl- and coumarin-based chalcone derivatives as anti-inflammatory agents by inhibition of NO production and down-regulation of NF- κ B in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 107, p. 104630, fev. 2021. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104630

ERB, J.; SETTER, D.; SWAVEY, J.; WILLITS, F. *et al.* BODIPY-ruthenium(II) polypyridyl complexes: Synthesis, computational, spectroscopic, electrochemical, and singlet oxygen

studies. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 560, p. 121831, jan. 2024. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2023.121831>

ESPEY, M. G.; THOMAS, D. D.; MIRANDA, K. M.; WINK, D. A. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 99, p. 11127–11132, ago. 2002. doi: 10.1073/pnas.152157599

FANTONI, N. Z.; BROWN, T.; KELLETT, A. J. C. DNA-Targeted Metallodrugs: An Untapped Source of Artificial Gene Editing Technology. **ChemBioChem**, [s.l.], v. 22, n. 13, p. 2184–2205, jul. 2021. doi: 10.1002/cbic.202000838

FOLLMANN, M.; GRIEBENOW, N.; HAHN, M. G.; HARTUNG, I.; MAIS, F.J.; MITTENDORF, J.; SCHÄFER, M.; SCHIROK, H.; STASCH, J-P.; STOLL, F.; STRAUB, A. The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 52, n. 36, p. 9442–9462, ago. 2013. doi: 10.1002/anie.201302588

FRENKING, G.; KOCH, W. A. Møller–Plesset study of the electron affinities of the diatomic hydrides XH (X=Li, B, Be, C, N, O). **Journal Chemical Physics**, [s.l.], v. 84, p. 3224–3229, out. 1986. doi:10.1063/1.450832

FRIEDMAN, A. E.; CHAMBRON, J. C.; SAUVAGE, J. P.; TURRO, N. J. e BARTON, J. K. A molecular light switch for DNA: Ru(bpy)₂(dppz)²⁺. **Journal American Chemical Society**, [s.l.], v. 112, p. 4960–4962, jun. 1990. doi:10.1021/ja00168a052

FRISCH, M. J; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E. Gaussian 09. **Gaussian, Inc. Wallingford CT**. v. 32, p. 5648–5652, 2009.

Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 785–789, jan. 1988. doi: 10.1103/physrevb.37.785

GAO, Y. G.; ROBINSON, H.; WANG, A. H. J. J. E. j. o. b. High-resolution A-DNA crystal structures of d (AGGGGCCCT) An A-DNA model of poly (dG)· poly (dC). **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 261, n. 2, p. 413–420, dez. 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00270.x>

GARNER, R. N.; GALLUCCI, J. C.; DUNBAR, K. R.; TURRO, C. J. I. C. [Ru (bpy)₂(5-cyanouracil)₂]²⁺ as a potential light-activated dual-action therapeutic agent. **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 19, p. 9213–9215, ago. 2011. <https://doi.org/10.1021/ic201615u>

GILL, M. R. e THOMAS, J. A. Ruthenium (II) polypyridyl complexes and DNA - from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 8, p. 3179–3192, nov. 2012. doi: 10.1039/C2CS15299A

GOLDSTEIN, S.; RUSSO, A.; SAMUNI, A. Reactions of PTIO and Carboxy-PTIO with $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, and O_2^- . **Journal of Biological Chemistry**, [s.l], v. 278, p. 50949–50955, dez. 2003. doi: 10.1074/jbc.M308317200

GUIN, P. S.; ROY, S. J. R. J. o. G. C. Recently Reported Ru-Metal Organic Coordination Complexes and Their Application (A Review). **Russian Journal of General Chemistry**, [s.l], v. 92, n. 8, p. 1546-1561, set. 2022. <https://doi.org/10.1134/S1070363222080242>

GUO, W.; ZHENG, W.; LUO, Q.; LI, X. *et al.* Transferrin serves as a mediator to deliver organometallic ruthenium (II) anticancer complexes into cells. **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l], v. 52, n. 9, p. 5328-5338, mai. 2013. doi: 10.1021/ic4002626

HALL, M. R.; MCGILLICUDDY, E.; KAPLAN, L. J. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. **Journal - Surg Infect**, [s.l], v. 15, n. 1, p. 1-7, fev. 2014. doi: 10.1089/sur.2012.129

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015. doi: 10.1007/0-387-26741-7_3

HAY, P. J.; WADT, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. **Journal Chemical Physics**, [s.l], v. 82, p. 299–310, set. 1985. doi: 10.1063/1.448975

HAYS, F. A.; TEEGARDEN, A.; JONES, Z. J.; HARMS, M. *et al.* How sequence defines structure: a crystallographic map of DNA structure and conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l], v. 102, n. 20, p. 7157-7162, mai. 2005. doi: 10.1073/pnas.0409455102

HIGGS, P.; MCKINLEY, A.; TUIE, E. [Ru(phen)2dppz]2+ luminescence reveals nanoscale variation of polarity in the cyclodextrin cavity. **Chemical Communications**, [s.l], v. 52, p. 1883–1886, dez. 2016. doi: 10.1039/C5CC09755J

HOTTINGER, D. G.; BEEBE, D. S.; KOZHIMANNIL, T.; PRIELIPP, R. C.; BELANI, K. G. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, [s.l], v. 30, p. 462 - 471, dez. 2014. doi: 10.4103/0970-9185.142799

HUGHES, M. N. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. **Biochimica Biophysica Acta BBA - Bioenergetics**, [s.l], v. 1411, p. 263–272, mai. 1999. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00019-5

Hughes, M. N. Chapter One - Chemistry of Nitric Oxide and Related Species. in **Methods in Enzymology** (ed. Poole, R. K.) v. 436, p. 3–19, Academic Press, 2008. doi:10.1016/S0076-6879(08)36001-7

IGNARRO, L. J. **Nitric oxide: biology and pathobiology**. Academic press, 3rd Edition - July, 2017.

IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s.l.], v. 3, p. 31–36, jan. 1989. doi: 10.1096/fasebj.3.1.2642868

JANGIR, D. K.; DEY, S. K.; KUNDU, S.; MEHROTRA, R. J. *et al.* Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 114, p. 38–43, set. 2012. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.05.005

JIANG, J.; TEUNENS, T.; TISAUN, J.; DENUIT, L. e MOUCHERON, C. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes and Their Use as Probes and Photoreactive Agents for G-quadruplexes Labelling. **Molecules**, [s.l.] v. 27, p. 1541, fev. 2022. doi: 10.3390/molecules27051541

JIANG, X.; ZHU, N.; ZHAO, D.; MA, Y. New cyclometalated transition-metal based photosensitizers for singlet oxygen generation and photodynamic therapy. **Science China Chemistry**, [s.l.] v. 59, n. 1, p. 40–52, jan. 2016. doi:10.1007/s11426-015-551

JOHNSON, G. M.; CHOZINSKI, T. J.; SALMON, D. J.; MOGHADDAM, A. D.; CHEN, H. C.; MIRANDA, K. M. Quantitative Detection of Nitroxyl Upon Trapping with Glutathione and Labeling with a Specific Fluorogenic Reagent. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.] ,v. 63, p. 476–484, out. 2013. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.011

JÚNIOR, F. S. G.; DE MORAES SILVEIRA, J. A.; HOLANDA, T. M.; MARINHO, A. D. *et al.* New nitrosyl ruthenium complexes with combined activities for multiple cardiovascular disorders. **Dalton Transactions**, [s.l.] v. 52, n. 16, p. 5176–5191, mar. 2023. doi: <https://doi.org/10.1039/D3DT00059A>

KALCHER, K.; KAUFFMANN, J. M.; WANG, J.; ŠVANCARA, I. *et al.* Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: a review with particular emphasis on the period 1990–1993. **Electroanalysis**, [s.l.] v. 7, n. 1, p. 5–22, jan. 1995. doi: 10.1080/20014091076785

KANEKO, M.; KATO, A.; NAKASHIMA, S.; KITATSUJI, Y. Density Functional Theory (DFT)-Based Bonding Analysis Correlates Ligand Field Strength with 99Ru Mössbauer Parameters of Ruthenium–Nitrosyl Complexes. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 58, p. 14024–14033, out. 2019. doi: 10.1021/acs.inorgchem.9b02024

KASSIM, A.; OMUSE, G.; PREMJI, Z.; REVATHI, G. J. A. *et al.* Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s.l.], v. 15, p. 1–7, abr. 2016. DOI: 10.1186/s12941-016-0135-3

KEMP-HARPER, B. K. Nitroxyl (HNO): A Novel Redox Signaling Molecule. **Antioxidants & Redox Signaling** , [s.l.], v. 14, p. 1609–1613, abr. 2011. doi: org/10.1089/ars.2011.3937

KETTANI, A.; BOUAZIZ, S.; GORIN, A.; ZHAO, H. *et al.* Solution structure of a Na cation stabilized DNA quadruplex containing G· G· G· G and G· C· G· C tetrads formed by GGGC

repeats observed in adeno-associated viral DNA. **Journal of Molecular Biology**, [s.l], v. 282, n. 3, p. 619-636, set. 1998. doi: 10.1006/jmbi.1998.2030.

KNOWLES, R.; G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemistry Journal**, [s.l], v. 298, p. 249–258, mar. 1994. doi: 10.1042/bj2980249

KUMAR, Y. P.; DEVI, C. S.; DEEPIKA, N.; GABRA, N. M. *et al.* Synthesis, characterization, DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity and docking studies of Co^(III) mixed ligand complexes. **Transition Metal Chemistry**, [s.l], v. 38, p. 811-819, nov. 2013. doi: 10.1007/s11243-013-9753-1

KUNDU, B. K.; MUKHOPADHYAY, S. J. Target based chemotherapeutic advancement of ruthenium complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l], v. 448, p. 214169, dez, 2021. doi: 10.1016/j.ccr.2021.214169

LACROIX, P. G.; Malfant, I.; LABRA-VÁZQUEZ, P.; FÁRFAN, N. *et al.* Two-photon absorption-based delivery of nitric oxide from ruthenium nitrosyl complexes. **Dalton Transactions**, [s.l], v. 51, n. 39, p. 14833-14841, set. 2022. 10.1039/D2DT02553A.

LALA, P. K.; ORUCEVIC, A. Role of nitric oxide in tumor progression: Lessons from experimental tumors. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s.l], v. 17, p. 91–106, mar. 1998. doi: 10.1023/A:1005960822365

LARRAGY, R.; FITZGERALD, J.; PRISECARU, A.; MCKEE, V.; LEONARD, P.; KELLETT, K. Protein engineering with artificial chemical nucleases. **Chemical Communications**, [s.l], v. 51, n. 65, p. 12908–12911. jul. 2015. doi: 10.1039/C5CC04615G

LEANSE, L. G.; DOS ANJOS, C.; MUSHTAQ, S.; DAI, T. Antimicrobial blue light: A ‘Magic Bullet’ for the 21st century and beyond? **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l], v. 180, p. 114057, jan. 2022. doi: 10.1016/j.addr.2021.114057

LECHARTIER, B.; HARTKOORN, R. C.; COLE, S. T. J. A. a.; CHEMOTHERAPY. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l], v. 56, n. 11, p. 5790-5793, 2012. doi: 10.1128/AAC.01476-12

LECHNER, V. M.; NAPPI, M.; DENENY, P. J.; FOLLIET, S. *et al.* Visible-light-mediated modification and manipulation of biomacromolecules. **Chemical Reviews**, [s.l], v. 122, n. 2, p. 1752-1829, jan. 2021. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00357

LEDNICER, D. **The Organic Chemistry of Drug Synthesis**, v. 7, [s.l], ed. Wiley-Interscience, 2007, p. 111-126.

LEE, Y. L.; LO, Y. S. J. A. F. M. Highly efficient quantum-dot-sensitized solar cell based on co-sensitization of CdS/CdSe. **Advanced Functional Materials**, [s.l], v. 19, n. 4, p. 604-609, fev. 2009. DOI: 10.1002/adfm.200800940

LEESON, P. D. e SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 6, p. 881–890, nov. 2007. doi:10.1038/nrd2445

LEHNERT, N.; KIM, E.; DONG, H. T.; HARLAND, J. B.; HUNT, A. P.; MANICKAS, E. C.; OAKLEY, K. M.; PHAM, J.; REED, G. C.; ALFARO, V. S. The Biologically Relevant Coordination Chemistry of Iron and Nitric Oxide: Electronic Structure and Reactivity. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 121, n. 24, p. 14682 - 14905, dec. 2021. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00253

LI, G.; SUN, L.; JI, L. e CHAO, H. Ruthenium(ii) complexes with dppz: from molecular photoswitch to biological applications. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 45, p.13261–13276, jul. 2016. doi: 10.1039/C6DT01624C

LI, K. S.; JORDAN, D.; LIN, L. Y.; MCCARTHY, S. E. *et al.* Crystal Structure of an i-Motif from the HRAS Oncogene Promoter. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 26, n. 62, p. 26. p. 202301666, jun. 2023. doi: 10.1002/anie.202301666.

LI, P.; YIN, R.; CHENG, J.; LIN, J. J. I. J. o. M. S. Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 14, p. 11680, jul. 2023. doi: 10.3390/ijms241411680.

LISKA, P.; VLACHOPOULOS, N.; NAZEERUDDIN, M. K.; COMTE, P. e GRAETZEL, M. cis-Diaquabis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylate)ruthenium(II) sensitizes wide band gap oxide semiconductors very efficiently over a broad spectral range in the visible. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 110, p. 3686–3687, mai, 1988.

LOPES, L. G. F.; WIERASZKO, A.; EL-SHERIF, Y. CLARKE, M. J. The translabilization of nitric oxide in RuII complexes by C-bound imidazoles. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 312, p. 15–22, jan. 2001. doi: 10.1016/S0020-1693(00)00341-8

LUCACIU, R. L.; HANGAN, A. C.; SEVASTRE, B.; OPREAN, L. S. Metallo-drugs in cancer therapy: Past, present and future. **Molecules**, [s.l.], v. 27, n. 19, p. 6485, out. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27196485>

MADEC, H.; FIGUEIREDO, F.; CARIOU, K.; ROLAND, S. *et al.* Metal complexes for catalytic and photocatalytic reactions in living cells and organisms. **Chemical Science**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 409-442, dez. 2023. doi: <https://doi.org/10.1039/D2SC05672K>

MAHADEVAN, S. e PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies of copper (II) complexes of bis (pyrid-2-yl)-di/trithia ligands bound to calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 254, n. 2, p. 291–302, jan. 1997. doi: 10.1016/S0020-1693(96)05175-4

MALAGOLI, D. J. I. S. J. A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes. **Invertebrate Survival Journal**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 92-94, set. 2007.

MALINA, J.; NOVAKOVA, O.; KEPPLER, B. K.; ALESSIO, E. *et al.* Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium

(III) in cell-free media. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 6, p. 435-445, abr. 2001. doi: 10.1007/s007750100223

MARQUES, M. A.; MAITRA, N. T.; NOGUEIRA, F. M.; GROSS, E. K. *et al.* **Fundamentals of time-dependent density functional theory**. Springer, 2012.

MARTINS, P. H.; ROMO, A. I.; DA SILVA, F. O.; NASCIMENTO, O. R. *et al.* Reactivity of a nitrosyl ruthenium complex and its potential impact on the fate of DNA—An in vitro investigation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 238, p. 112052, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112052>

McCONNELL, A. J., SONG, H. e BARTON, J. K. Luminescence of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ Bound to RNA Mismatches. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 52, p.10131–10136, ago. 2013. doi: 10.1021/ic401531r

MCQUAID, K.; ABELL, H.; GURUNG, S. P.; Allan, D. R.; WINTER, G.; SORENSEN, T.; CARDIN, D. J.; BRAZIER, J. A.; CARDIN, C. J.; HALL, J. P. Structural Studies Reveal Enantiospecific Recognition of a DNA G-Quadruplex by a Ruthenium Polypyridyl Complex. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 58, n. 29, p. 9881–9885. jul. 2019. doi: 10.1002/anie.201814502

MENNUCCI, B.; CANCÈS, E.; TOMASI, J. Evaluation of Solvent Effects in Isotropic and Anisotropic Dielectrics and in Ionic Solutions with a Unified Integral Equation Method: Theoretical Bases, Computational Implementation, and Numerical Applications. **Journal Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 101, p. 10506–10517, dez. 1997. doi:10.1021/jp971959k

METZLER-NOLTE, N.; SCHATZSCHNEIDER, U. **Bioinorganic chemistry: a practical course**, [s.l.], ed. Walter de Gruyter, 2009, p. 138

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. J. F. R. B.; **MEDICINE. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 95-108, 1990.

MIRANDA, K. M.; RIDNOUR, L. A.; MCGINITY, C. L.; BHATTACHARYYA, D. *et al.* Nitric oxide and cancer: when to give and when to take away? **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 21, p. 15941-15947, nov, 2021. doi: 10.1021/acs.inorgchem.1c02434

MORRIS, R. E.; AIRD, R. E.; DEL SOCORRO MURDOCH, P.; CHEN, H. *et al.* Inhibition of cancer cell growth by ruthenium (II) arene complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 22, p. 3616-3621, out. 2001. doi: 10.1021/jm010051m.

MUHAMMAD, N.; GUO, Z. J. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s.l.], v. 19, p. 144-153, abr. 2014. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.02.003.

MUNIZ, E. C.; SILVA, E. H. S.; BERNARDES- GÉNISSON, V.; LOPES, L. G. F. When NO. Is not Enough: Chemical Systems, Advances and Challenges in the Development of NO. and HNO Donors for Old and Current Medical Issues. **European Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 2021, p. 4316–4348, nov. 2021.

- NAPOLI, C.; NIGRIS, F.; IGNARRO, S.W.; PIGNALOSA, O.; SICA, V.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 265–279, dez. 2006. doi: 10.1016/j.niox.2006.03.011
- NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; ARRIECHE, D.; MARCHAN, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **Journal Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 97, p. 364–369, dez. 2003. doi: 10.1016/S0162-0134(03)00290-3
- OLIVEIRA, G. d. F. S.; GOUVEIA, F. S.; DE AZEVEDO PINHEIRO, A.; DO NASCIMENTO NETO, L. G. *et al.* An anthracene-pendant ruthenium (II) complex conjugated to a biotin anchor, an essential handle for photoinduced anti-cancer activity. **New Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 44, p. 6610–6622. abr.2020. doi: 10.1039/D0NJ00209G
- PARAMASIVAN, S.; RUJAN, I.; BOLTON, P. H. J. M. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. **Methods**, [s.l.], v. 43, n. 4, p. 324–331, dez, 2007. doi: 10.1016/j.jymeth.2007.02.009.
- PAZ, I. A. **Síntese, caracterização e avaliação cinética de vasodilatação com complexos metálicos doadores de óxido nítrico**. 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- PERDISATT, L.; MOQADASI, S.; O'NEILL, L.; HESSMAN, G. *et al.* Synthesis, characterisation and DNA intercalation studies of regioisomers of ruthenium (II) polypyridyl complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 182, p. 71–82, mai. 2018. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.018.
- PEREIRA, W. G. **Síntese e funcionalização de nitrosilo complexos de rutênio do tipo cis-[Ru(bpy)₂(L)NO] em nanopartículas metálicas**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- POYNTON, F.; BRIGHT, S. A.; WILLIAMS, D. C.; KELLY, J. M.; GUNNLAUGSSON, T. The development of ruthenium (II) polypyridyl complexes and conjugates for in vitro cellular and in vivo applications. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 46, n. 24, p. 7706–7756, nov. 2017. doi: 10.1039/C7CS00680B
- PRATHIMA, T. S.; CHOUDHURY, B.; AHMAD, M. G.; CHANDA, K. *et al.* Recent developments on other platinum metal complexes as target-specific anticancer therapeutics. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 490, p. 215231, 2023. DOI:10.1016/j.ccr.2023.215231
- PRIYA, F. C.; KUMAR, D. S. J. pH dependent spectrophotometric study, cytotoxicity and antimicrobial activity of mononuclear ruthenium (II) polypyridine complexes. **Materials Today Proceedings**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 317–321, mar. 2023. DOI: 10.1016/j.matpr.2023.03.361

PYLE, A. M.; REHMANN, J. P.; MESHOYRER, R.; KUMAR, C. V.; TURRO, N.J.; BARTON, J. K. Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l], v. 111, p. 3051–3058, ago. 1989. doi:10.1021/ja00190a046

RADI, R. Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. **Actas de Fisiología**, , [s.l], v. 6, p. 123-130, 2000.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina: estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l], v. 42, p. 59–68, mar. 2006. doi: 10.1590/s1516-93322006000100006

RAMOS, L. C.; BIAZZOTTO, J. C.; UZUELLI, J. A.; LIMA, R. G.; SILVA, R. S. Ruthenium Complexes as NO Donors: Perspectives and Photobiological Applications. **Ruthenium Complexes Photochemical and Biomedical Applications**, [s.l], v. 1, p. 257–270, fev. 2018. doi:10.1002/9783527695225

RAMOTOWSKA, S.; CIESIELSKA, A.; MAKOWSKI, M. J. M. What can electrochemical methods offer in determining DNA–drug interactions? **Molecules**. v. 26, n. 11, p. 3478, jun. 2021. doi: 10.3390/molecules26113478

RIDNOUR, L. A.; THOMAS, D. D.; MANCARDI, D.; ESPEY, M. G. *et al.* The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biological Chemistry**. , [s.l], v. 385, n. 1, p. 1-10. jan. 2004. doi: 10.1515/BC.2004.001

RIEDL, C. A.; ROSNER, A.; HARRINGER, S.; SALOMON, P. *et al.* Water-soluble trithiolato-bridged dinuclear ruthenium (II) and osmium (II) arene complexes with bisphosphonate functionalized ligands as anticancer organometallics. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l], v. 225, p. 111618, dez. 2021. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111618

RODRÍGUEZ, D.; JOSÉ, M. **Compostos carbonílicos heterobimetálicos de Ru(II)/Fe(II) : propriedades citotóxicas e estudo da interação com BSA e DNA. 2016.** Dissertação (Mestrado em Química). – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

RONCAROLI, F.; RUGGIERO, M. E.; FRANCO, D. W.; ESTIÚ, G. L.; OLABE, J. A. Kinetic, mechanistic, and DFT study of the electrophilic reactions of nitrosyl complexes with hydroxide. **Inorganic Chemistry**. , [s.l], v. 41, n. 22, p. 5760–5769, out. 2002. doi: doi.org/10.1021/ic025653q

ROSATO, A.; VITALI, C.; DE LAURENTIS, N.; ARMENISE, D. *et al.* Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, [s.l], v. 14, n. 11, p. 727-732, nov. 2007. doi: 10.1016/j.phymed.2007.01.005

ROSSI, L. M.; NEVES, A.; HÖRNER, R.; TERENCEZI, H. *et al.* Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l], v. 337, n. 0, p. 366-370, jun. 2002. DOI: 10.1016/s0020-1693(02)01111-8

SÁ, D. S.; FERNANDES, A. F.; SILVA, C. D. S.; COSTA, P. P. C.; FONTELES, M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S. Non-nitric oxide based metallovasodilators: synthesis, reactivity and biological studies. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 44, p. 13633–13640, jun. 2015. doi: 10.1039/C5DT01582K

SAMUNI, U.; SAMUNI, Y.; GOLDSTEIN, S. On the distinction between nitroxyl and nitric oxide using nitronyl nitroxides. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 132, p.8428–8432, jun. 2010. doi: 10.1021/ja101945j

SAUAIA, M. G.; SOUZA, O. F.; TEDESCO, A. C.; SANTANA, S. R. Control of NO release by light irradiation from nitrosyl–ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 355, p. 191–196, nov. 2003. doi: 10.1016/S00201693(03)00271-8

SAVA, G.; BERGAMO, A.; DYSON, P. J. J. D. T. Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next? **Dalton Transsaction**, [s.l.], v. 40, n. 36, p. 9069-9075, jul. 2011. doi: <https://doi.org/10.1039/C1DT10522A>

EL-HABEEB, Abeer A.; REFAT, Moamen S. Synthesis, spectroscopic characterizations and biological studies on gold (III), ruthenium (III) and iridium (III) complexes of trimethoprim antibiotic drug. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 701-714, mar. 2024. DOI: 10.4314/bcse.v38i3.12

SAYES, C. M.; REED, K. L.; WARHEIT, D. B. J. T. s. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 1, p. 163-180, mai. 2007. 10.1093/toxsci/kfm018

CHAUDHARY, Kabi R.; SINGH, Karanvir; SINGH, Charan. Recent updates in inhalable drug delivery system against various pulmonary diseases: challenges and future perspectives. **Current Drug Delivery**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 1320-1345, 2024. doi: <https://doi.org/10.2174/0115672018265571231011093546>

SERBANESCU, M. A.; APPLE, C. G.; FERNANDEZ-MOURE, J. S. J. S. I. Role of Resident Microbial Communities in Biofilm-Related Implant Infections: Recent Insights and Implications. **Journal - Surg Infect**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 258-264, 2023. DOI:10.1089/sur.2023.009

SHIMADA, K.; JONG, C. J.; TAKAHASHI, K.; SCHAFFER, S. W. Role of ROS production and turnover in the antioxidant activity of taurine. **Taurine** 9, [s.l.], v. 803, p. 581–596, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-15126-7_47

SIES, H.; CADENAS, E. J. P. T. o. t. R. S. o. L. B., Biological Sciences. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, [s.l.], v. 311, n. 1152, p. 617-631, dez. 1985. doi: 10.1098/rstb.1985.0168

SILVA, C. D. S.; PAZ, I. A.; ABREU, F. D.; SOUSA, A. P.; VERÍSSIMO, C. P.; NASCIMENTO, N. R. F.; PAULO, T. F.; ZAMPIERI, D.; EBERLIN, M.N.; GONDIM, A.C.S.; ANDRADE, L. C.; CARVALHO, I.M. M.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F. Thiocarbonyl-bound metallonitrosyl complexes with visible-light induced DNA cleavage and

promising vasodilation activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 182, p. 83–91, mai. 2018. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.02.005

SILVA, C. D. S. d. **Síntese, Caracterização, Reatividade e Aplicações Biológicas de Complexos de Ru(II) contendo tioamidas**. 2017. 180 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017

SILVA, F. O.; Araújo, S. X. B.; HOLANDA, A. K. M.; MEYER, E.; SALES, F. A. M.; DIÓGENES, I. C. N.; CARVALHO, I. M. M.; MOREIRA, Í. S.; LOPES, L. G. F. Synthesis, Characterization, and NO Release Study of the cis-and trans-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ Complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 2006, n. 10, p. 2020-2026, mai. 2006. doi: 10.1002/ejic.200500871

SILVA, F. O. N.; CÂNDIDO, M. C. L.; HOLANDA, A. K. M.; DIÓGENES, I. C. N.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F. Mechanism and biological implications of the NO release of cis-[Ru(bpy)₂L(NO)]ⁿ⁺ complexes: A key role of physiological thiols. **Journal Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 105, n. 5, p. 624–629, mai. 2011. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.02.004

SILVA, F.O.N. **Síntese, caracterização e reatividade de novos nitrosilo complexos de rutênio, tendo como ligante auxiliar a 2,2-bipiridina**. 2004. 121 f. 76 Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SILVA, H. V. R.; DIAS, J. S. M.; SILVA, G. A. F. S.; VEGAS, L. C. V.; IONTA, M.; CORRÊA, C. C.; BATISTA, A. A.; BARBOSA, M. I. F.; DORIGUETTO, A. C. Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, [s.l.], v. 144, p. 55–65, abr. 2018. doi: 10.1016/j.poly.2018.01.005

SOUSA, E. H. S.; RIDNOUR, L. A.; GOUVEIA JR, F. S. G.; SILVA, C. D. S.; WINK, D. A.; LOPES, L. G. F.; SADLER, P. J. Thiol-Activated HNO Release from a Ruthenium Antiangiogenesis Complex and HIF-1 α Inhibition for Cancer Therapy. **ACS Chemical Biology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 2057–2065, mai. 2016. doi:10.1021/acscchembio.6b00222

SINGH, T. N.; TURRO, C. J. I. c. Photoinitiated DNA Binding by cis-[Ru (bpy)₂(NH₃)₂]²⁺ **Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], v.43, n. 23, p. 7260-7262, nov. 2004. doi: 10.1021/ic049075k

SMULIK-IZYDORCZYK, R.; DEBOWSKA, K.; ROSTKOWSKI, M.; ADAMUS, J.; MICHALSKI, R.; SIKORA, A.. Kinetics of Azanone (HNO) Reactions with Thiols: Effect of pH. **Cell Biochemistry Biophysics**, [s.l.], v. 79, p. 845–856, mai. 2021. doi: 10.1007/s12013-021-00986-x

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiol Methods**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6

STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C. F.; FRISCH, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density

Functional Force Fields. **Journal Physical Chemistry**, [s.l.], v. 98, n. 45, p. 11623–11627, nov. 1994. <https://doi.org/10.1021/j100096a001>

SUBHASH; JYOTI; PHOR, A.; CHAUDHARY, A. Synthesis, Structural Elucidation, Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant, Density Functional Theory and Molecular Docking Studies of Mononuclear Ru(II) Complexes of N4O4-Bearing Macrocyclic Ligands. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, [s.l.], v. 34, p. 827-847, set. 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s10904-023-02862->

SUGIYAMA, H.; KAWAI, K.; MATSUNAGA, A.; FUJIMOTO, K. *et al.* Synthesis, structure and thermodynamic properties of 8-methylguanine-containing oligonucleotides: Z-DNA under physiological salt conditions. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 24, n. 7, p. 1272-1278, abr. 1996. doi: 10.1093/nar/24.7.1272

SUN, Q.; LI, Y.; SHI, H.; WANG, Y. *et al.* Ruthenium complexes as promising candidates against lung cancer. **Molecules**, [s.l.], v. 26, n. 15, p. 4389, 2021. doi: 10.3390/molecules26154389

SÜZEN, S.; DEMİRCİGİL, B. T.; BUYUKBINGOL, E.; ÖZKAN, S. A. J. N. J. o. C. Electroanalytical evaluation and determination of 5-(3'-indolyl)-2-thiohydantoin derivatives by voltammetric studies: possible relevance to in vitro metabolism. **New Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 1007-1011, may, 2003. DOI: 10.1039/B300160C

SVENSSON, F. R.; MATSON, M.; LI, M.; LINCOLN, P. Lipophilic ruthenium complexes with tuned cell membrane affinity and photoactivated uptake. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 149, n. 3, p. 102–106, jul. 2010. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.006

TAHGHIGHI, A. Importance of metal complexes for development of potential leishmanicidal agents. **Journal Organometallic Chemistry**, [s.l.], v. 770, p. 51–60, nov. 2014. doi: 10.1016/j.jorganchem.2014.08.007

TAN, J.; WANG, B.; ZHU, L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 727-739, jun. 2009. doi: 10.1007/s00775-009-0486-8

TANIELIAN, C.; WOLFF, C.; ESCH, M. Singlet Oxygen Production in Water: Aggregation and Charge-Transfer Effects. **Journal of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 100, p. 6555–6560, abr. 1996. doi.org/10.1021/jp952107s

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W. *et al.* The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 18-31, jul. 2008. doi: 10.1016/j.freeradiomed.2008.03.020

TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C.; JAKUPEC, M. *et al.* NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application Chem. **Chemical Science**, [s.l.], v. 5, p. 2925-2932, 2014. doi: <https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, [s.l.], v.189, n. 1–2, p. 41-54, jul. 2003. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00151-3

VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; DE ALENCAR, D. B.; SAKER-SAMPAIO, S. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of derriobtusone A isolated from *Lonchocarpus obtusus*. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2014, n. 2014, p. 248656, jun, 2014. doi: 10.1155/2014/248656

WANG, J.-Q.; ZHANG, P.-Y.; JI, L.-N.; CHAO, H. J. J. o. I. B. A ruthenium (II) complex inhibits tumor growth in vivo with fewer side-effects compared with cisplatin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 146, p. 89-96, mai. 2015. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.02.003

WANG, J.; CHICHARRO, M.; RIVAS, G.; CAI, X. *et al.* DNA biosensor for the detection of hydrazines. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 13, p. 2251-2254, Jul, 1996. doi: 10.1021/ac9600619

WENDE, C.; LÜDTKE, C.; KULAK, N. J. E. J. o. I. C. Copper Complexes of N-Donor Ligands as Artificial Nucleases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 2014, n. 16, p. 2597-2612, jun. 2014. DOI: 10.1002/ejic.201400032

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. J. D. t. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 39, n. 35, p. 8113-8127, 2010. doi:https://doi.org/10.1039/C0DT00292E

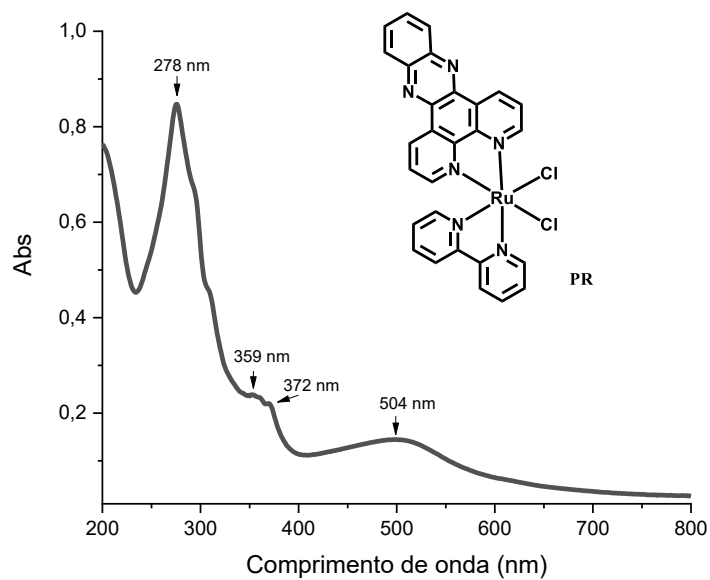
YAO, S.; LI, H.; GUO, Q.; XU, Z. *et al.* DNA-promoted electrochemical assembly of [Ru(bpy)₂dpp]^{3+/2+} on the ITO electrode by introducing copper (II) ion. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 53, n. 16, p. 5169-5173, 2008. DOI: 10.1016/j.electacta.2008.02.061

ZAPATA, A. L.; KUMAR, M. R.; PERVITSKY, D.; FARMER, P. J. A singular value decomposition approach for kinetic analysis of reactions of HNO with myoglobin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 118, p. 171–178, jan. 2013. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.10.005

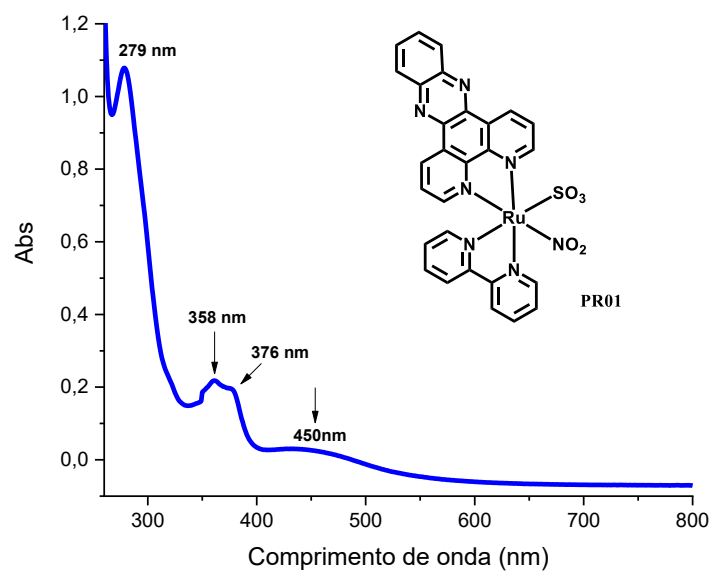
ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 1, n. 44, p. 4565-4579, set. 2007. doi: 10.1039/B710949K.

**APÊNDICE A - ESPECTRO ELETRÔNICO NA REGIÃO DO UV-VIS DO
COMPLEXO PR (A), PR01 (B) E PR02 (C) EM DMSO NA CONCENTRAÇÃO 20
 $\mu\text{MOL L}^{-1}$**

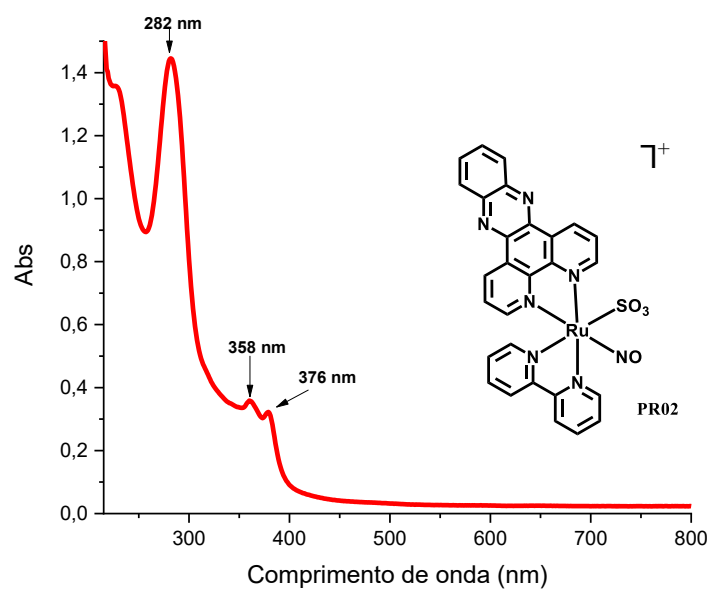
a)



b)

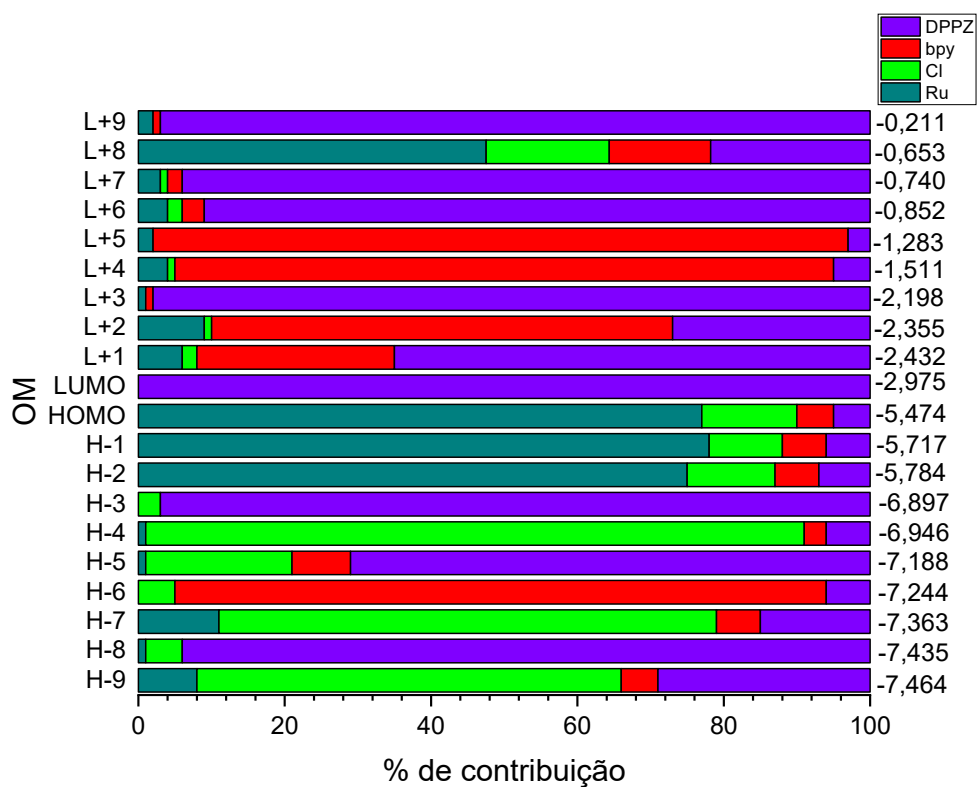


c)

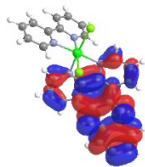


**APÊNDICE B - CONTRIBUIÇÕES DOS ORBITAIS MOLECULARES DA
ESPÉCIE PR EM FUNÇÃO DE SEUS FRAGMENTOS Ru (—), bpy (—), Cl (—) e**

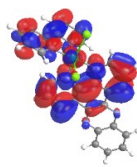
dppz (—).



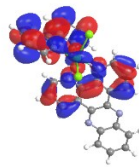
**APÊNDICE C - SUPERFÍCIES DE CONTORNO DOS ORBITAIS
MOLECULARES DO COMPLEXO PR CALCULADOS POR TD-DFT**



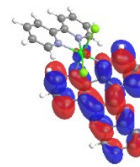
LUMO



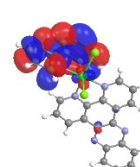
L+1



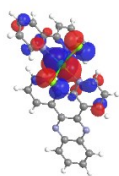
L+2



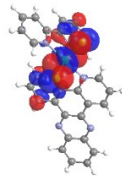
L+3



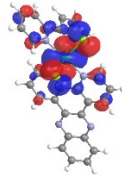
L+4



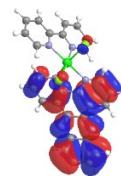
HOMO



H-1



H-2

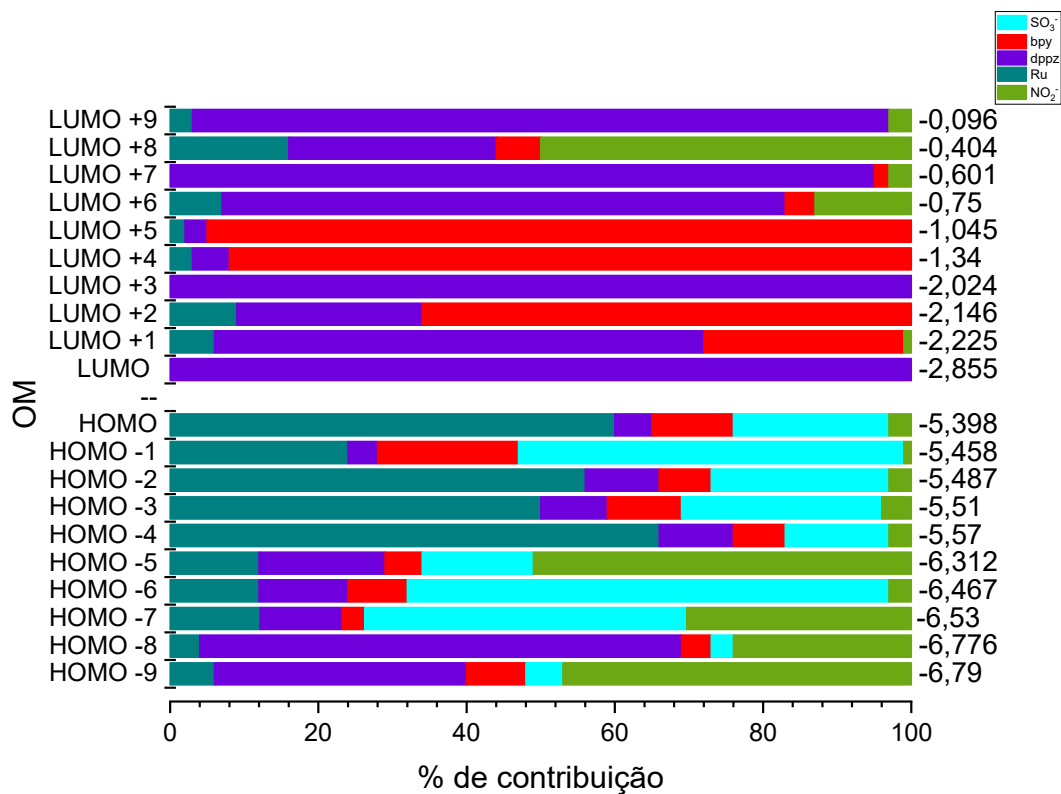


H-3

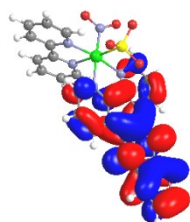


H-4

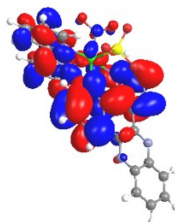
**APÊNDICE D - CONTRIBUIÇÕES DOS ORBITAIS MOLECULARES DA
ESPÉCIE PR01 EM FUNÇÃO DE SEUS FRAGMENTOS RU (—), BPY (—), DPPZ
(—), SO_3^{2-} (—) E NO_2^- (—).**



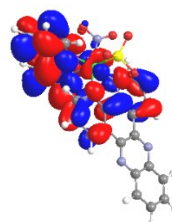
**APÊNDICE E - SUPERFÍCIES DE CONTORNO DOS ORBITAIS
MOLECULARES DO COMPLEXO PR01 CALCULADOS POR TD-DFT**



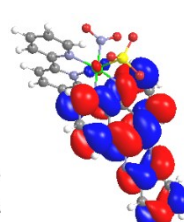
LUMO



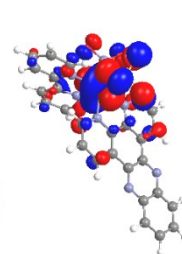
L+1



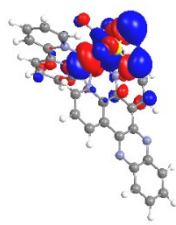
L+2



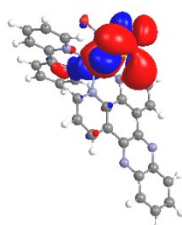
L+3



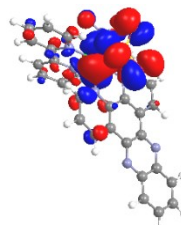
L+4



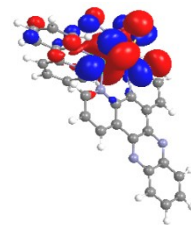
HOMO



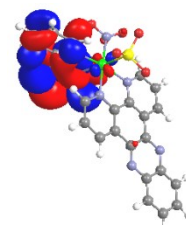
H-1



H-2

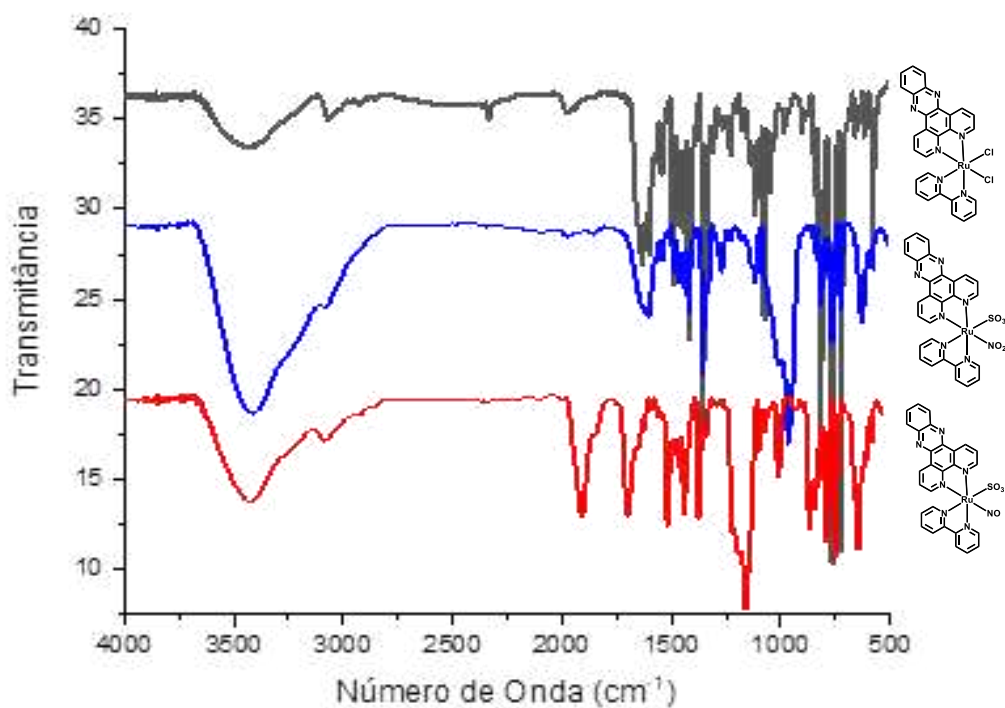


H-3

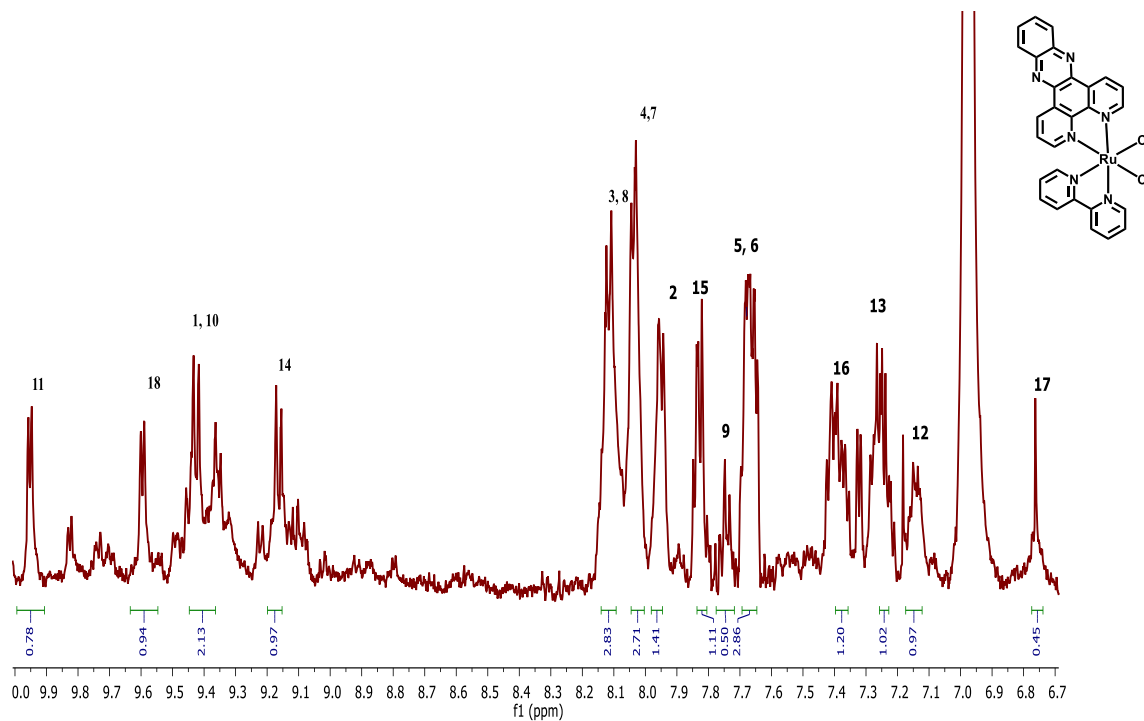


H-4

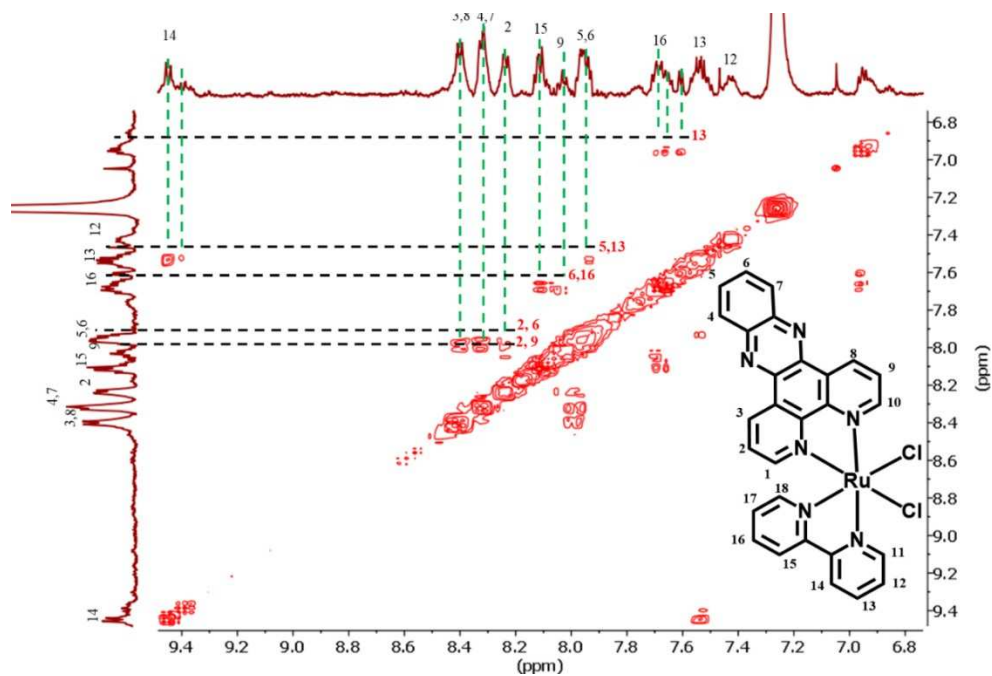
**APÊNDICE F - ESPECTRO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO DOS COMPLEXOS PR (—), PR01 (—) E PR02 (—), EM
PASTILHA DE KBr**



**APÊNDICE G - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H PARA
O COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})(\text{DPPZ})\text{Cl}_2]$ - PR EM CLOROFÓRMIO/METANOL (3:1),
OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 500 MHZ**

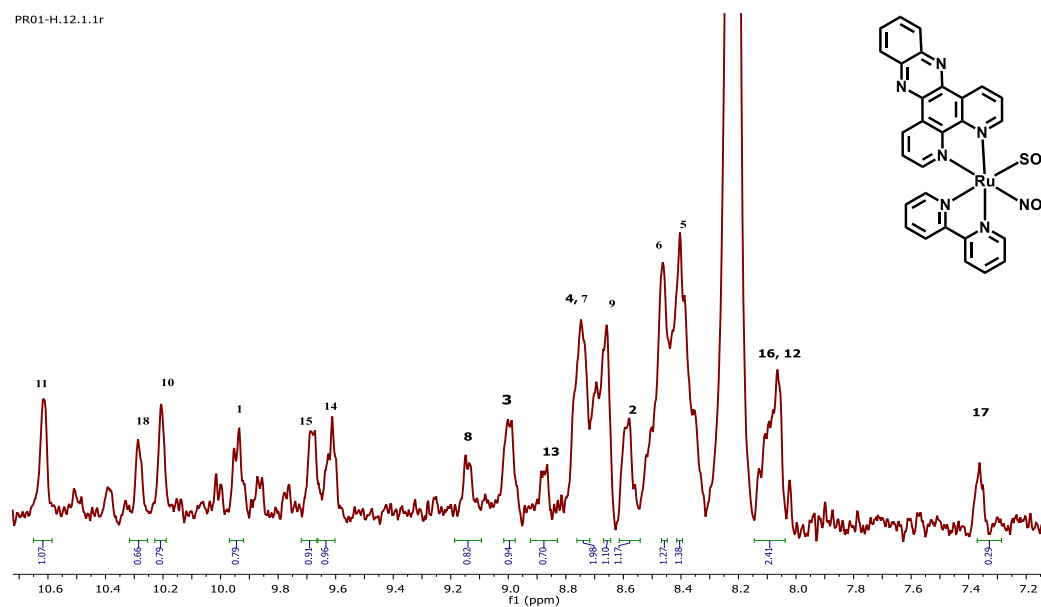


**APÊNDICE H - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H
BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO PR EM CLOROFÓRMIO/METANOL
(3:1) DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHZ**

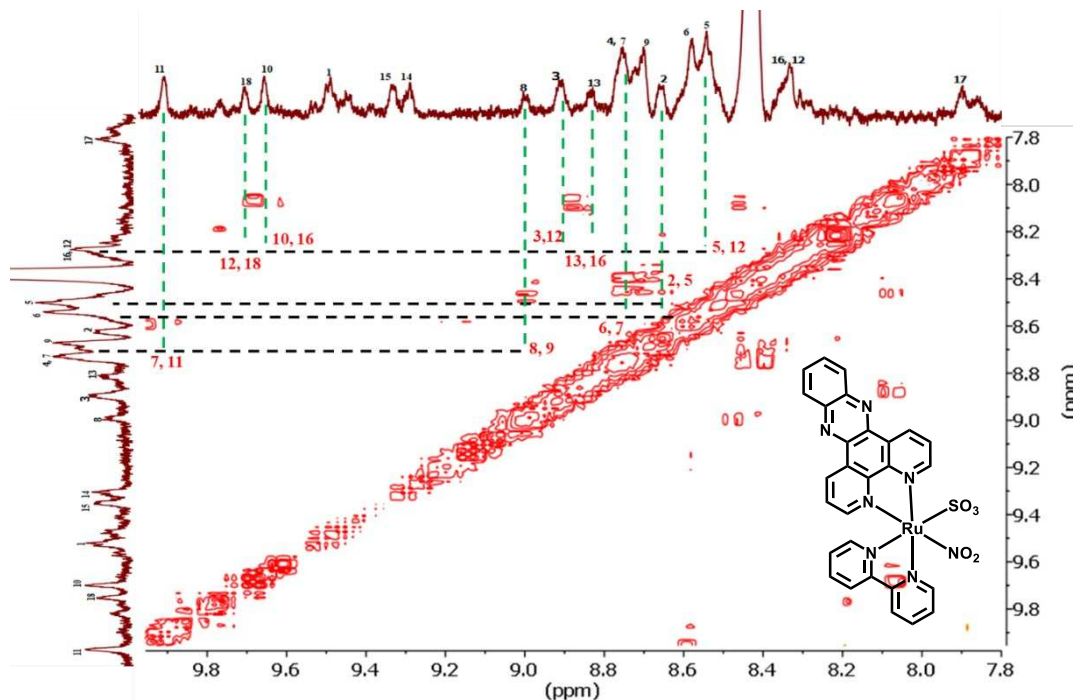


**APÊNDICE I - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H PARA
O COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})(\text{DPPZ})(\text{SO}_3)(\text{NO}_2)]$ – PR01 EM DMF DEUTERADO,
OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 500 MHZ**

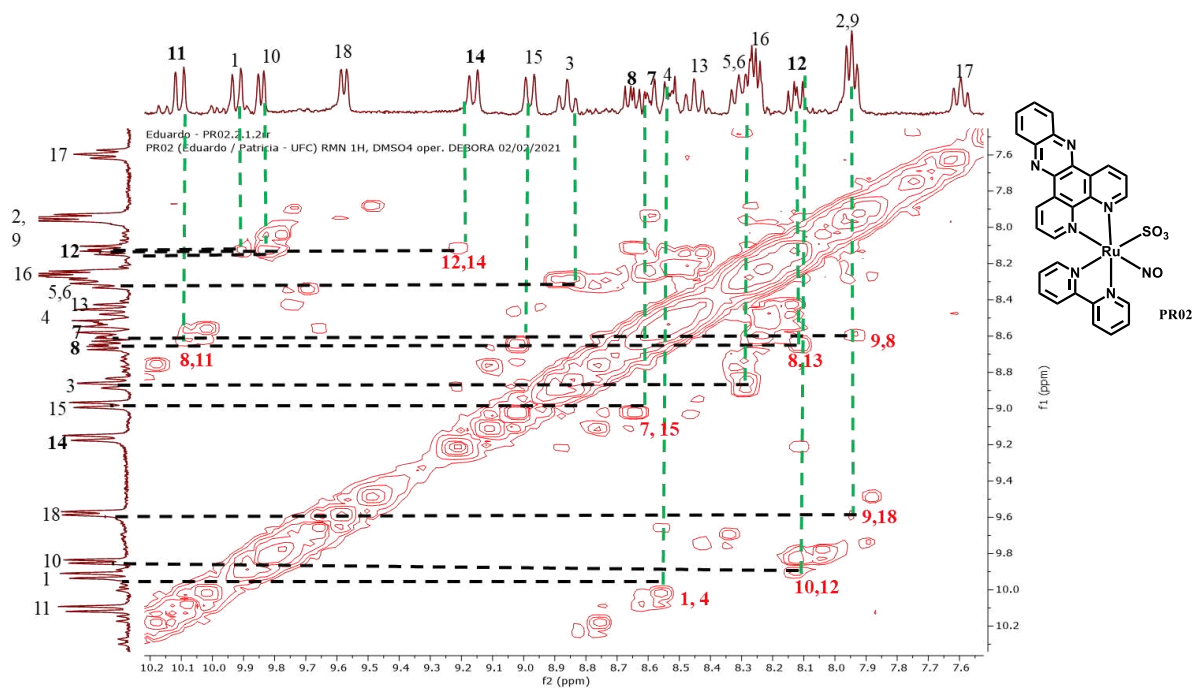
PR01-H.12.1.1r



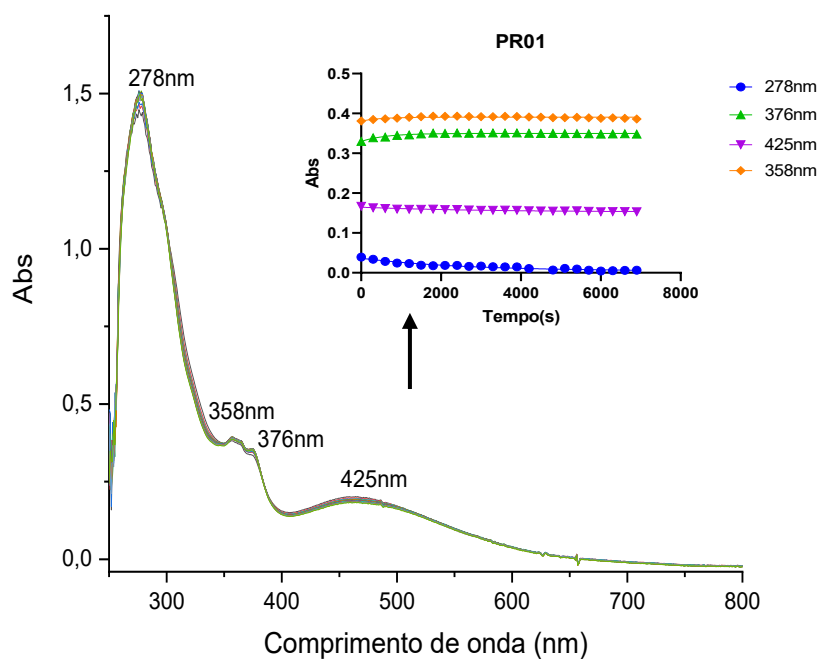
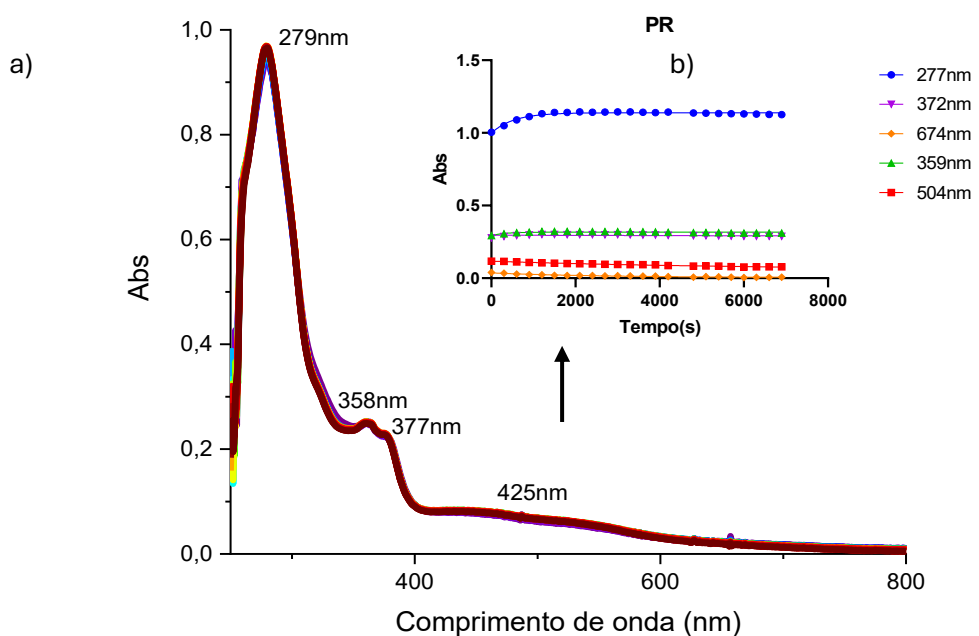
**APÊNDICE J - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H
BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO PR01 EM DMF DEUTERADO, OBTIDO
NA FREQUÊNCIA DE 500 MHZ**



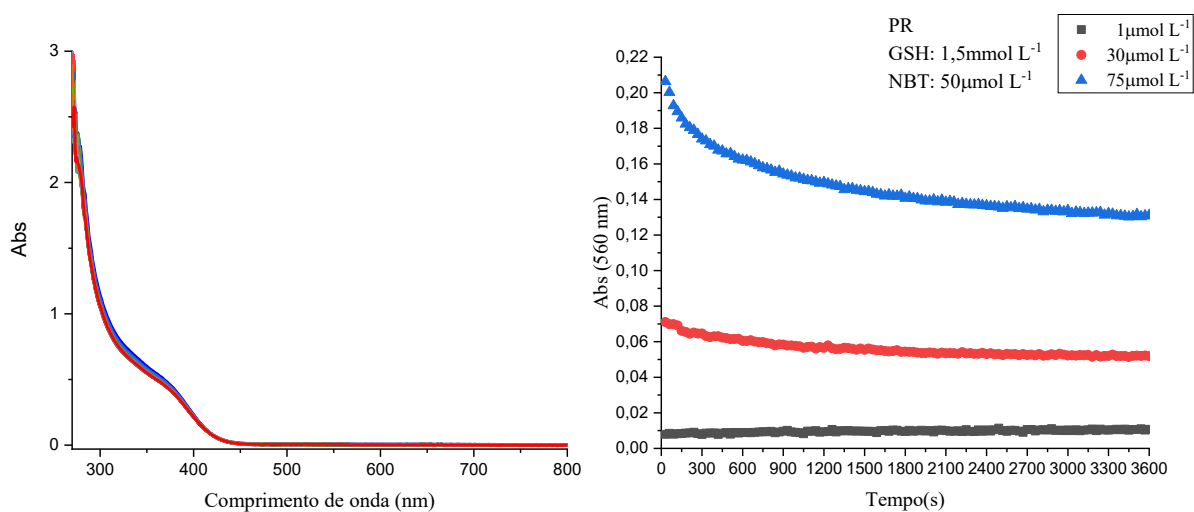
**APÊNDICE K - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H
BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO PR02 EM DMSO, OBTIDO NA
FREQUÊNCIA DE 300 MHZ**



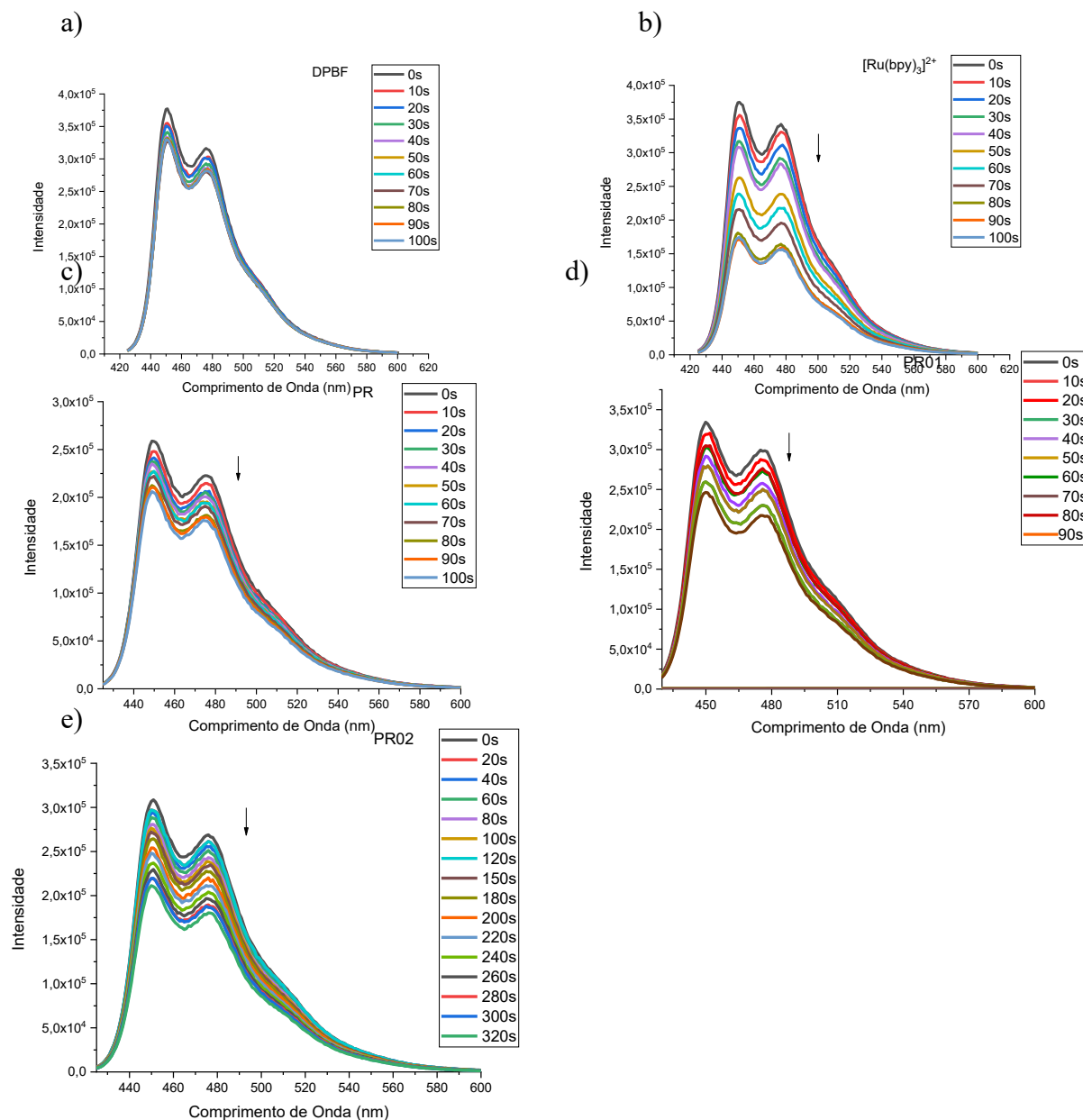
**APÊNDICE L - ESTUDO CINÉTICO DOS COMPLEXOS PR E PR01 NA
CONCENTRAÇÃO DE 20 μ MOL L⁻¹ EM TAMPÃO FOSFATO 0,1 MOL L⁻¹ PH 7,4
EM 5% DE DMSO NA AUSÊNCIA DE LUZ, MONITORADO POR 2H**



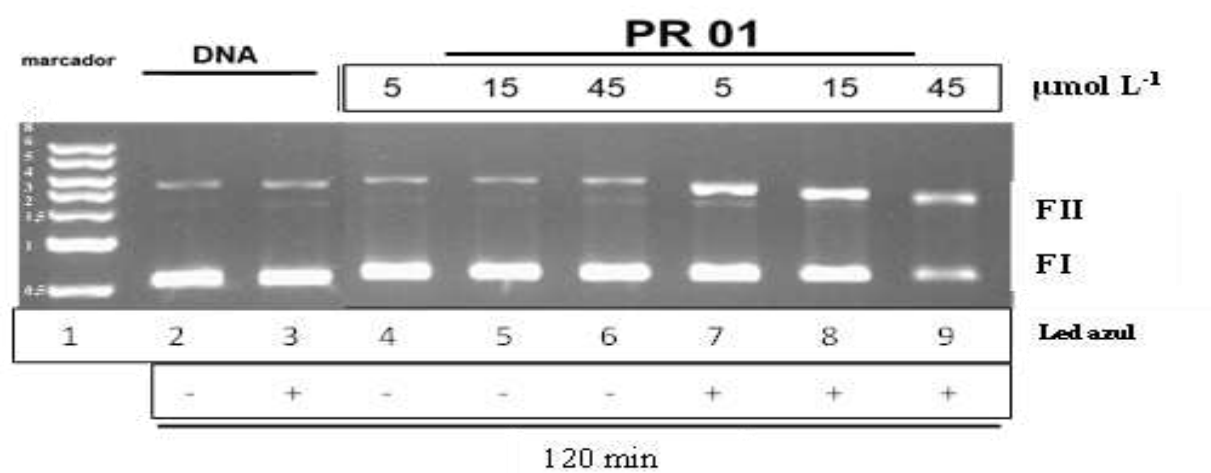
**APÊNDICE M - MONITORAMENTO DE REATIVIDADE DO COMPLEXO
PR 20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$ EM TAMPÃO FOSFATO 0,1 MOL L^{-1} EM PH 7,4, SOB
IRRADIAÇÃO DE LUZ AZUL POR 2H, NA PRESENÇA DE NBT (A) E
ACOMPANHAMENTO DA BANDA 560 NM NA PRESENÇA DO COMPLEXO NAS
CONCENTRAÇÕES DE 1 $\mu\text{MOL L}^{-1}$, 30 $\mu\text{MOL L}^{-1}$ E 75 $\mu\text{MOL L}^{-1}$ (B)**

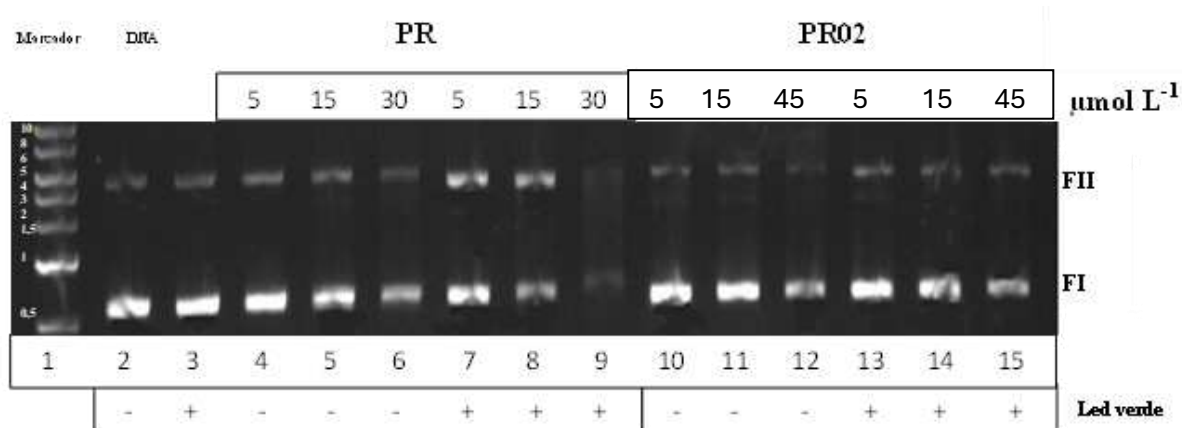
1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$

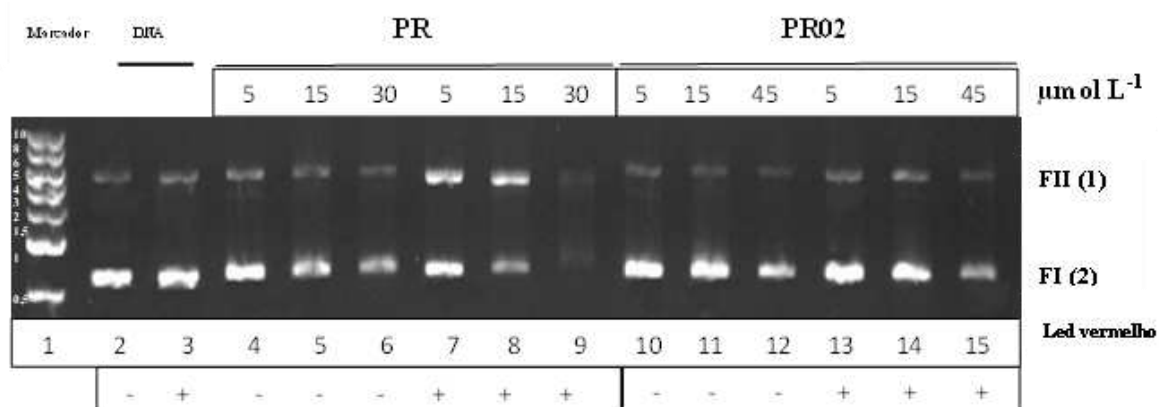
APÊNDICE N - ESPECTROS DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO, APENAS COM (A) DPBF, NA PRESENÇA DE (B) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, (C) PR, (D) PR01 E (E) PR02. FENDAS: 0,3 MM, $\Delta_{EXC} = 410\text{NM}$. TEMPO DE IRRADIAÇÃO VARIANDO DE 0 – 320S. AMOSTRAS IRRADIADAS *EX SITU* USANDO LED AZUL



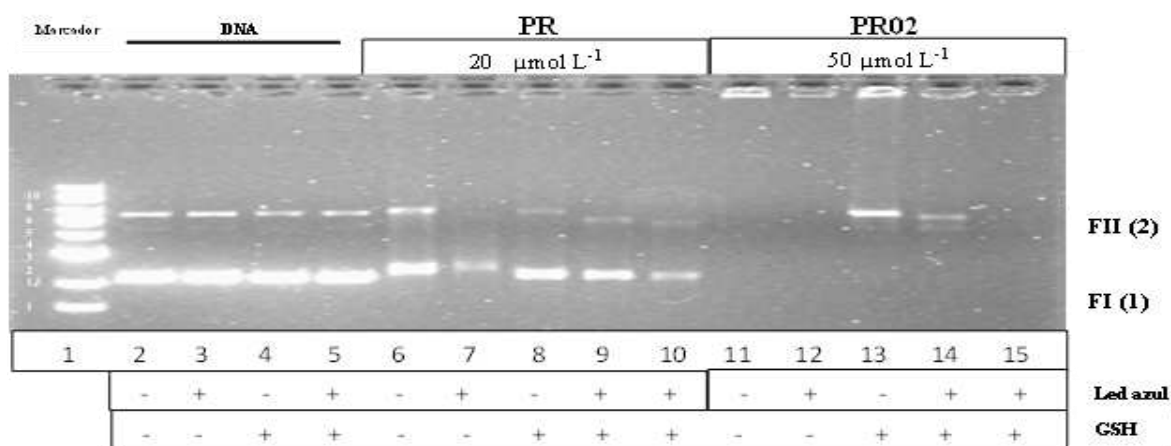
APÊNDICE O - ENSAIO DE FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS PR01 EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL L^{-1} , PH 7,4 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO ESCURO E APÓS 120 MIN DE IRRADIAÇÃO EM LED AZUL ($\lambda_{\text{MÁX}} = 458 \text{ NM}$). POÇO 1: MARCADOR DE FITAS LINEARES DE DNA (*MOLECULAR LADDER*). POÇO 2: APENAS DNA PBR322 NO ESCURO E POÇO 3: APENAS DNA PBR322 COM LUZ. POÇOS 4 - 9: COMPLEXOS + DNA PBR322 NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 15 E 45 $\mu\text{MOL L}^{-1}$



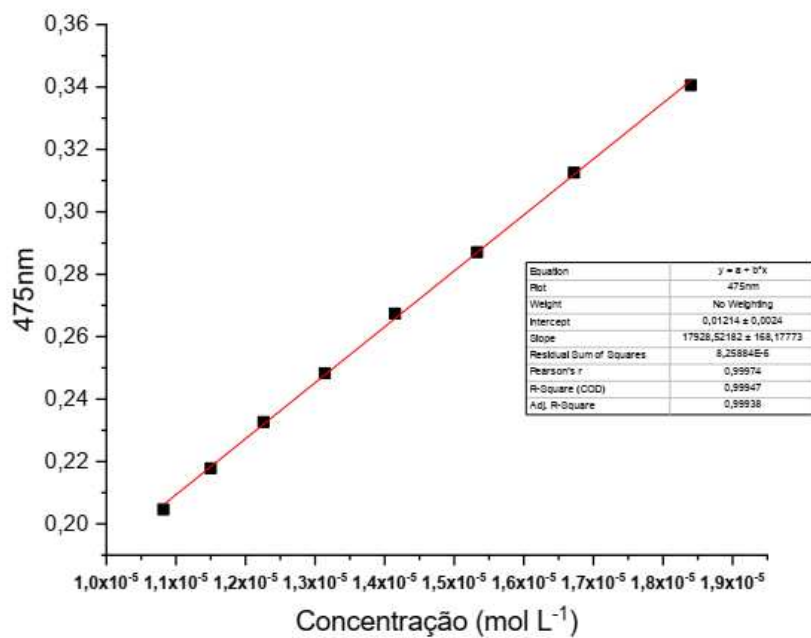




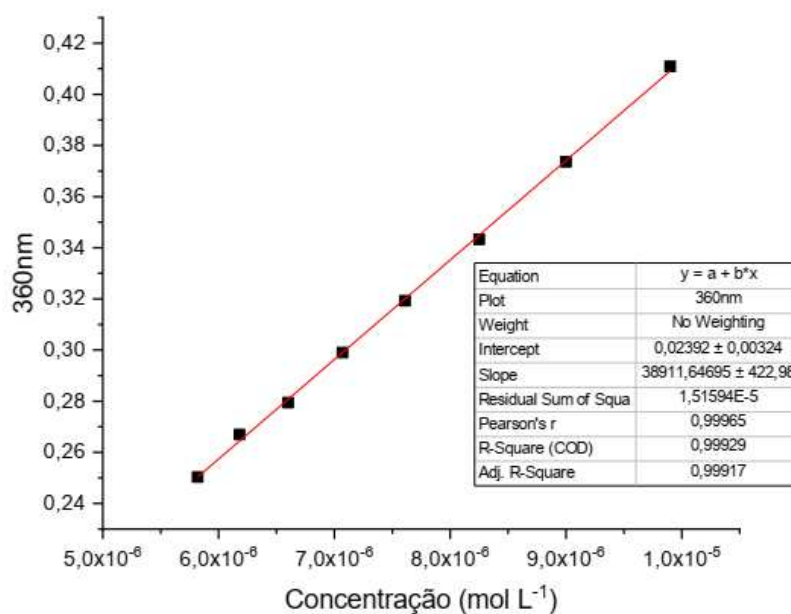
APÊNDICE R - ENSAIO DE FOTOCIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS PR (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) E PR02 (50 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL L⁻¹, PH 7,4 NO ESCURO E APÓS 30 E 120 MIN DE IRRADIAÇÃO COM LED AZUL ($\lambda_{\text{MÁX}} = 458 \text{ NM}$) E NA PRESENÇA DE GLUTATIONA (GSH - 5 MMOL L⁻¹). POÇO 1: MARCADOR DE FITAS LINEARES DE DNA (*MOLECULAR LADDER*). POÇOS 2, 3 - APENAS DNA PBR322 NO ESCURO E IRRADIADO COM LUZ AZUL; POÇO 4,5: DNA PBR322 COM GSH NO ESCURO E IRRADIADO COM LUZ AZUL. POÇOS 6 E 7: PR + DNA PBR322; POÇOS: 8 - 10: COMPLEXOS PR + DNA PBR322 COM GSH NO ESCURO E IRRADIADO COM LUZ AZUL; POÇOS 11 E 12: PR02 + DNA PBR322; POÇOS: 13 - 15: COMPLEXOS PR02 + DNA PBR322 E GSH NO ESCURO E NO CLARO



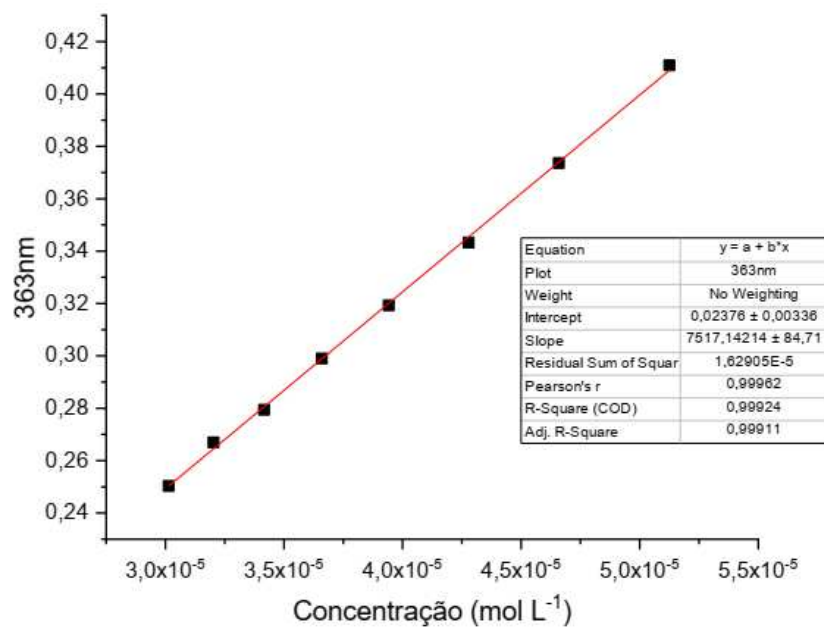
**APÊNDICE S – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPLEXO PR
CORRESPONDENTE À BANDA 475 NM NA FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE $1,0 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$ À $1,9 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$**



**APÊNDICE T – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPLEXO PR01
CORRESPONDENTE À BANDA 360 NM NA FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE 5,0
X 10⁻⁶ MOL L⁻¹ À 1,0 X 10⁻⁵ MOL L⁻¹**



**APÊNDICE U – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPLEXO PR02
CORRESPONDENTE À BANDA 363 NM NA FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE $3,0 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$ À $5,5 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$**



**ANEXO A - REACTIVITY OF NITROSYL RUTHENIUM COMPLEX AND
ITS POTENTIAL IMPACT ON THE FATE OF DNA – AN IN VITRO
INVESTIGATION**



Journal of Inorganic Biochemistry

Volume 238, January 2023, 112052



Reactivity of a nitrosyl ruthenium complex and its potential impact on the fate of DNA – An *in vitro* investigation

Patrícia H.R. Martins^a, Adolfo I.B. Romo^b, Francisco O.N. da Silva^c, Otacíro R. Nascimento^d
, Joaquín Rodríguez-López^b, Izaura C.N. Diógenes^a, Luiz G.F. Lopes^a  ,
Eduardo H.S. Sousa^a  

[Show more](#) 

 Add to Mendeley  Share  Cite

ANEXO B – ANTI-BACTERIAL, ANTI-BIOFILM AND SYNERGISTIC EFFECTS OF PHENAZINE-BASED RUTHENIUM(II) COMPLEXES

Dalton
Transactions

ROYAL SOCIETY
OF CHEMISTRY

PAPER



Cite this: *Dalton Trans.*, 2024, 53, 12627

Anti-bacterial, anti-biofilm and synergistic effects of phenazine-based ruthenium(II) complexes†

Patrícia H. R. Martins,^a ‡^a Adolfo I. B. Romo,^b ‡^b Florêncio S. Gouveia Jr.,^c ‡^c Iury A. Paz,^c Nilberto R. F. Nascimento,^c Alexandre L. Andrade,^d Joaquín Rodríguez-López,^b ‡^b Mayron A. de Vasconcelos,^c ‡^c Edson Holanda Teixeira,^d ‡^d Carlos André Ferreira Moraes,^f Luiz G. F. Lopes^a ‡^a and Eduardo Henrique Silva de Sousa^a ‡^a

Antimicrobial resistance has become a global threat to human health, which is coupled with the lack of novel drugs. Metallocompounds have emerged as promising diverse scaffolds for the development of new antibiotics. Herein, we prepared some metal compounds mainly focusing on *cis*-[Ru(bpy)(dppz)(SO₂)(NO)](PF₆) (PR02, bpy = 2,2'-bipyridine, dppz = dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine), in which phenazinic and nitric oxide ligands along with sulfite conferred some key properties. This compound exhibited a redox potential for bound NO^{+/0} of -0.252 V (vs. Ag/AgCl) and a high pI for nitrosyl-nitro conversion of 9.16, making the nitrosyl ligand the major species. These compounds were still able to bind to DNA structures. Interestingly, reduced glutathione (GSH) was unable to promote significant NO/INO release, an uncommon feature of many similar systems. However, this reducing agent was essential to generate superoxide radicals. Antimicrobial studies were carried out using six bacterial strains, where none or very low activity was observed for Gram-negative bacteria. However, PR02 and PR (*cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂]) showed high antibacterial activity in some Gram-positive strains (MBC for *S. aureus* up to 4.9 μmol L⁻¹), where the activity of PR02 was similar to or at least 4-fold better than that of PR. Besides, PR02 showed capacity to inhibit bacterial biofilm formation, a major health issue leading to bacterial tolerance to antibiotics. Interestingly, we also showed that PR02 can function in synergism with the known antibiotic ampicillin, improving their action up to 4-fold even against resistant strains. Altogether, these results showed that PR02 is a promising antimicrobial nitrosyl ruthenium compound combining features beyond its killing action, which deserves further biological studies.

Received 9th April 2024,
Accepted 21st June 2024
DOI: 10.1039/d4dt01033g
rsc.li/dalton