



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA OLIVEIRA

COMPLEXO HETEROLÉPTICO DE RUTÊNIO(II) ACOPLADO À BIOTINA
([Ru(BPY-ANTH)(BPY-BIOT)(DPPZ)](PF₆)₂): SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO,
ESTUDOS DE REATIVIDADE E ENSAIOS BIOLÓGICOS.

FORTALEZA

2020

GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA OLIVEIRA

COMPLEXO HETEROLÉPTICO DE RUTÊNIO(II) ACOPLADO À BIOTINA ([Ru(BPY-
ANTH)(BPY-BIOT)(DPPZ)](PF₆)₂): SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS DE
REATIVIDADE E ENSAIOS BIOLÓGICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

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

Coorientador: Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- O47c Oliveira, Geângela de Fátima Sousa.
Complexo heteroléptico de rutênio(II) acoplado à biotina ([Ru(bpy-anh)(bpy-biot)(dppz)](PF6)2):
Síntese, caracterização, estudos de reatividade e ensaios biológicos. / Geângela de Fátima Sousa Oliveira. –
2020.
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Química, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
Coorientação: Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho.
1. Rutênio. 2. Câncer. 3. Bactéria. 4. Fototerapia. 5. Biotina. I. Título.

CDD 540

GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA OLIVEIRA

COMPLEXO HETEROLÉPTICO DE RUTÊNIO(II) ACOPLADO À BIOTINA ([RU(BPY-
ANTH)(BPY-BIOT)(DPPZ)](PF₆)₂): SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS DE
REATIVIDADE E ENSAIOS BIOLÓGICOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de mestre em Química. Área
de concentração: Química Inorgânica.

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

Coorientador: Profa. Dra. Idalina Maria Moreira
de Carvalho.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Alda Karine Medeiros Holanda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força, saúde e fé para a realização desse trabalho. Por conseguir enfrentar todas as dificuldades, permitir errar, aprender e crescer, por seu infinito amor. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos.

Aos meus pais, Francisco Giovanni Oliveira da Silva e Maria Rosângela de Souza Bezerra, pela educação, valores, compreensão, todo o carinho e amor. Por sempre me incentivar aos estudos. Por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Amo vocês!

A meu irmão Jefferson Wisner por todo amor, fraternidade, acolhimento em meus momentos mais difíceis e que, mesmo nas dificuldades, foi o meu verdadeiro amigo.

A Jeane Nobre por todo amor, compreensão, companheirismo, paciência e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigada por permanecer ao meu lado.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e me ampararam durante essa minha jornada, em especial, ao Armando Diego e Mayara Alencar, pelos trabalhos e disciplinas realizados e, principalmente, por todo carinho, confiança, conselhos, brincadeiras, força, amor e amizade. Nunca vou esquecer-me de vocês!

Aos meus amigos do Laboratório de Bioinorgânica que me ensinaram as técnicas para utilizar os equipamentos, paciência e disposição: Mayara, Auridéia Josiane, Wellinson, Edinilton, Allan, Florêncio, Ricardo e Patrícia. Em especial, agradeço ao Monilson, por toda dedicação, profissionalismo e paciência na realização dos experimentos. Obrigada a todos pelo convívio, apoio, questionamentos e discussões sempre tão produtivas.

Aos professores: Eduardo Henrique Silva de Sousa e Idalina Maria Moreira de Carvalho pela oportunidade no Laboratório de Bioinorgânica e por toda competência, dedicação, profissionalismo e paciência na minha orientação que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Obrigada por acreditar em mim e no nosso trabalho.

Aos professores: Audísio Filho, Jackson Rodrigues, Izaura Diógenes, Luiz Gonzaga, pela ajuda e ensinamentos durante o Mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Alda Karine e Prof. Edson Holanda Teixeira, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

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

RESUMO

Complexos polipiridínicos de rutênio(II) vem sendo desenvolvidos como possíveis agentes terapêuticos, inclusive em fototerapia no tratamento de certos tipos de cânceres. O emprego da biotina conjugada a fármacos vem conferindo promissora estratégia para melhorar seletividade às células cancerígenas. Com o objetivo de combinar essas propriedades foi sintetizado um complexo polipiridínico de rutênio contendo biotina conjugada, [Ru(bpy-anth)(bpy-biot)(dppz)](PF₆)₂ (bpy-anth = 4'-metil-N-(antracên-2-il)-[2,2'-bipiridina]-4-carboxamida; dppz=dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina;bpy-biot = 4-(N-((2-biotinamido)etil)amido)-4'-metil-2,2'-bipiridina). Este composto foi caracterizado pelas técnicas de espectroscopia na região do UV-Vis e infravermelho, espectroscopia de emissão, ressonância magnética nuclear e voltametria cíclica. Os estudos de luminescência mostraram que o complexo apresenta uma emissão, proveniente do nível de transferência de carga metal-ligante (³MLCT), em 631 nm, cujo rendimento quântico de emissão em acetonitrila foi de 0,070. O ensaio de detecção de oxigênio singlete, empregando-se DPBF, exibiu um ótimo rendimento quântico de 0,70. Adicionalmente, os experimentos de interação com DNA (monitorados por luminescência e espectroscopia de absorção eletrônica) apresentaram constante de associação (K_b) na ordem de 10⁶, com indícios de processo de intercalação. Este complexo mostrou ainda alta lipofilicidade (logP = +1,32), apresentando assim características promissoras para boa permeabilidade celular. Ensaio biológicos foram realizados demonstrando ativação seletiva com luz frente à bactéria *Staphilococcus aureus*, bem como capacidade de fotoclivar DNA circular. Estudos de citotoxicidade empregando-se três células cancerígenas (MCF-7, A549 e LS174T) e uma normal (Hacat) indicaram ausência de toxicidade celular na ausência de luz. Todavia, sob irradiação de luz azul, observou-se que somente as células MCF-7 e A549, que apresentam os receptores de biotina superexpressados, mostraram-se susceptíveis ao complexo metálico, sugerindo promissora potencialidade anticâncer. Desta forma, conclui-se que a incorporação da biotina conferiu efetiva seletividade às células cancerígenas, sem perturbar suas propriedades como agente fototerapêutico (intercalador de DNA e fotogerador de oxigênio singlete), abrindo promissoras perspectivas para futuros estudos biológicos.

Palavras-chave: rutênio; câncer; bactéria; oxigênio singlete; fototerapia; biotina.

ABSTRACT

Ruthenium(II) polypyridine complexes have been developed as potential therapeutic agents, including in the phototherapy of cancer. Drugs conjugated with biotin have been used to provide enhanced selectivity toward cancer cells. Aiming to combine those properties a ruthenium complex conjugated with biotin was prepared, [Ru(bpy-anth)(bpy-biot)(dppz)](PF₆)₂ (bpy-anth = 4'-methyl-N-(antracen-2-yl)-[2,2'-bipyridine]-4-carboxamide; dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazine; bpy-biot = 4-(N-((2-biotinamide)ethyl)amide)-4'-methyl-2,2'-bipyridine). This compound was characterized by spectroscopic techniques (UV-Vis and infrared), emission spectroscopy, nuclear magnetic resonance and cyclic voltammetry. Luminescence studies showed an emission band at 631 nm due to the decay of the charge transfer band (³MLCT), whose quantum yield in acetonitrile was 0.070. Single oxygen production was measured using DPBF with great quantum yield of 0.7. Additionally, DNA interaction experiments were carried out using UV-Vis and fluorescence methods, where binding constant (K_b) was measured at *ca.* 10⁶, suggesting an intercalation mode of binding. This metal complex exhibited also high lipophilicity (LogP = +1.32), suggesting a potential good cellular uptake. Biological assays with bacteria showed a selective photoactivity against *Staphylococcus aureus*, along with its ability to photocleave circular DNA. Cytotoxicity assay using three cancer cell lines (MCF-7, A549 and LS174T) and one normal cell line (Hacat) showed a lack of activity in the dark. However, it was observed significant cytotoxic activity only in MCF-7 and A545 cancer cells upon blue light irradiation. These two cell lines are known to have overexpressed biotin receptors. Altogether, these results supported biotin conjugation conferred selectivity to specific cancer cells, while did not disturb the potential phototherapeutic properties of the metal complex (DNA binding and photoproduction of singlet oxygen), opening great future opportunities for biological studies.

Keywords: ruthenium; cancer; bacteria; singlet oxygen; phototherapy; biotin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos novos casos e mortes estimados em 2018 para a) mulheres e b) homens.....	18
Figura 2 – Estimativas de casos de câncer, em mulheres, 2018/2019.....	20
Figura 3 – Estimativas de casos de câncer, em homens, 2018/2019.....	20
Figura 4 – Estrutura dos complexos de platina atualmente em uso clínico	22
Figura 5 – Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{+2}$	23
Figura 6 – Estrutura química da Biotina.....	24
Figura 7 – Representação esquemática de célula cancerígena com receptores de biotina promovendo sua internalização.....	25
Figura 8 – Espectro vibracional na região do Infravermelho dos compostos: bpy-anth (—), bpy-biot (—), Ru-dppzCl ₂ (—) e Ru -biot (—) em pastilha de KBr.....	38
Figura 9 – Espectro de Ressonância Magnética de ¹ H para o ligante bpy-anth em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.....	40
Figura 10 – Espectro de Ressonância Magnética de ¹ H para o ligante bpy-biot em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.....	41
Figura 11 – Espectro de Ressonância Magnética de ¹ H para o complexo Ru-biot em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.....	42
Figura 12 – Espectro eletrônico na região do uv-vís do complexo Ru-dppzCl ₂ em acetonitrila na concentração de $1,2 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . Inset: Expansão da região entre 400 – 800 nm.....	46
Figura 13 – Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível do Ru-biot em acetonitrila na concentração $1,6 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ .	46
Figura 14 – Espectros eletrônicos do complexo Ru-biot em Acetonitrila, experimental (—) e teórico (—).....	48
Figura 15 – Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo Ru-biot calculados por TD-DFT.....	50

Figura 16 – Contribuições dos orbitais moleculares da espécie Ru-biot em função de seus fragmentos: Ru (—), bpy-biot (—), bpy-anth (—), anth (—), biot (—) e dppz (—).....	51
Figura 17 – Espectro de emissão (excitação de 457 nm) para o Ru-biot (—) e $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (—) em acetonitrila, na concentração de $8,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C	52
Figura 18 – Diagrama hipotético simplificado de energia dos compostos Ru-anth e Ru-biot . EF: estado fundamental	53
Figura 19 – Voltamograma cíclico do complexo precursor Ru-dppzCl ₂ obtidos em meio de acetonitrila contendo PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (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.....	54
Figura 20 – Voltamograma cíclico do complexo Ru-biot obtido em acetonitrila contendo PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (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.....	55
Figura 21 – Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete.....	56
Figura 22 – Espectros de emissão do DPBF em função do tempo de irradiação na ausência(a) e presença(b) de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$; (c) Ru-dppzCl ₂ e (d) Ru-biot , em concentração de $16 \mu\text{M}$ em etanol. Fendas: $0,3 \text{ mm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$. Tempo de irradiação = 2 segundos. Amostra irradiada ex situ usando LED azul.....	57
Figura 23 – Curvas cinéticas do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul).....	58
Figura 24 – Curvas cinéticas do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED verde).....	58

Figura 25 – Curva cinética do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED vermelho).....	59
Figura 26 – Espectro de absorção eletrônica do complexo Ru-biot na ausência de CT DNA (—) e na presença de quantidades diferentes de CT-DNA em tampão 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5. Inset: gráfico de $\epsilon_a - \epsilon_f / \epsilon_b - \epsilon_f$ vs [DNA].....	61
Figura 27 – Espectro de emissão do complexo Ru-biot na ausência de CT DNA (—) e na presença de quantidades crescentes de CT DNA em tampão Tris-HCl pH 7,5. Inset: gráfico de $(I_a - I_f) / (I_b - I_f)$ vs [DNA].....	62
Figura 28 – Espectro de fluorescência de BE ($\lambda_{exc} = 480$ nm) na presença de CT DNA a diferentes concentrações de complexo metálico (0-18,7 μ M) em tampão Tris-HCl pH 7,5. [BE] = 1,5 μ M, [DNA]= 10 μ M (A). Gráfico I_0/I x [complexo] com $R^2 = 0,9793$ (B).....	63
Figura 29 – Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 μ M) na presença do complexo Ru-biot em diferentes concentrações no escuro e após 1h de irradiação em LED azul, vermelho e verde. Poços 1: DNA marcador (ladder). Poço 2 e 9: apenas DNA pBR322. Poços 3-8 e 10-15: complexo + DNA pBR322 nas seguintes concentrações: 0,3, 3,0, 7,0, 10, 15 e 30 μ mol L ⁻¹ , respectivamente.....	65
Figura 30 – Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 μ M) na presença dos complexos Ru-anth em diferentes concentrações no escuro e após 1h de irradiação em LED azul, vermelho e verde. Poços 1: DNA marcador (ladder). Poço 2 e 9: apenas DNA pBR322. Poços 3-8 e 10-15: complexo + DNA pBR322 nas seguintes concentrações: 0,3, 3,0, 7,0, 10, 15 e 30 μ mol L ⁻¹ , respectivamente.....	65
Figura 31 – Efeito do Ru-biot na viabilidade celular. A: Hacat (queratinócitos humanos); B: A549 (carcinoma de pulmão); C: LS174T (adenocarcinoma colorretal); D: MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Complexo de Rutênio em μ g/mL.....	70
Figura 32 – Efeito do Ru-anth na viabilidade celular. A: Hacat (queratinócitos humanos); B: A549 (carcinoma de pulmão); C: LS174T (adenocarcinoma	

colorretal); D: MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Complexo de Rutênio em $\mu\text{g/mL}$ 71

Figura 33 – Ligação à avidina medida usando coluna de exclusão de gel. A: Espectros eletrônicos das amostras excluídas após aplicadas em uma microcoluna Biospin 6, as amostras coletadas eram de uma mistura contendo apenas Ru-biot (aplicado como $100\ \mu\text{M}$) (Blue trace), Ru-biot ($100\ \mu\text{M}$) com avidina ($100\ \mu\text{M}$) (traço preto) e Ru-biot ($100\ \mu\text{M}$) com avidina ($100\ \mu\text{M}$) mais biotina ($1\ \text{mM}$) (traço vermelho). B: Resina com a amostra incluída logo após a centrifugação, onde a cor observada indica a presença de **Ru-biot**..... 73

Figura 34 – Titulação de avidina usando Ru-biot. A: Perfil de luminescência durante a adição de Ru-biot em uma solução contendo avidina ($4\ \mu\text{M}$), traço preto é o espectro de emissão de $1,6\ \mu\text{M}$ de Ru-biot adicionado, enquanto os traços cinzas são adições adicionais até o último ($19\ \mu\text{M}$) (traço azul). O traço vermelho é o espectro de luminescência para Ru-biot ($18\ \mu\text{M}$) sem avidina. B: conjuntos de dados, um para a titulação de Ru-biot em uma solução contendo avidina (círculos) e outro sem avidina (quadrados) monitorado por luminescência (a $656\ \text{nm}$). Inset: gráfico de barras das mudanças na luminescência após a adição de um excesso de biotina logo após a titulação da avidina com Ru-biot..... 74

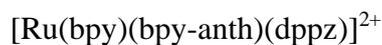
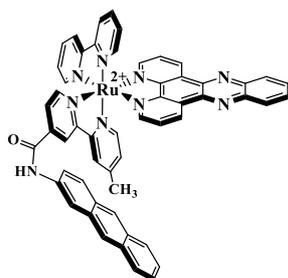
LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Bandas mais relevantes dos ligantes e complexos sintetizados medidos por FTIR.....	39
Tabela 2	Dados de análise elementar de C, N, H e S para o ligante bpy-biot e complexo Ru-biot	40
Tabela 3	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e atribuições para os ligantes (bpy-anth e bpy-biot) e Ru-biot	44
Tabela 4	Transições eletrônicas na região do UV-vis para os complexos Ru-dppzCl ₂ e Ru-biot em acetonitrila.....	47
Tabela 5	Transições calculadas de estado singlete para o complexo Ru-biot	49
Tabela 6	Rendimento quântico de emissão em diferentes solventes.....	53
Tabela 7	Voltametria cíclica do Ru-dppzCl ₂ , Ru-biot e Ru-anth obtidas em meio de acetonitrila contendo PTBA (eletrólito de suporte), utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.....	56
Tabela 8	Valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) sob irradiação de luz azul e vermelha. ($\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$).....	60
Tabela 9	Constantes de ligação ao DNA (K_b) para diferentes complexos metálicos de rutênio.....	61
Tabela 10	Valores de coeficientes de partição (log P) para os compostos.....	67
Tabela 11	Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [valores em $\mu\text{g/mL}$ (μM)].....	69

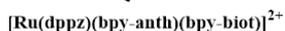
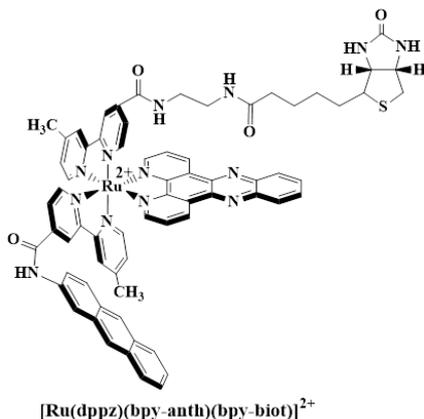
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
Abs	Absorbância
Anth	Grupo antracênico
BE	Brometo de Etídio
Bpy-anth	4'-metil-N-(antracên-2-il)-[2,2'-bipiridina]-4-carboxamida
Bpy-biot	4-(N-((2-biotinamido)etil)amido)-4'-metil-2,2'-bipiridina
Bpy-COOH	4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
CT DNA	<i>Calf Thymus</i>
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBF	Difenilbenzofurano
Dppz	dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
IL	Transições Inter e intraligante
IV	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia
MLCT	Transferência de Carga do metal para o Ligante.
pBR 322	DNA Plasmidial
PTBA	Perclorato de tetrabutilamônio
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton

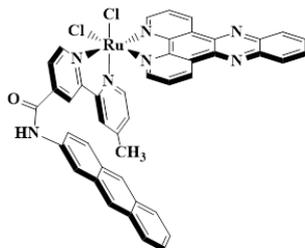
Ru-anth



Ru-biot



Ru-dppzCl₂



TAE	Tris-Acetato EDTA
TFD	Terapia Fotodinâmica
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 singlete
Φ_{em}	Rendimento quântico de emissão
δ	Deformação angular
ϵ	Coefficiente de Absortividade Molar
ν	Estiramento ou deformação axial
f	Força do oscilador
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
TD-DFT	Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Câncer	18
1.2	Complexos metálicos com ação citotóxica	21
1.3	Complexos de Rutênio	23
1.4	Biotina	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Reagentes, solventes e soluções	28
3.2	Equipamentos e Técnicas experimentais	28
3.2.1	Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV-visível.....	28
3.2.2	<i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho</i>	28
3.2.3	<i>Modelagem Molecular – Cálculos quanto-mecânicos</i>	29
3.2.4	<i>Medidas eletroquímicas</i>	29
3.2.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H	29
3.2.6	<i>Espectroscopia de emissão</i>	30
3.2.6.1	<i>Rendimento quântico de emissão</i>	30
3.2.6.2	<i>Rendimento quântico de geração de ¹O₂</i>	30
3.2.7	<i>Interação com DNA</i>	31
3.2.7.1	Titulação de DNA (monitorado por espectroscopia de absorção eletrônica).....	31
3.2.7.2	Titulação de DNA (Monitorado por luminescência).....	31
3.2.7.3	Titulação do aduto DNA/Brometo de Etídio.....	31
3.2.7.4	Eletrforese em gel de agarose.....	32
3.2.8	Coefficiente de Partição (LogP)	32
3.2.9	Ensaio Biológicos	33
3.2.9.1	Microorganismos, Linhagem celular e condições de cultura.....	33
3.2.9.2	<i>Atividade antibacteriana</i>	34
3.2.9.3	<i>Células cancerígenas</i>	34
3.2.10	Medições de ligação de avidina	35
3.2.10.1	<i>Coluna de exclusão de gel</i>	35
3.2.10.2	<i>Titulação de luminescência</i>	35
3.3	Síntese dos ligantes	35
3.3.1	Síntese dos compostos 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico (bpy-COOH) e dppz.....	35
3.3.2	Síntese do 4' metil -N-(antracên-2-il) -[2,2'bipiridina] – 4 – carboxamida (bpy-anth).....	35
3.3.3	Síntese da 4-(N-((2-biotinamido)etil)amido)- 4'- metil-2,2'-bipiridina(bpy-biot).....	36

3.4	Síntese dos complexos	36
3.4.1	Síntese do complexo precursor [Ru(dppz)(bpy-ant)Cl ₂] – (Ru-dppzCl ₂).....	36
3.4.2	Síntese do complexo [Ru(bpy-anth)(bpy-biot)(dppz)](PF ₆) ₂ - (Ru-biot).....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Caracterização dos compostos	37
4.1.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho</i>	37
4.1.2	<i>Análise Elementar</i>	39
4.1.3	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H</i>	40
4.1.4	<i>Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis</i>	45
4.1.5	<i>Espectroscopia de emissão</i>	51
4.1.6	<i>Voltametria Cíclica</i>	53
4.2	Estudo de geração de oxigênio singlete.....	56
4.3	Estudo de interação com DNA.....	60
4.3.1	<i>Constante de ligação (K_b) DNA-complexo medida por espectroscopia de absorção eletrônica</i>	60
4.3.2	<i>Constante de associação (K_b) DNA-Complexo metálico via espectroscopia de emissão</i>	61
4.3.3	<i>Competição com Brometo de Etídio</i>	62
4.3.4	<i>Ensaio de dano ao DNA por eletroforese em gel de agarose</i>	64
4.4	Lipofilicidade (LogP)	66
4.5	Ensaio de MIC e MBC em bactérias Gram positivas e negativas.....	68
4.6	Ensaio em células cancerígenas.....	70
4.7	Ensaio com Avidina.....	72
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H PARA O LIGANTE DPPZ EM CLOROFÓRMIO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz	85
	APÊNDICE B – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H PARA O RU-BIOT EM DMSO DEUTERADO NA REGIÃO DE 1,8 ppm A 4,55 ppm, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz	86
	APÊNDICE C – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO RU-BIOT EM DMSO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz	87
	APÊNDICE D – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE AZUL DE METILENO; (C) RU-DPPZCL₂; (D) RU-BIOT E (E) RU-ANTH, NA CONCENTRAÇÃO DE 16 μM EM ACETONITRILA. FENDAS:0,3 MM, λEXC= 410 NM E EMISSÃO DE 420-550 NM.	

TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 3 MINUTOS. AMOSTRA IRRADIADA EX SITU USANDO LED VERMELHO.....	88
APÊNDICE E – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE ROSA BENGALA; (C) RU-DPPZCL₂; (D) RU-BIOT E (E) RU-ANTH, NA CONCENTRAÇÃO DE 16 µM EM ACETONITRILA. FENDAS:0,3 mm, λ_{EXC}= 410 nm E EMISSÃO DE 420-550 nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 3 MINUTOS. AMOSTRA IRRADIADA EX SITU USANDO LED VERDE.....	89
APÊNDICE F – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO COMPLEXO [RU(BPY-ANTH)(BPY-BIOT)(DPPZ)]²⁺ OBTIDOS EM MEIO DE ACETONITRILA 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.....	90

1 INTRODUÇÃO

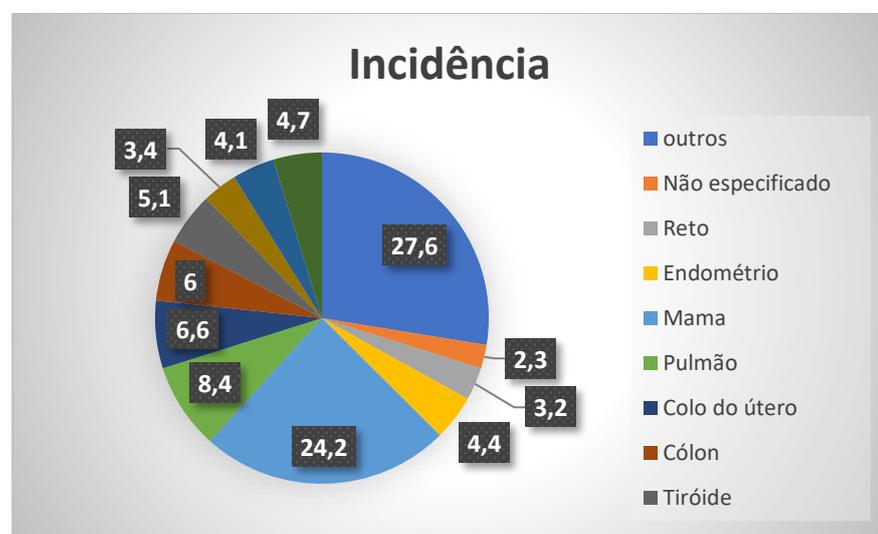
1.1 Câncer

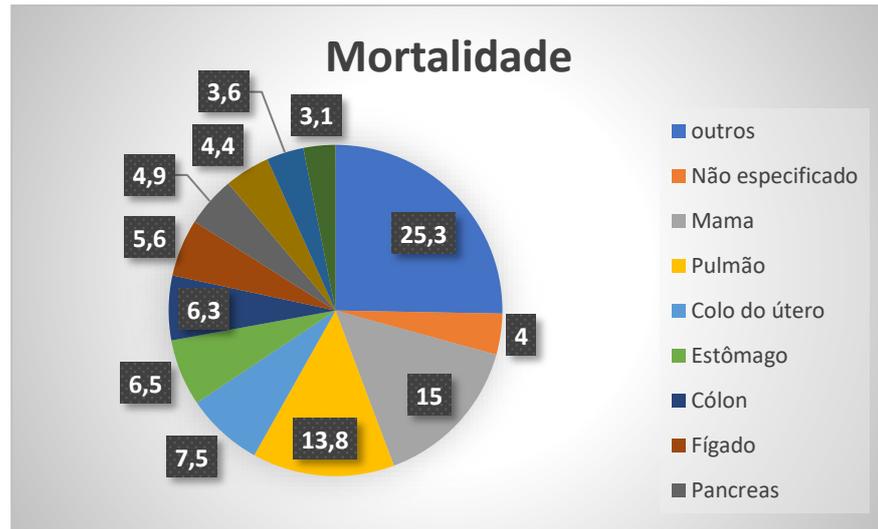
Câncer é a denominação de um conjunto de doenças em que há o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. As células normais se dividem e se multiplicam por meio da divisão celular (controlado) sendo responsáveis pela regeneração de tecidos e órgãos. O câncer inicia quando há o crescimento desordenado de células, em que continuam crescendo e formando novas células anômalas. A maioria dos casos estão relacionados a fatores ambientais (80 – 90%) tais como: estilo e hábitos de vida, mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, tabagismo, exposição excessiva ao sol, dentre outros (INCA, 2018; COLEMAN, 2002).

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, onde esta doença aumenta anualmente, com uma estimativa de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 e com 18,1 milhões de novos casos no mundo todo. O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (18,4%) seguido do câncer de mama, próstata e fígado. Em cada região do mundo o câncer varia de acordo com o desenvolvimento econômico do país e fatores sociais. Entre os homens o câncer mais frequente é o de próstata, seguido pelo de pulmão. Na figura 1, apresenta-se a distribuição dos novos casos e mortes estimados em 2018 em mulheres e homens no mundo (FERLAY, 2018).

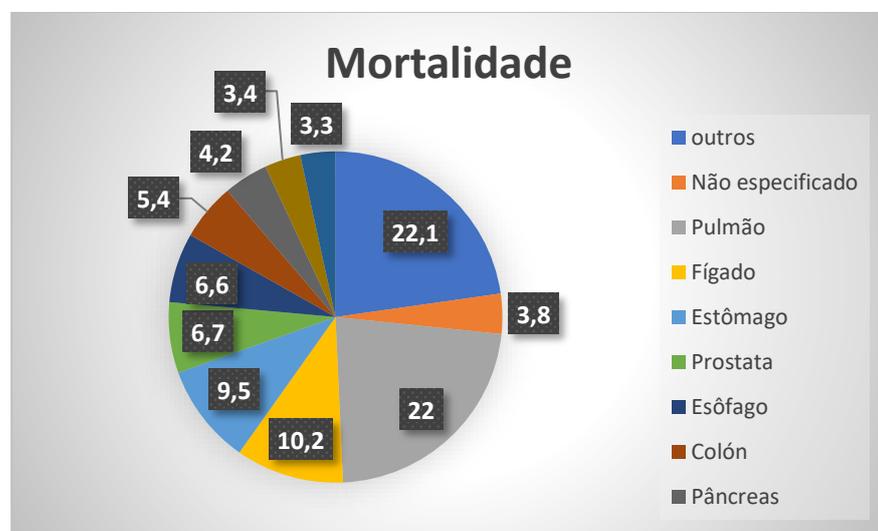
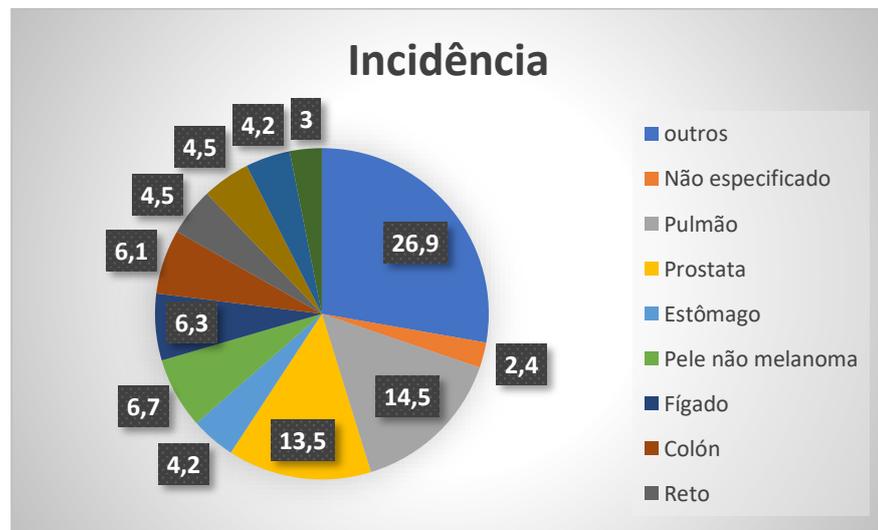
Figura 1 - Distribuição dos novos casos e mortes estimados em 2018 para a) mulheres e b) homens.

a)





b)



Fonte: Adaptado de Ferlay (2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) registra o câncer como uma das doenças que causam morte antes dos 70 anos em 113 países (Organization. WH. Global Health Observatory, 2018). No Brasil, os cânceres de próstata em homens e mama em mulheres são os mais frequentes. Com exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens e mulheres estão apresentados nas figuras 2 e 3, sendo uma síntese da estimativa de incidência para o biênio 2018-2019 no Brasil. Assim, nesta síntese observa-se que os cânceres mais incidentes são: próstata, pulmão, mama, cólon e reto (INCA, 2018).

Figura 2- Estimativas de casos de câncer, em mulheres, 2018/2019



Fonte: INCA (2018).

Figura 3 - Estimativas de casos de câncer, em homens, 2018/2019



Fonte: INCA (2018).

O tratamento do câncer pode ser realizado por meio de quimioterapia, radioterapia, TFD, transplante de medula óssea e intervenções cirúrgicas, além disso, nos últimos anos novas terapias foram introduzidas como o uso de anticorpos monoclonais, viroterapia e agentes antiangiogênicos (URRUTICOECHEA A, et al., 2010).

Apesar do crescimento de terapias e atual disponibilidade de medicamentos anticâncer, ainda é necessária a pesquisa científica no desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos que tratem de forma eficiente os diversos tipos de cânceres existentes buscando minimizar os efeitos colaterais causados ao paciente. Assim, fármacos a base de complexos metálicos mostram-se como uma alternativa viável para tal aplicação.

Os complexos metálicos mostram-se interessantes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica (FTD) devido suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas. O efeito fotodinâmico refere-se ao dano no tecido vivo na presença de um fotossensibilizador através de luz visível e oxigênio (BONNETT R, 2000). A terapia fotodinâmica é um método relativamente novo para tratamento de tumores, envolvendo a ativação seletiva de um medicamento fotossensível com luz em um determinado comprimento de onda. A irradiação gera espécies reativas oxidativas no tumor. Assim se faz necessário o desenvolvimento de compostos que possuem seletividade para células cancerígenas, causando menos danos às células normais (SAHA; MAJUMDAR; HUSSAIN, 2013).

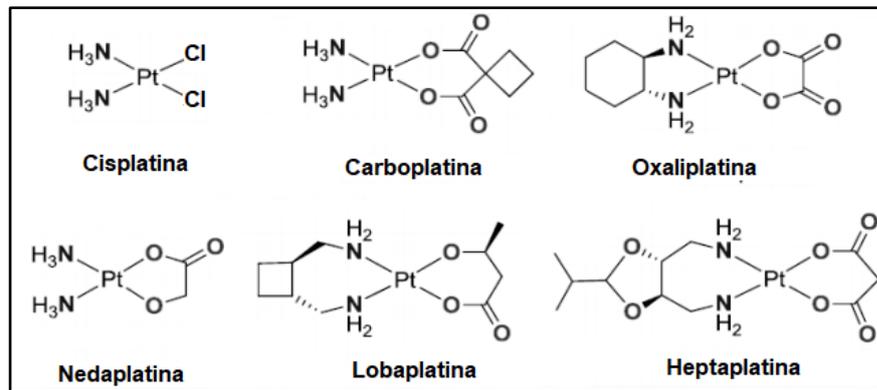
1.2 Complexos metálicos com ação citotóxica

Os metais de transição possuem certas vantagens estratégicas frente aos fármacos orgânicos, uma vez que possuem grande variedade do número de coordenação, distintos estados de oxidação acessíveis, podendo assumir diversas geometrias e facilidade na substituição de ligantes, oferecendo sistemas com amplas diversidades espaciais, variabilidade cinética e termodinâmica (CRAVER, et al., 2010; SHALOAM et al., 2014). Essas propriedades vêm auxiliando no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, ampliando o arsenal de opções para o preparo de novos fármacos.

Curiosamente, os complexos metálicos têm sido utilizados desde a antiguidade, mas com a descoberta da cisplatina como agente terapêutico, houve um forte estímulo às pesquisas envolvendo metais com aplicações no ramo da medicina (BAKHTIAR; OCHIAI, 1999; KELLAND, 2007; REISNER, et al., 2008). Apesar do sucesso da cisplatina, análogos têm sido desenvolvidos, a fim de aumentar a eficácia e diminuir sua toxicidade. Atualmente, os fármacos

derivados de platina aprovados para uso clínico são: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina (Figura 4) (AMABLE, 2016; ZAKI, et al., 2016).

Figura 4 - Estrutura dos complexos de platina atualmente em uso clínico.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nos dias atuais, a cisplatina é um dos medicamentos mais utilizados clinicamente. Apesar da eficiente ação citotóxica dos complexos de platina em diversos tipos de câncer, ainda existem alguns problemas que são enfrentados durante sua administração, tais como, nefro e neurotoxicidade, resistência tumoral ao tratamento, náusea e ototoxicidade (JIRSOVA, et al., 2006; KAMER; ATASOY, 2013).

Na tentativa de aumentar a seletividade do complexo frente às células tumorais, facilitar sua intercalação com DNA, diminuir a toxicidade, e melhorar a ação citotóxica, novos fármacos a base de metais, tais como rutênio, ferro, cobre, ouro, dentre outros, têm sido investigados (DEO, et al., 2016; NAIR, et al., 2017).

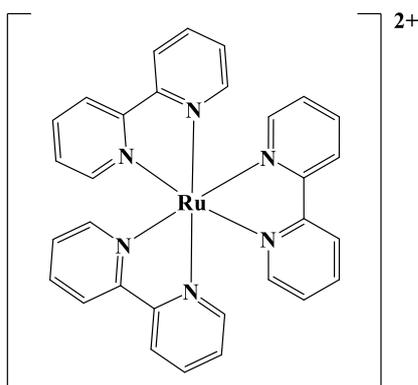
Dos diversos complexos metálicos, se destacam os complexos de rutênio que têm mostrado promissora atividade antitumoral, seletividade e citotoxicidade para células cancerígenas quando comparada aos complexos de platina (GRANSBURY, et al., 2016). Convém mencionar que atualmente dois complexos de rutênio, denominados KP1019 e TLD1433, encontram-se em fase de testes clínicos e exibem promissoras atividades antitumorais. O TDL1433 foi o primeiro fotossensibilizador que entrou em ensaios clínicos (MONRO, et al., 2019; GOLLA, et al., 2017). Infelizmente, um outro complexo de rutênio teve ensaios clínicos interrompidos (NAMI-A), pois os seus resultados do estudo da combinação terapêutica de fase I/II com gemcitabina não se mostraram promissores (MONRO, et al., 2019; ALESSIO, 2017).

1.3 Complexos de Rutênio

Os complexos de rutênio destacam-se por ser usualmente menos tóxicos do que a cisplatina. Além disso apresentam uma vasta janela de aplicação com potencial terapêutico contra agentes infecciosos, câncer e outras doenças. O rutênio possui a capacidade de assumir múltiplos estados de oxidação (II, III e IV) acessíveis e estáveis, diferentes números de coordenação e cinética de substituição de ligantes favoráveis e, até certo ponto, semelhantes aos da platina (MUHAMMAD; GUO, 2014; PAGES, et al., 2015). Esses compostos proporcionam mecanismos de ação distintos, combinando diferentes alvos e várias respostas biológicas. Sua baixa toxicidade, em geral, se deve ao fato de ser semelhante ao ferro, fazem parte do grupo VIII, o que favorece o transporte nos sistemas biológicos (ALLARDYCE; DYSON, 2001)

Complexos polipiridínicos de rutênio estão entre os sistemas mais estudados em fotoquímica e fotofísica. Sabe-se das diversas propriedades do $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Figura 5) (bpy = 2,2'-bipiridina), e seus derivados, como estabilidade, propriedades redox e fotoredox, emissão luminescente, e intensa absorção oriunda da transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) na região do visível do espectro eletromagnético (BALZANI; JURIS, 2001; JURIS, et al., 1988).

Figura 5- Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.



Fonte: elaborada pelo autor.

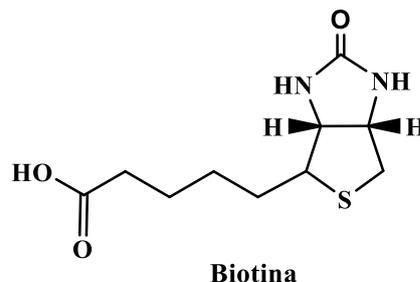
A estabilidade da ligação Ru-bpy é bastante elevada, possui elevado potencial de oxidação do metal, bem como baixa labilidade do ligante bipiridínico. Estas propriedades são alcançadas através do efeito quelato em conjunto com a retrodoação (π -backbonding), em que apesar do metal aceitar densidade eletrônica do ligante via interação sigma, ele doa densidade eletrônica para os orbitais π^* (antiligante) do anel piridínico. Há a contribuição das interações existentes entre metal-ligante, envolvendo orbitais σ -doadores, orbitais receptores π^* do ligante e orbitais moleculares pertencentes ao sistema d^6 do rutênio (t_{2g}) (KIRGAN, 2007).

As características dos complexos podem ser modificadas com a funcionalização dos ligantes bipyridínicos, alterando propriedades espectroscópicas, propriedades intercalativas ao DNA e de permeabilidade à membrana plasmática. Uma abordagem empregada neste trabalho será a funcionalização de um ligante bipyridínico, com o antraceno, tendo como um dos objetivos analisar sua dinâmica de relaxação do estado excitado. Adicionalmente, modificou-se um outro ligante bipyridínico com a biotina, a fim de conferir seletividade celular. Além disso, ter como terceiro ligante o dipirido fenanzínico (dppz) que oferecerá uma característica intercalativa ao DNA, agrupando assim três importantes propriedades moduladas pelos ligantes bipyridínicos modificados.

1.4 Biotina

A biotina, também conhecida por vitamina B7 ou H, (Figura 6), é composta por um anel heterocíclico de tetrahidrotiofeno fundido a um anel imidazólico, que contém um grupo ureído (NH – C – NH).

Figura 6 - Estrutura química da biotina.



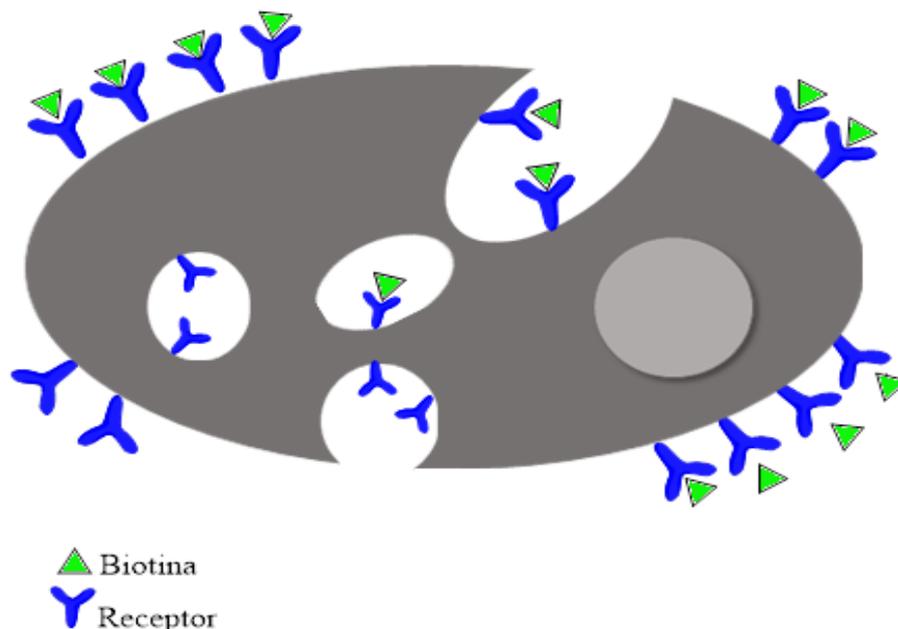
Fonte: elaborada pelo autor.

É uma importante coenzima para as carboxilases envolvidas na síntese de aminoácidos e ácidos graxos. Além disso, participa da glicogênese e atua como um cofator importante na sinalização celular, estrutura da cromatina e regulação gênica (REN, et al., 2015). A biotina pertence a uma categoria específica de micronutrientes (exógenos) necessários para várias funções celulares e, especialmente, no crescimento celular (VADLAPUDI, et al., 2012).

Algumas vitaminas podem ser utilizadas como direcionadores específicos para células cancerígenas, como a biotina, que será utilizada nesse trabalho. Essa molécula desperta interesse devido a sua estrutura bioquímica simples e por possuir uma elevada absorção em certas células cancerígenas, quando comparada com as células normais (COLLINA, 2004; ABRIZI; ABYAR, 2019).

Estudos recentes mostram vários conjugados de biotina-droga como alvo de células cancerígenas, sendo relatados estudos *in vivo* ou *in vitro* (MAITI, et al., 2013; PARK, et al., 2015; KIM, et al., 2014). O transportador multi - vitamínico dependente de sódio (SMVT) é o principal transportador de biotina (receptor expresso) responsável por sua absorção nas células, tendo sido encontrado superexpresso na superfície celular em proliferação de várias linhagens de células cancerígenas, como mama, ovário, rim, leucemia e pulmão (CHEN, et al., 2010; SHI, et al., 2014; REN, et al., 2015). A maioria dos receptores são encontrados na membrana celular nas partes interna e externa da célula. A biotina é um micronutriente necessário para funções celulares, dessa maneira, alguns tumores em crescimento necessitam de mais biotina do que as células normais (Figura 7) (MAITI; PAIRA, 2018).

Figura 7 - Representação esquemática de célula cancerígena com receptores de biotina promovendo sua internalização.



Fonte: elaborada pelo autor.

Na busca por novos compostos com baixa toxicidade e favoráveis perfis farmacológicos, os complexos de Ru(II) guiados com biotina podem oferecer uma funcionalização do complexo, a fim de aumentar a captação celular e especificidade para as células tumorais.

Para evitar toxicidade no hospedeiro é necessário que o composto possua alta seletividade para a enzima bacteriana. Estudos mostram que a enzima essencial na bactéria *S. aureus* é a proteína ligase da biotina (BPL) sendo o alvo da droga. Nas bactérias, o complemento de biotina pode ser obtido através de dois mecanismos: entrada de fontes exógenas ou síntese

dela, algumas podem obter através de um ou dois mecanismos. Na bactéria *S. aureus* existem proteínas que atuam como ligase para catalisar a biotilação de enzimas dependentes de biotina (SOARES DA COSTA, et al., 2012).

SaBPL é uma proteína da *S. aureus* bifuncional, que possui a biotina ligase e atividade de transcrição repressora, isso posiciona a BPL como um regulador chave de várias vias metabólicas. Durante uma infecção as bactérias precisam de micronutrientes e respondem isso com o aumento da expressão de proteínas necessárias (BECHER, et al., 2009; HECKER, et al., 2010).

Assim, estudos mostraram que a biotina é utilizada como repressor/regulador de transcrição, fornecendo uma abordagem para o desenvolvimento de novos sistemas de expressão gênica para o uso em bactérias (*S. aureus*) (SATIAPUTRA, et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver novos compostos à base de rutênio contendo biotina conjugada a um ligante bipyridínico, e investigar sua reatividade, efeitos citotóxicos e potencialidade no combate ao câncer e patógenos.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o precursor $[\text{Ru}(\text{bpy-anth})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ (Ru-dppzCl_2) e o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy-anth})(\text{bpy-biot})(\text{dppz})]^{2+}$ (**Ru-biot**), no qual dppz = dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazina, bpy-anth = 4'-metil-*N*-(antracên-2-il)-[2,2'-bipiridina]-4-carboxamida e bpy-biot = 4-(*N*-((2-biotinamido)etil)amido)-4'-metil-2,2'-bipiridina;
- Verificar a estrutura dos complexos utilizando técnicas espectrofotométricas (UV-Vis, infravermelho, luminescência), ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H), técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica) e análise elementar;
- Investigar e determinar a interação do complexo com DNA empregando técnicas espectroscópicas (absorção e emissão na região do UV-visível), através de ensaios de fotoclivagem por eletroforese em gel de agarose;
- Verificar a capacidade de geração de espécies radiculares oxigenadas no escuro e sob irradiação de luz azul, verde e vermelha;
- Determinar a lipofilicidade do complexo (LogP);
- Avaliar o desempenho dos compostos, através de ensaios biológicos, em bactérias Gram positivas e negativas;
- Avaliar a viabilidade celular do complexo frente a linhagens de células cancerígenas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As sínteses dos complexos foram desenvolvidas no Laboratório de Bioinorgânica, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI), UFC. As medidas de RMN foram realizadas no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN (UFC). Os ensaios biológicos foram realizados em parceria com o Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) (Dr. Prof. Edson Holanda).

3.1 Reagentes, solventes e soluções.

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica, sem purificação prévia. A água utilizada em alguns dos procedimentos foi obtida de um equipamento de ultrapurificação de grau milliQ (Direct Q 3UV, com bomba MILLIPORE) e os demais solventes empregados (Acetonitrila, DMF, Etanol, Acetona) foram de grau HPLC.

Os reagentes tricloreto de rutênio triidratado, 2-aminoatraceno, N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxi-benzotriazol, biotina, etilenodiamino, N-metilmorfolina, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, o-fenilenodiamino de procedência Aldrich, foram utilizados sem qualquer purificação prévia. *Calf thymus* DNA (CT DNA) obtido da Sigma-Aldrich foi utilizado nos ensaios de interação com o DNA. As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se como eletrólito suporte uma solução 0,1 mol L⁻¹ de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) em acetonitrila grau HPLC, de procedência Tedia.

3.2 Equipamentos e Técnicas experimentais

3.2.1 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, acoplado a um computador. As amostras foram analisadas em solução usando-se cubetas de quartzo retangulares de caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.2 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).

3.2.3 Modelagem Molecular – Cálculos quanto-mecânicos

Cálculos computacionais foram realizados no Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD SP) localizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Utilizou-se os softwares GaussView 5.0 (DENNINGTON, et al., 2009) para geração dos inputs e o Gaussian09 (FRISCH, et al., 2009) para execução dos cálculos em máquinas disponíveis em um ambiente IBM Power 750 Express Server. A otimização das geometrias dos complexos foi realizada utilizando DFT (densidade funcional), por meio do funcional híbrido B3LYP (LEE, et al., 1988; BECKE, 1993; STEPHENS, et al., 1994). O conjunto de bases LANL2DZ (HAY; WADT, 1985) foi usado para descrição do átomo de rutênio e 6-31G(d) (FRENKING; KOCH, 1986) foi utilizado para os demais átomos (C, H, O, N, S). Foram realizadas simulações envolvendo a presença de solvente acetonitrila 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.

3.2.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas dos complexos 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 Ru-dppzCl₂ e **Ru-biot** foram realizadas em solução de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) 0,1 mol L⁻¹ em acetonitrila, utilizando eletrodos de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl imerso em solução contendo o eletrólito utilizado como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se ferroceno como padrão interno, admitindo que o par redox ferroceno (Fc⁺/0) apresenta $E_{1/2} = 0,326 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

3.2.5 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 solvente deuterado dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2.6 Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão foram obtidos utilizando-se Fluorímetro Estacionário QM-40 (PTI). As amostras foram analisadas em solução usando-se cubetas de quartzo retangulares de caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.6.1 Rendimento quântico de emissão

A equação abaixo foi empregada para o cálculo do rendimento quântico de emissão:

$$\Phi_{em}(\text{amostra}) = \frac{I_a}{I_p} \cdot \frac{Abs(\text{padrão})_{\lambda_{exc}}}{Abs(\text{amostra})_{\lambda_{exc}}} \cdot \Phi_{em}(\text{padrão}) \quad (1)$$

Onde 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. Os valores utilizados para o rendimento quântico do padrão $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ foram: $\Phi(\text{Metanol}) = 0,045$; $\Phi(\text{Acetonitrila}) = 0,061$; $\Phi(\text{Diclorometano}) = 0,062$; $\Phi(\text{DMF}) = 0,068$ (LO; LEE, 2004).

3.2.6.2 Rendimento quântico de geração de 1O_2

O cálculo da geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) foi determinada aplicando 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como sonda, via fluorescência (DING, et al., 2006). Os espectros foram obtidos nas seguintes condições: $\lambda_{exc} = 410$ nm, varredura = 420 – 550 nm e fendas = 0,3 mm.

O experimento foi realizado com 2,5 mL das soluções dos complexos de Ru-dppzCl₂, Ru-anth e Ru-biot (20 μ M) em etanol contendo 20 μ M de DPBF adicionados em uma cubeta de quartzo. A irradiação das amostras foi efetuada com um sistema de monoLED, LEDs de $\lambda_{m\acute{a}x} = 632$ nm (vermelho), $\lambda_{m\acute{a}x} = 520$ nm (verde) e $\lambda_{m\acute{a}x} = 463$ nm (azul) em intervalos de 3 minutos, 10 segundos e 2 segundos, respectivamente. Azul de Metileno, Rosa bengala e $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ foram usados como padrões. O valor de Φ_{Δ} para os complexos foi determinado a partir da equação (2) (DING, et al., 2006):

$$\frac{ka}{kp} = \frac{\Phi_{\Delta}(\text{amostra})}{\Phi_{\Delta}(\text{padrão})} \quad (2)$$

onde ka e kp são 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 as intensidades dos espectros de emissão em vários tempos e zero, respectivamente.

3.2.7 Interação com DNA

3.2.7.1 Titulação de DNA (monitorado por espectroscopia de absorção eletrônica)

A titulação espectrofotométrica com o CT-DNA foi efetuada em uma faixa de 200 a 600 nm, a fim de verificar a interação do complexo com o DNA de uma maneira intercalativa. As medidas foram realizadas em concentração constante do complexo (10 μM) com sucessivas adições de CT DNA 10 mM em tampão tris-HCl pH = 7,5. A análise dos dados da titulação permite o cálculo da constante de ligação intrínseca (K_b) entre o complexo e o DNA, equação 3 (PYLE, et al., 1989). O K_b mede a força de ligação do complexo ao DNA e nos permite comparar quantitativamente complexos entre si e com o intercalador clássico, brometo de etídio (WARING, 1965). A equação abaixo foi utilizada para o cálculo.

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (3)$$

Sendo que ϵ_f , ϵ_a e ϵ_b correspondem ao coeficiente de extinção molar para o complexo metálico livre, para cada adição de DNA e para o complexo totalmente ligado, respectivamente.

3.2.7.2 Titulação de DNA (Monitorado por luminescência)

As medidas foram realizadas em concentração constante do complexo (10 μM) com sucessivas adições de CT DNA em 10 mM de tampão tris-HCl pH = 7,5. A constante de ligação (K_b) foi determinada utilizando a equação abaixo (PYLE, et al., 1989).

$$\frac{I_a - I_f}{I_b - I_f} = \left[\frac{b - \left(b^2 - 2K_b^2[Ru][DNA]/s \right)^{1/2}}{2K_b[Ru]} \right] \quad (4)$$

Em que $b = 1 + K_b[Ru] + K_b[DNA]/2s$ e I_f , I_b e I_a correspondem a intensidade de emissão do complexo livre, para o complexo ligado ao DNA e para cada adição de DNA, respectivamente.

3.2.7.3 Titulação do aduto DNA/Brometo de Etídio

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando um Fluorímetro modelo QM-40 (PTI). Numa cubeta foi adicionado 2 mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo 1,5 μM de brometo de etídio (EB) (Atenção: reagente mutagênico) com 10 μM de CT DNA. Logo após foram realizadas 10 adições de 2 μL de uma solução 1 mM do complexo em estudo. Para calcular a supressão de fluorescência foi utilizada a equação de Stern-Volmer (SIRAJUDDIN, et al., 2013):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (5)$$

onde I_0 e I são as intensidades de emissão na ausência e presença do supressor (complexo), respectivamente, K_{sv} é a constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do supressor. A constante aparente de ligação também foi calculada através da equação abaixo (LEE, et al., 1993).

$$K_{EB}[EB] = K_{app}[\text{Complexo}] \quad (6)$$

onde $K_{EB} = 1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[EB] = 1,5 \mu\text{M}$ e $[\text{complexo}]$ é a concentração que causou 50% de supressão da fluorescência inicial do brometo de etídio.

3.2.7.4 Eletroforese em gel de agarose

O estudo de fotoclivagem foi realizado empregando a técnica de eletroforese em gel de agarose. As soluções dos complexos Ru-anth e **Ru-biot** (concentrações 0 – 30 μM) foram adicionadas à solução contendo o DNA superenovelado plasmidial pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pares de base) em tampão tris-HCl, pH = 8, onde foram incubados para serem irradiados ou mantidos no escuro. O padrão de bandas foi verificado em gel de agarose (0,8 %) com tampão TAE pH = 8,0, coradas com GelRedTM e analisado usando o fotodocumentador Gel DocTM XR + System (Biorad). O experimento de irradiação foi feito com LED's (Basetech Conrand, 1.7 W) em diferentes comprimentos de onda: azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$), verde ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$) e vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 693 \text{ nm}$) a uma distância de 17 cm da cubeta.

3.2.8 Coeficiente de Partição (LogP)

Os valores de coeficiente de partição (log P) para os complexos Ru-biot, Ru-anth e Ru-dppzCl₂ foram determinadas pelo método “shake-flask”, utilizando-se n-octanol e água. Uma alíquota de 1 mL da solução de partição (complexo em água) é transferida para uma cubeta de quartzo para que seja lida e registrada a absorbância inicial da solução para a partição. Posteriormente, 1 mL da solução de partição (fase aquosa) foi transferido para um béquer e 1 mL de n-octanol é adicionado. Em seguida, a solução é submetida a agitação magnética por 24 horas. Após esse período, a solução é transferida para tubos de *ependorf* e submetidos a centrifugação (7 minutos) para separar totalmente as duas fases. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da fase aquosa é transferida para uma cubeta de quartzo, de caminho óptico de 1 cm, e realizada a leitura da absorbância final ($\lambda = 467 \text{ nm}$). Os procedimentos foram realizados em temperatura de 25°C e o logP foi calculado através da equação abaixo.

$$\log P = \frac{[Ru]_{\text{octanol}}}{[Ru]_{\text{água}}} \quad (7)$$

Em que $[Ru]_{\text{octanol}}$ é a concentração do composto em 1-octanol e $[Ru]_{\text{água}}$ é a concentração do composto na fase aquosa. A concentração em fase orgânica foi obtida de maneira indireta, através da determinação da absorção inicial e final, ou seja, antes e depois da partição do complexo⁵⁷. Para a quantificação da concentração em fase aquosa foi realizado curvas de calibração para cada um dos complexos. As medidas foram realizadas em duplicata.

3.2.9 Ensaios Biológicos

3.2.9.1 Microorganismos, Linhagem celular e condições de cultura

As bactérias utilizadas nesse estudo foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 11303 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, todas da American Type Culture Collection (ATCC).

As cepas foram armazenadas em uma solução de BHI (Brain Heart Infusion) e 20% (v/v) de glicerol a -80 °C. Os microrganismos foram inseridos em placas de petri contendo BHI (Brain Heart Infusion) ágar e incubados em condições aeróbicas (5% de CO₂) a 37°C durante 24 h. Após o crescimento em placas de ágar, as colônias individuais foram removidas e inoculadas em 5 mL de meio de BHI suplementado com 1% de sacarose e incubadas durante 18 h a 37°C. A cultura foi transferida para eppendorf e centrifugados (5000 rpm, 4°C por 5 min), ressuspensa em novo meio BHI estéril (2x concentrado) com 2% de sacarose. Antes de cada ensaio antibacteriano, a concentração celular final foi ajustada para 2x10⁶ unidades formadoras de colônias (cfu) mL⁻¹.

As linhagens utilizadas nesse estudo foram: HacaT ; PCS-200-011 (queratinócitos humanos), MCF-7 ; HTB-22® (adenocarcinoma de mama), A549 ; CCL-185®, (carcinoma de pulmão humano) e LS174T; CL188TM (adenocarcinoma colorretal), ambas obtidas da ATCC® (American Type Culture Collection, EUA), através do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem MCF-7 foram cultivadas em frascos T-25 contendo meio RPMI 1640 Medium (GE-Hyclone®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (GIBCO® - life Technologies), 100 U/mL de penicilina, 1% de L- Glutamina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO® - life Technologies) a 37°C, atmosfera: 95% de umidade / 5% de CO₂. As linhagens HacaT, A549 e LS174T foram cultivadas em meio DMEM (GE-Hyclone®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (GIBCO® - life Technologies), 100 U/ml de penicilina, 1% de L- Glutamina e 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO® - life Technologies) e mantidos nas mesmas condições já citadas. O meio era substituído a cada três

dias e ao atingirem 90% de confluência as células eram tratadas com tripsina (0,025% tripsina / 0,1% EDTA) e subcultivadas e/ou usadas para ensaios de viabilidade.

3.2.9.2 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 mulsão (água destilada estéril e DMSO 8%), permanecendo na concentração final de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, realizou-se uma diluição seriada para obtenção de diferentes concentrações (62,5 – 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 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).

3.2.9.3 Células cancerígenas

Após a tripsinização, as células (2×10^4 / 200 μL /poço) foram incubadas em placas de cultura de microensaios (96 poços), em uma estufa durante 24 horas a 37°C, atmosfera: 95% de umidade e 5% de CO_2 . Em seguida, o meio foi retirado e ocorreu a adição de 200 μL de meio suplementado contendo os complexos de rutênio em estudo nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após 48 horas, o meio foi retirado e substituído por 100 μL de meio não suplementado contendo o sal tetrazolium MTS (CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder, Promega, WI, USA) de acordo com recomendações do fabricante. Em um leitor de microplacas (SpectraMax i3 MultiMode Microplate Reader) com comprimento de

onda de 490 nm foi medida a densidade ótica. Foram realizados três ensaios de viabilidade independentes e em triplicata. A viabilidade celular foi calculada pela equação 8:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{extrato}) / \text{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{controle}) \times 100\% \quad (8)$$

3.2.10 Medições de ligação de avidina

3.2.10.1 Coluna de exclusão de gel

A medição da ligação do complexo Ru-biot à avidina foi realizada usando uma coluna de exclusão de gel à base de poliácridamida (micro Biospin® 6, Biorad). Esta coluna foi preparada executando uma troca de tampão usando tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, conforme recomendado pelo fabricante. Três amostras foram preparadas nesse tampão, A: apenas Ru-biot (100 µM), B: Ru-biot (100 µM) com avidina (100 µM) e C: Ru-biot (100 µM) com avidina (100 µM) mais biotina (1 mM). Essas amostras foram incubadas por 1h antes de serem aplicadas na coluna. A amostra excluída foi coletada seguindo as instruções do fabricante (1.000 x g por 4 min) e usada para obter um espectro eletrônico.

3.2.10.2 Titulação de luminescência

Uma solução estoque de Ru-biot (395 µM, em 4% DMSO / água) foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, e adicionada a uma cubeta contendo 500 µL de uma solução de avidina (4 µM ou 16 µM de locais de ligação), e também para outra cubeta sem avidina como controle. Cada adição de Ru-biot foi de 2 µL até 24 µL no total, ou ca. Concentração final de 19 µM, que evitou quaisquer efeitos de diluição significativos. Foi realizado um tempo de incubação de 2 min após cada adição de Ru-biot. Após esta titulação, biotina (100 mM) foi adicionada à cubeta para atingir 5, 10, 20 e 100 vezes o excesso molar de biotina em comparação com Ru-biot, onde os espectros de luminescência foram obtidos.

3.3 Síntese dos ligantes

3.3.1 Síntese dos compostos 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico (bpy-COOH) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

Os compostos precursores, bpy-COOH e dppz foram preparados conforme descritos na literatura (McCAFFERTY, et al., 1995; DIGKESON; SUMMERS, 1970).

3.3.2 Síntese do 4' metil -N-(antracên-2-il) -[2,2'bipiridina] - 4 - carboxamida (bpy-anth)

Para a síntese do ligante bpy-anth foi realizado o seguinte procedimento: dissolveu-se 100 mg (0,471 mmol) de 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico e 87 µL (0,619 mmol)

de N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) em 5 mL de DMF sob agitação. Após 30 minutos foi adicionado 63,1mg (0,466 mmol) de 1-hidróxi-benzotriazol, agitando-o por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 135 mg (0,706 mmol) de 2-aminoantraceno) e 20 μ L (0,181 mmol) de N-metilmorfolina. A reação processou-se durante toda a noite a temperatura ambiente. Após esse período, a solução resultante foi precipitada com água, filtrada e lavados com acetona gelada. Rendimento: 65%.

3.3.3 Síntese da 4-(N-((2-biotinamido)etil)amido)- 4'- metil-2,2'-bipiridina(bpy-biot)

O procedimento foi semelhante ao descrito para a preparação do ligante 4'-metil-N-(antracen-2-il)-[2,2'bipiridina]-4-carboxamida, exceto que foi adicionado 95 mg (0,33 mmol) de biotiniletlenodiamino, ao invés de 2-aminoantraceno. Rendimento: 69%.

3.4 Síntese dos complexos

3.4.1 Síntese do complexo precursor [Ru(dppz)(bpy-ant)Cl₂] – (Ru-dppzCl₂)

Para a síntese do complexo precursor, utilizou-se metodologia semelhante à da literatura para obtenção do complexo [Ru(bpy)₂Cl₂] (LISKA, et al., 1988). Para tal, solubilizou-se 100 mg (0,397 mmol) de RuCl₃.3H₂O juntamente com 150 mg (0,532 mmol) de dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, 155,6 mg (0,4 mmol) de 4' metil -N-(antracen-2-il) -[2,2'bipiridina]-4-carboxamida e 131 mg de LiCl (3,096 mmol) em 40 mL de DMF. Manteve-se a mistura sob refluxo e agitação por 8 horas. Após este período um precipitado preto foi recolhido por filtração, lavado com acetona gelada e seco a vácuo. Rendimento: 70%

3.4.2 Síntese do complexo [Ru(bpy-anth)(bpy-biot)(dppz)](PF₆)₂ - (Ru-biot)

Em um balão de 50 mL dissolveu-se 100 mg (0,118 mmol) de [Ru(bpy-anth)(dppz)Cl₂] com 75 mg (0,176 mmol) do ligante bpy-biot em uma relação estequiométrica complexo precursor/ligante (1:1,5) em 30 mL de etanol. Manteve-se a reação sob refluxo e agitação por 12 horas. Ao final desse período, a mistura foi rotoevaporada até a secura. Posteriormente o sólido foi dissolvido em 20 mL de água destilada com agitação e aquecimento a 55°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se gotas de solução saturada de NH₄PF₆ para precipitação e agitou-se por 30 minutos. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado com água e seco a vácuo. Rendimento: 55%

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos compostos

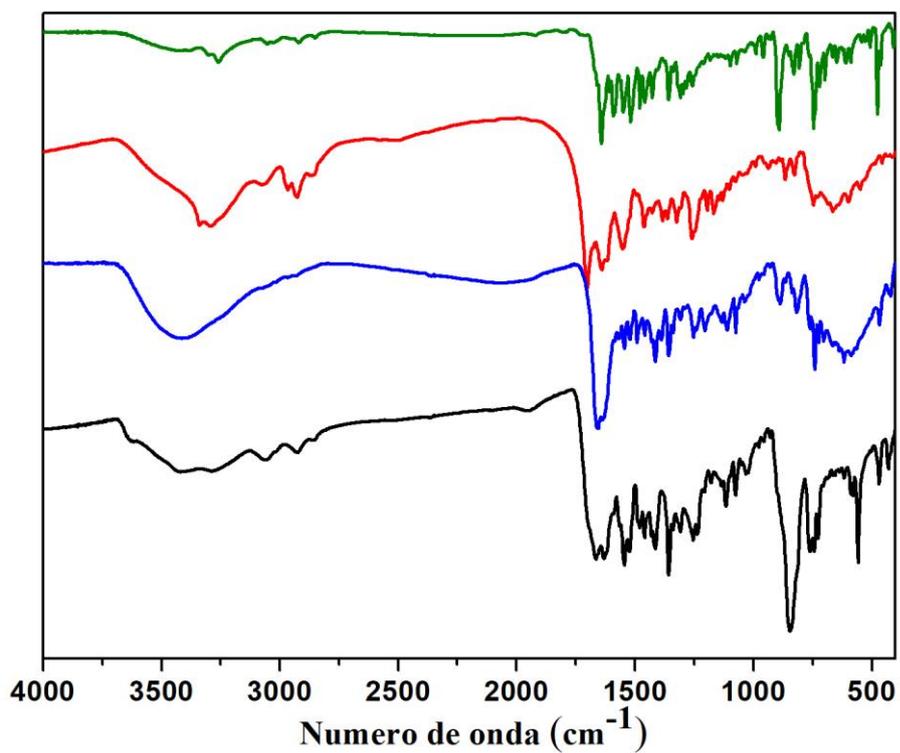
4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

A Figura 8 ilustra os espectros vibracionais na região do Infravermelho para os ligantes bpy-biot e bpy-anth, bem como os complexos Ru-dppzCl₂ e **Ru-biot**, em pastilha de KBr. As atribuições das bandas observadas foram feitas com base na literatura e estão sumarizadas na Tabela 1 (PAVIA, et al., 2010; KATCKA; URBANSKI, 1964; SILVERSTEIN, et al., 2005; LO; LAU, 2007; HARRISON, et al., 2013).

A banda em 1643 cm⁻¹ no espectro de Infravermelho do ligante bpy-anth é indicativa do acoplamento da 4-metil-2,2'-bipiridina-4'-ácido carboxílico com o corante 2-aminoantraceno. Esta frequência é atribuída ao estiramento da ligação dupla carbono-oxigênio da amida. Para o ligante bpy-biot, as bandas de estiramento da ligação C=O em 1690 e 1635 cm⁻¹ são referentes a amida cíclica da biotina e a amida alifática, respectivamente. A ausência da banda em 1700 cm⁻¹ relativo a carbonila do ligante de partida 4-metil-2,2'-bipiridina-4'-ácido carboxílico reforça, em ambos os casos, a obtenção dos compostos desejados.

Nos complexos Ru-dppzCl₂ e **Ru-biot**, os estiramentos C=O do grupamento amida apresentam frequências vibracionais em 1657 e 1631 cm⁻¹, respectivamente. O estiramento C=O do grupo amida pertencente a cadeia cíclica do fragmento biotina do complexo **Ru-biot** é observado em torno de 1665 cm⁻¹ e o forte sinal em 840 cm⁻¹ foi atribuído a deformação angular do ânion PF₆⁻. Na Tabela 1, as principais tentativas de atribuição das frequências vibracionais estão relacionadas.

Figura 8 - Espectro vibracional na região do Infravermelho dos compostos: bpy-anth (—), bpy-biot (—), Ru-dppzCl₂ (—) e Ru -biot (—) em pastilha de KBr.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Bandas mais relevantes dos ligantes e complexos sintetizados medidos por FTIR.

$\bar{\nu}$ (cm^{-1})				
bpy-anth	bpy-biot	Ru-dppzCl ₂	Ru-biot	Atribuição
3255	3302	3077	3287 – 3060	ν (N-H) (amida)
2932	2940	2936	2929	ν (C-H) da metila
-	2851	-	2856	ν (C-H) de CH ₂
1643	1635	1657	1631	ν (C=O) de amida alifática
-	1690	-	1665	ν (C=O) de amida cíclica
1587 – 1546	1553	1568 – 1541	1545 – 1525	ν (C=C) de aromáticos
1477– 1430	1464	1490 – 1410	1460 – 1412	ν (C=C) e ν (C=N) de anéis bipiridínicos
1359	1333	1357	1358	δ (C-H) da metila
1106	1120	1074	1076	ν (C-N) de aromáticos
-	-	-	840	δ PF ₆ ⁻
763	737	742	763-742	δ (C-H) aromáticos

ν = estiramento simétrico; δ = deformação angular.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.2 Análise Elementar

A fim de validar a formulação proposta dos compostos sintetizados, empregou-se análise elementar de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre (CHNS), cujos resultados estão apresentados na Tabela 2, no qual em parêntese encontra-se os resultados teóricos.

Tabela 2 - Dados de análise elemental de C, N, H e S para o ligante bpy-biot e complexo **Ru-biot**.

Composto	Experimental (Teórico)			
	C%	H%	N%	S%
bpy-biot (C ₂₄ H ₃₀ N ₆ O ₃ S)	59,24 (59,73)	6,28 (6,26)	17,62 (17,41)	6,69 (6,64)
[Ru(bpy-anth)(bpy-biot)(dppz)](PF₆)₂·2H₂O (RuC ₆₈ H ₅₉ N ₁₃ O ₄ S)	51,79 (51,64)	4,01 (4,01)	11,55 (11,51)	2,04 (2,02)

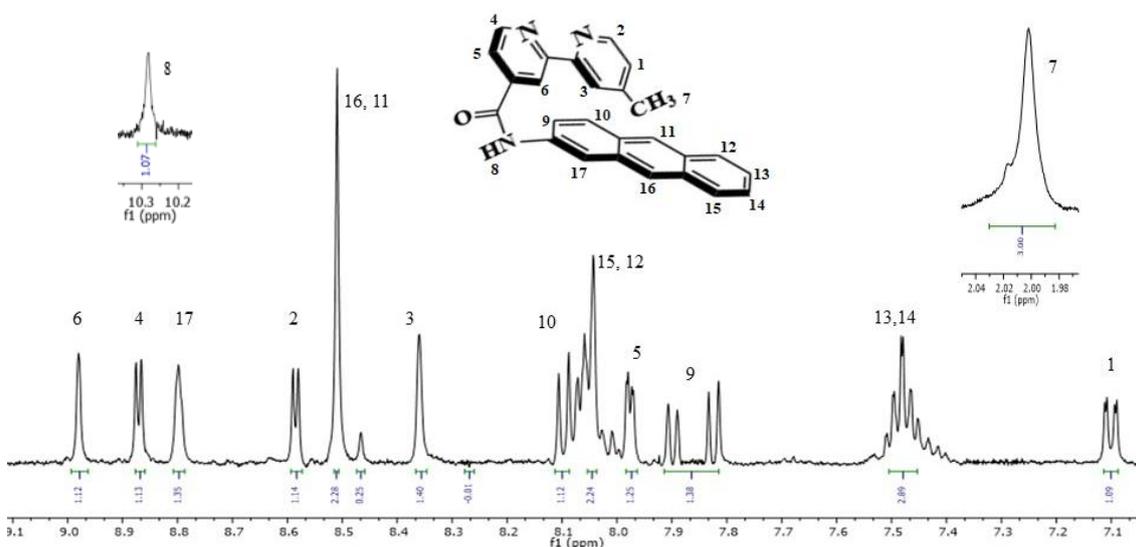
Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com os dados da Tabela 2, pode-se observar que os valores teóricos estão coerentes com os obtidos experimentalmente tanto para o ligante contendo biotina quanto para o complexo, confirmando a proposta molecular do complexo.

4.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H

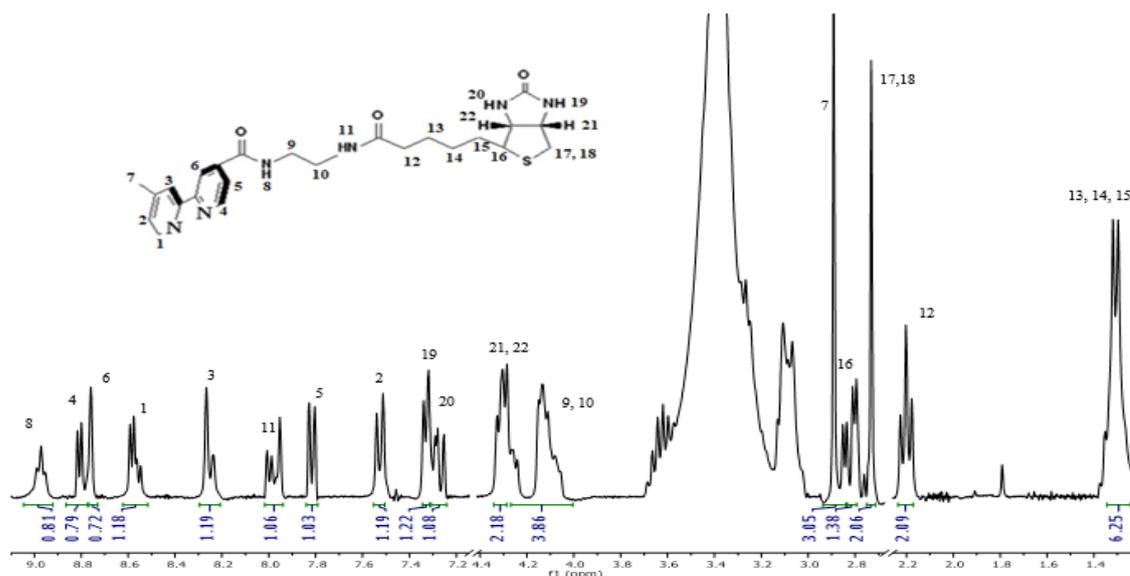
Os espectros de RMN de ¹H para os ligantes bpy-anth e bpy-biot obtidos em DMSO deuterado estão ilustrados nas Figuras 9 e 10. O espectro do ligante dppz se encontra no Apêndice A. As atribuições foram realizadas conforme a literatura (LO; LEE, 2006; ZIGLER, et al., 2006).

Figura 9 - Espectro de Ressonância Magnética de ¹H para o ligante bpy-anth em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 10 - Espectro de Ressonância Magnética de ^1H para o ligante bpy-biot em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.



Fonte: elaborada pelo autor.

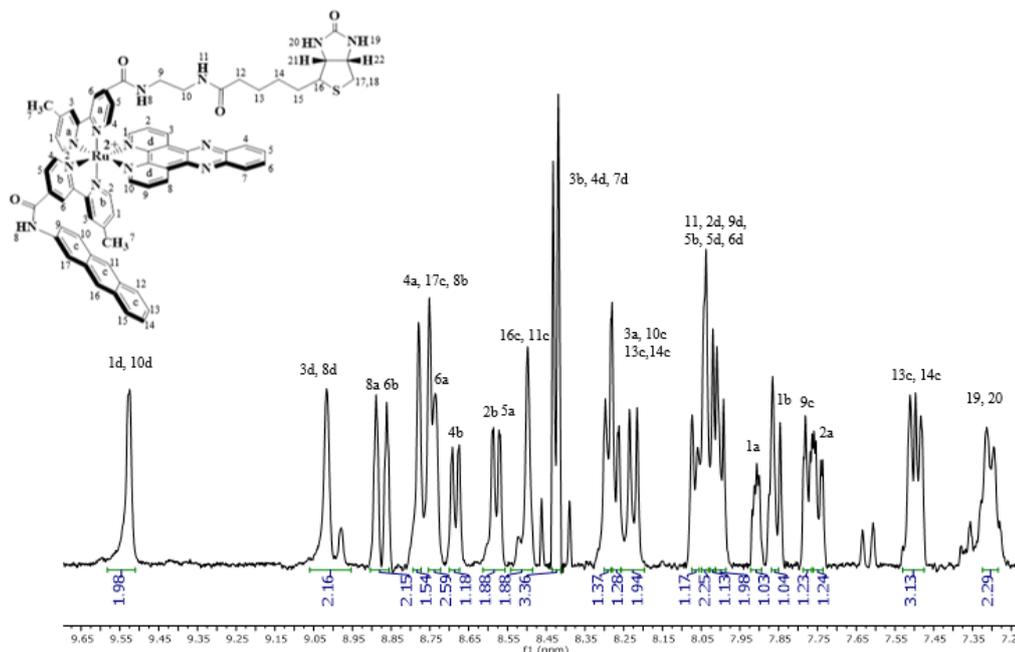
Com a perda da simetria do ligante 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, após o acoplamento do 2-aminoantraceno, foi observado 6 sinais de hidrogênio não equivalentes no espectro de hidrogênio para o fragmento bipiridínico. O sinal menos protegido do composto encontra-se em 10,28 ppm, relativo ao hidrogênio amídico (8) e o mais protegido encontra-se em 2,47 ppm, do grupo metila (7). Os sinais em 8,80 (17), 8,51 (16, 11), 8,09 (10), 8,05 (15, 12), 7,86 (9) e 7,48 (13,14) ppm são relativos aos hidrogênios do grupo antracênico.

Similarmente, 6 sinais são observados para a bipiridina modificada com o ligante biotina. Para este ligante, no entanto, o hidrogênio mais desprotegido é o 4 que está próximo ao N piridínico. O singlete em 2,89 ppm é referente ao hidrogênio 7 do grupo metila. Os hidrogênios amídicos alifáticos 8 e 11 apresentam deslocamentos químicos em 8,97 e 7,98 ppm, respectivamente, enquanto os hidrogênios amídicos cíclicos 19 e 20 estão na região de 7,32-7,6 ppm. Os sinais em 1,31 (13, 14 e 15) e 2,19 (12) ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos da biotina, enquanto os hidrogênios da cadeia cíclica da biotina estão em 4,28 (21, 22), 2,85 (16) e 2,72 (17,18) ppm.

Os espectros de RMN de ^1H para o complexo está apresentado na Figura 11. As atribuições dos sinais de hidrogênios observados foram realizadas de acordo com a literatura (LO; LEE, 2006; ZIGLER, et al., 2006; SOLOMONS, et al., 2014). O espectro bidimensional COSY de RMN ^1H (Apêndice C) auxiliou na atribuição dos picos, além da análise comparativa com os ligantes livres e as integrações. Comparando-se o espectro de RMN de ^1H dos ligantes livres (figura 7 e 8, anexo A) nas mesmas condições, observou-se o deslocamento de alguns

picos ao longo do espectro, isso devido à presença de ligantes π aceptores, promovendo uma retrodoação com o centro metálico.

Figura 11 - Espectro de Ressonância Magnética de ^1H para o complexo **Ru-biot** em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.



Fonte: elaborada pelo autor.

Os hidrogênios do dppz H-1 e H-10, próximos ao N piridínico, apresentaram equivalência magnética em torno de 9,56 ppm, assim como os H-3 e H-8 em 9,01 ppm, H-4 e H-7 em 8,43 ppm, H-2 e H-9 em 8,04 ppm, e H-5 e H-6 em 8,00 ppm. Através do espectro bidimensional COSY (Anexo C) foi visto o acoplamento dos hidrogênios do ligante dppz (H-1 e H-10; H-2 e H-9; H-4 e H-7; H-5 e H-6).

Com relação à bipyridina funcionalizada com o antraceno há um singlete em 8,51 ppm, referente aos hidrogênios 16c e 11c, que quando comparada ao ligante livre têm os mesmos hidrogênios em 8,50 ppm. Os hidrogênios 4b e 5b aparecem em 8,68 ppm e 8,02 ppm, respectivamente, sendo possível observar seus acoplamentos. Em torno de 7,50 ppm é visto um tripleto referente aos hidrogênios 13c e 14c. Na faixa de hidrogênio ligado a carbono alifático aparece um singlete associado aos hidrogênios do grupo metila em 1,89 ppm (Anexo B).

Para a bipyridina funcionalizada com a biotina o sinal em torno de 7,31 ppm é atribuído aos hidrogênios H-19 e H-20, no qual aparecem em torno de 7,29 ppm no ligante livre, o que torna a atribuição consistente. O hidrogênio 1a em 7,91 ppm acopla com o 2a em torno de 7,74 ppm, o 5a em 8,57 ppm acopla com o 4a em 8,82 ppm (Anexo C). Os hidrogênios H-21 e H-22 aparecem em 4,51 ppm como multipletos, no ligante livre aparecem em 4,28 ppm.

Na faixa de hidrogênio ligado a carbono alifático aparecem dois singletos associados aos hidrogênios do grupo metila, um em 1,89 ppm referente ao grupo metila presente na bpy-anth e outro em 2,53 ppm referente ao grupo metila na bpy-biot (Anexo B).

Podemos concluir que os espectros de RMN de ^1H indicam a coordenação dos ligantes funcionalizados ao centro metálico. Todas as atribuições dos espectros de RMN ^1H para os compostos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e atribuições para os ligantes (bpy-anth e bpy-biot) e **Ru-biot**.

	Ru-biot		Ligantes	
	δ (ppm)	H	δ (ppm)	H
bpy-anth	8,86	6b	8,98	6
	8,68	4b	8,87	4
	8,78	17c	8,80	17
	8,58	2b	8,58	2
	8,50	16c, 11c	8,51	16, 11
	8,45 – 8,47	3b	8,36	3
	8,26	10c	8,09	10
	8,22	15c, 12c	8,05	15, 12
	8,02	5b	7,97	5
	7,78	9c	7,86	9
	7,55 – 7,45	13c, 14c	7,48	13,14
	7,86	1b	7,10	1
	8,79	8b	10,28	8
1,89	7b	2,47	7	
Bpy-biot	8,89	8 a	8,97	8
	8,82	4 a	8,82	4
	8,74 – 8,71	6 a	8,76	6
	7,90	1 a	8,57	1
	8,30	3 a	8,25	3
	8,06	11	7,98	11
	8,57	5 a	7,82	5
	7,74	2 a	7,52	2
	7,35 – 7,24	19, 20	7,32 - 7,26	19, 20
	4,51	21, 22	4,28	21, 22
	4,36	9, 10	4,12	9, 10
	2,56	7 a	2,89	7
	2,77 – 2,74	16	2,85 – 2,79	16
	2,49 - 2,45	17, 18	2,72	17,18
	1,85	12	2,19	12
1,63	13, 14, 15	1,31	13, 14, 15	

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3 (cont.)- Deslocamentos químicos de RMN ^1H e atribuições para os ligantes (bpy-anth e bpy-biot) e **Ru-biot** (continuação).

	Ru-biot		Ligantes	
	δ (ppm)	H	δ (ppm)	H
dppz	9,56	1d, 10d	9,69	1, 10
	9,01	3d, 8d	9,53	3, 8
	8,45 – 8,40	4d, 7d	8,40	4, 7
	8,04	2d, 9d	7,98	2, 9
	8,00	5d, 6d	7,85	5, 6

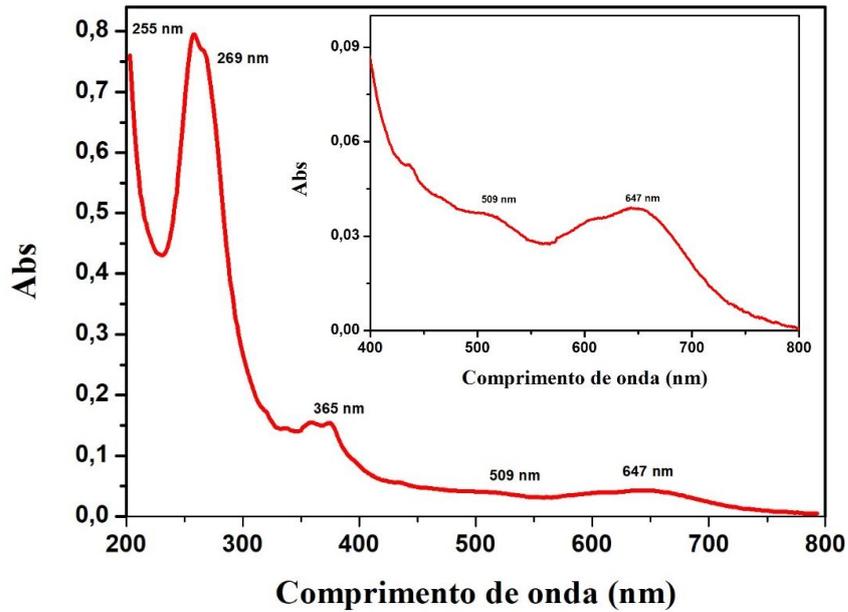
Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.4 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os espectros eletrônicos (Figuras 12 e 13) dos complexos Ru-dppzCl₂ e **Ru-biot** foram obtidos em solução utilizando como solvente acetonitrila.

O espectro eletrônico do Ru-dppzCl₂ apresenta duas bandas de baixas intensidades em 509 nm e 647 nm, originadas das transições do tipo transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) provenientes dos orbitais $d\pi$ (Ru^{II}) para os orbitais $p\pi^*$ dos ligantes bipyridínicos (LISKA, et al 1988). A absorção das transições intraligantes ($p\pi^* \leftarrow p\pi$) do ligante dppz encontra-se por volta de 365 nm (CHEN, et al., 2011) e as intensas bandas de alta energia em 255 e 269 nm correspondem às transições intraligante $p\pi^* \leftarrow p\pi$ dos ligantes bipyridínicos e anéis aromáticos do grupo antracênil (ABREU, et al., 2017).

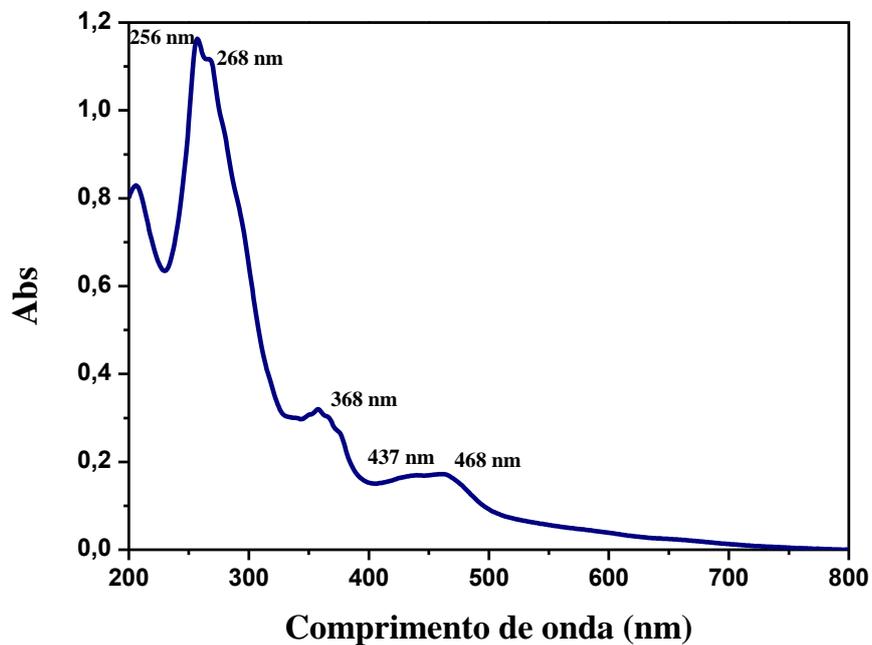
Figura 12 - Espectro eletrônico na região do uv-vís do complexo Ru-dppzCl₂ em acetonitrila na concentração de $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Inset: Expansão da região entre 400 – 800 nm.



Fonte: elaborada pelo autor.

A Figura 13 ilustra o espectro de absorção eletrônica para o complexo **Ru-biot** em acetonitrila.

Figura 13 - Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível do **Ru-biot** em acetonitrila na concentração $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



Fonte: elaborada pelo autor.

As bandas em 256 e 268 nm foram atribuídas majoritariamente às transições do tipo intraligantes ($p\pi^* \leftarrow p\pi$) dos anéis bipyridínicos e anéis aromáticos do grupo antracênil (PERKAMPUS, et al., 1966), que são comuns a ambos os complexos. Observou-se que a troca dos íons cloreto pelo ligante 4-metil-2,2'-bipiridina-4'-(*N*-((2-biotinamido)etil)amido) (bpy-biot) alterou a energia de absorção da banda MLCT ($p\pi^* \leftarrow d\pi$) para o complexo obtido, com deslocamento das bandas em 509 e 647 nm para 437 e 468 nm (LO; LEE, 2004; TROIANGAUTIER; MOUCHERON, 2014). Esse resultado é esperado, e se explica devido à natureza π aceptora dos ligantes bipyridínicos no complexo, que por efeito de retrodoação (π – backbonding) tendem a aumentar a magnitude dos desdobramentos dos orbitais ligantes e antiligantes, diminuindo mais pronunciadamente a energia dos orbitais do tipo t_{2g} e apresentando como consequência absorções em maior energia (ATKINS; SHRIVER, 2008). A Tabela 4 exibe de forma resumida todas as transições e os respectivos coeficientes de absorvidade medidos.

Tabela 4 – Transições eletrônicas na região do UV-vis para os complexos Ru-dppzCl₂ e Ru-biot em acetonitrila.

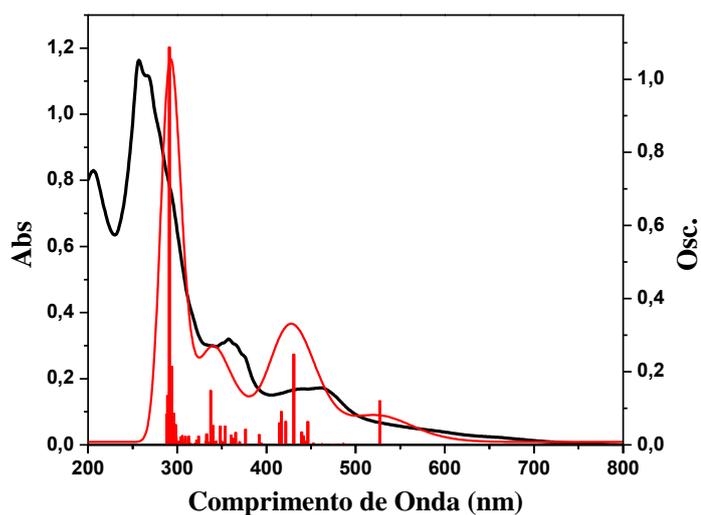
Complexos	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm} (\epsilon / \text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Atribuição	
Ru-dppzCl₂	255 (31.921)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$	IL (bpy-anth)
	365 (6.505)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$	LLCT (dppz)
	509 (1.046)	$p\pi^* \leftarrow d\pi$	MLCT
	647 (1.193)	$p\pi^* \leftarrow d\pi$	MLCT
Ru-biot	256 (60.036)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$	IL (bpy-anth)
	268 (54.387)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$	IL (bpy-biot)
	368 (20.935)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$	LLCT (dppz)
	437 (12.926)	$p\pi^* \leftarrow d\pi$	MLCT
	468 (13.211)	$p\pi^* \leftarrow d\pi$	MLCT

Fonte: elaborada pelo autor.

Estudos computacionais também foram realizados a fim de investigar a natureza das transições eletrônicas do complexo, utilizando teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT). Os resultados de TD-DFT reforçaram que as bandas de baixa energia entre 400-550 nm são atribuídas à transição MLCT (transição de carga de metal para ligante). Indicaram também as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (IL-intraligante e LLCT-ligante-ligante via transferência de carga) referente aos ligantes aromáticos do antracênil e bipyridínicos. Os

espectros calculados via TD-DFT são apresentados na figura 14. É bastante razoável a concordância entre os espectros teóricos e experimentais. Desse modo, podemos interpretar com confiabilidade as propriedades espectroscópicas dos complexos em termos de energia e distribuição espacial dos orbitais moleculares.

Figura 14 - Espectros eletrônicos do complexo **Ru-biot** em Acetonitrila, experimental (—) e teórico (—)



Fonte: elaborada pelo autor.

As transições eletrônicas do tipo MLCT previstas teoricamente (Tabela 5) são predominantemente atribuídas a transferência de carga de orbitais centrados no rutênio (HOMO-1, HOMO-3 e HOMO-4) para orbitais dos ligantes bipyridina e dppz (LUMO, LUMO+1, LUMO+2, LUMO+3).

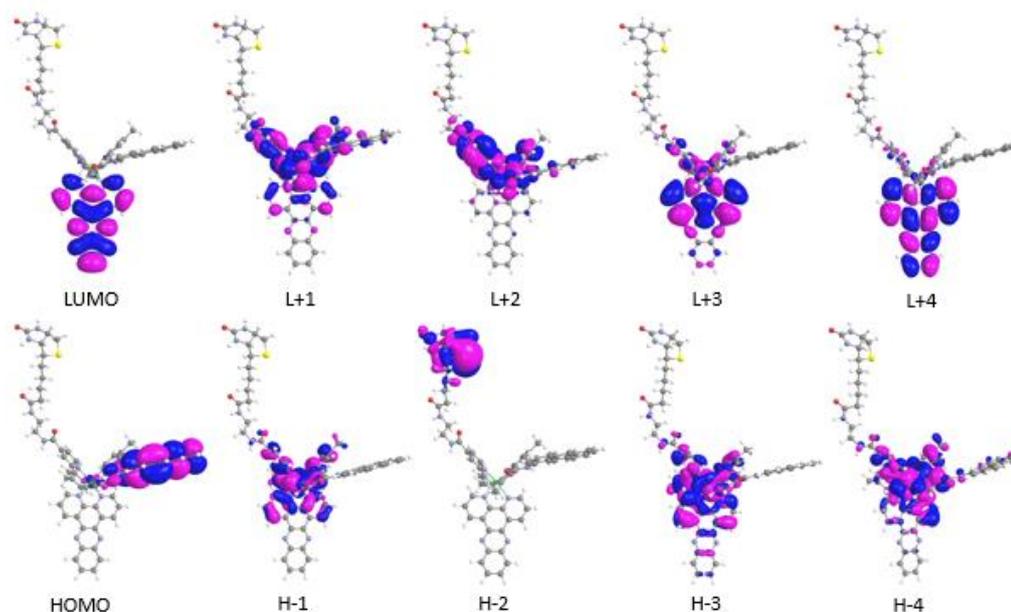
Tabela 5 - Transições calculadas de estado singlete para o complexo **Ru-biot**.

Exp. λ (nm)	Calc. λ (nm)	f (teórica)	Maior contribuição	Caráter	
580	540	0,0013	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	$\pi(\text{anth}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	LLCT
550	527	0,1207	HOMO \rightarrow L+1 (89%)	$\pi(\text{anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	ILCT
457	430	0,2485	H-4 \rightarrow L+1 (46%) H-3 \rightarrow L+2 (28%)	$d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$ $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-biot})$	MLCT
437	416	0,0916	H-4 \rightarrow L+2 (23%) H-3 \rightarrow L+3 (30%)	$d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-biot})$ $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	MLCT
368	337	0,1493	H-12 \rightarrow LUMO (59%) H-9 \rightarrow L+4 (21%)	$\pi(\text{biot}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$ $\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	LLCT
268	293	0,2147	H-16 \rightarrow L+2 (28%) H-15 \rightarrow L+2 (29%)	$\pi(\text{bpy-biot}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-biot})$ $\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-biot})$	IL
256	291	1,0885	H-12 \rightarrow LUMO (13%) H-9 \rightarrow L+4 (43%)	$\pi(\text{biot}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$ $\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	IL

Fonte: elaborada pelo autor.

A fim de compreendermos acerca da distribuição espacial dos orbitais moleculares de fronteira do complexo, calculou-se as superfícies de contorno dos orbitais. Elas estão representadas na figura 15.

Figura 15 - Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo **Ru-biot** calculados por TD-DFT.

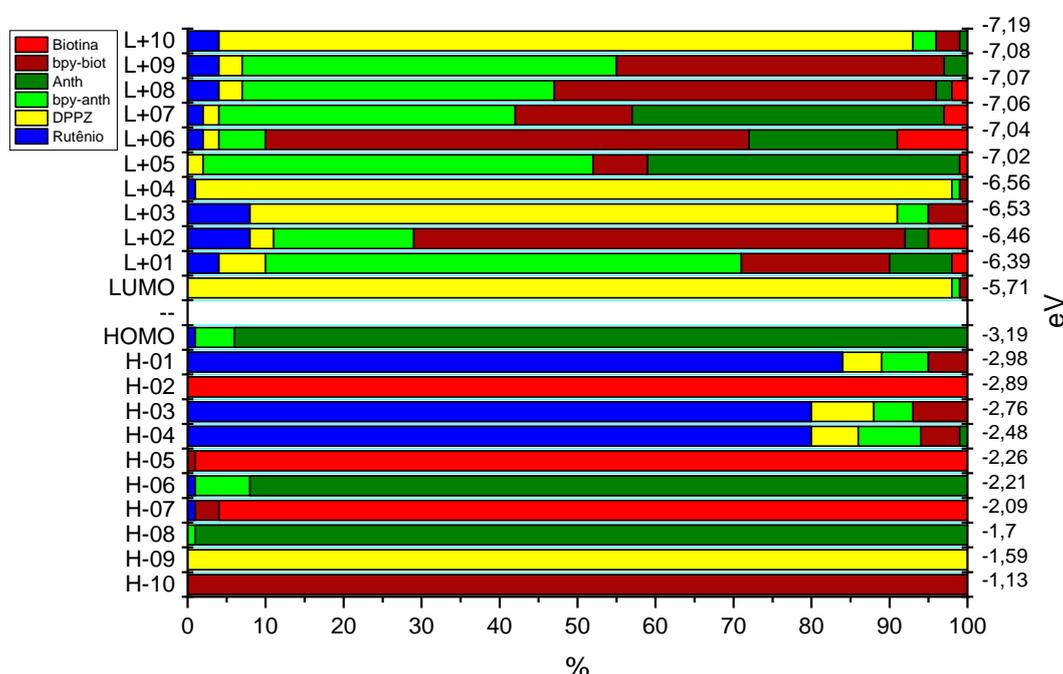


Fonte: elaborada pelo autor.

No complexo metálico, o átomo de rutênio contribui majoritariamente com os orbitais HOMO-1, HOMO-3 e HOMO-4, como observado na Figura 15. Frequentemente, a literatura descreve orbitais HOMO com um caráter estritamente do metal em sistemas polipiridínicos. Por outro lado, o orbital LUMO possui contribuição majoritariamente do ligante dppz, LUMO+1 do anth, LUMO+2 do bpy-biot e LUMO+3 do dppz (figura 16). A participação dos orbitais aril pode justificar o aparecimento das transições do tipo IL e LLCT (Tabela 5) em torno de 520nm nos espectros teóricos. De acordo com os cálculos de TD-DFT, a menor transição de energia vem de HOMO \rightarrow LUMO e HOMO \rightarrow LUMO + 1 com a banda de absorção em 540 e 527 nm, que foram atribuídas as transições de transferência de carga intraligante (ILCT) e transferência de carga ligante-ligante (LLCT). A diferença de energia HOMO – LUMO foi calculada em 2,52 eV, o que é totalmente consistente com o intervalo eletroquímico de 2,32 eV. Além disso, a banda MLCT observada em 468 nm e calculada em 430 nm é uma transição que envolve principalmente os orbitais HOMO-4 (Ru ($d\pi$)) para o LUMO +1 (bpy-anth, π^*), mas também com contribuições de HOMO-3 (Ru ($d\pi$)) para o LUMO +2 (bpy-biot, π^*) e HOMO-4 (Ru ($d\pi$)) para o LUMO (dppz, π^*). O ombro, observado em 437 nm foi previsto por TD-DFT em 416 nm, é formado principalmente por uma transição de HOMO-3 para o LUMO e HOMO-3 para o LUMO+3, indicando um caráter de transferência

de carga do Ru ($d\pi$) para ($dppz, \pi^*$) e também uma contribuição da transferência de carga de Ru ($d\pi$) (HOMO-4) para LUMO+2 (bpy-biot, π^*).

Figura 16 - Contribuições dos orbitais moleculares da espécie **Ru-biot** em função de seus fragmentos: Ru (—), bpy-biot (—), bpy-anth (—), anth (—), biot (—) e dppz (—).



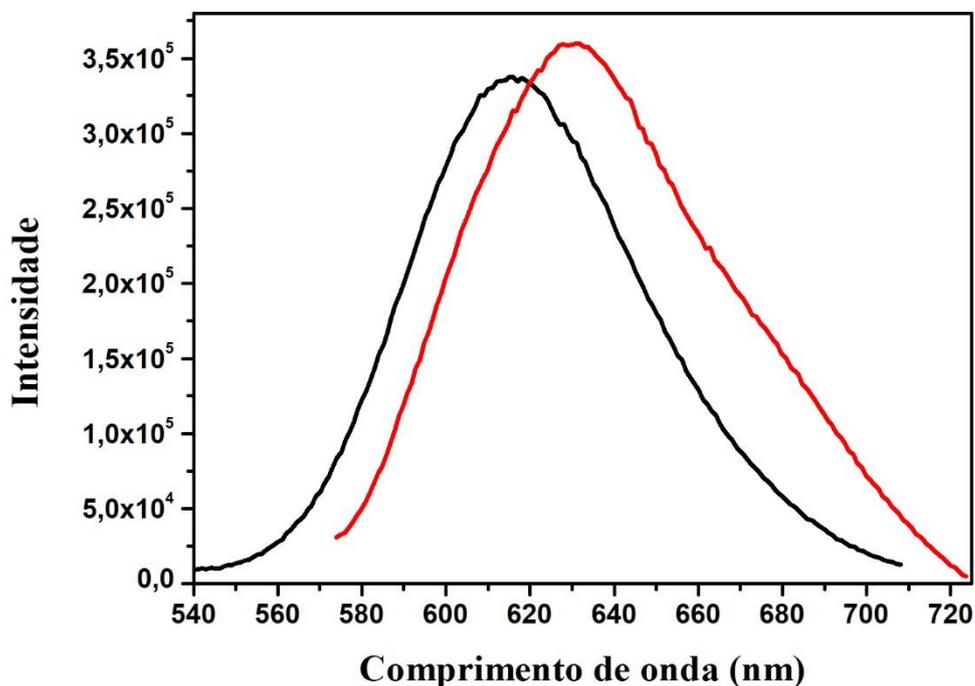
Fonte: elaborada pelo autor.

O estudo teórico, portanto, mapeou a energia e a distribuição dos orbitais moleculares de fronteira dos complexos, possibilitando o conhecimento da natureza e origem das transições eletrônicas de absorção observadas experimentalmente.

4.1.5 Espectroscopia de emissão

As propriedades luminescentes para o complexo **Ru-biot** e o complexo padrão de referência $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ estão apresentadas na Figura 17. Os complexos foram excitados no máximo de absorção (457 nm) da banda de transferência de carga metal para o ligante (MLCT), e observou-se uma banda larga com máximo de emissão em 631 e 618 nm, respectivamente. Os perfis espectrais apresentados são característicos de sistemas polipiridínicos de rutênio e do estado $^3\text{MLCT}$ originados do decaimento de estados $^1\text{MLCT}$ por conversões intersistema (JURIS, et al., 1988; KIRGAN, et al., 2007; YANG, et al., 2001). O máximo de emissão do **Ru-biot** é deslocado para o vermelho quando comparado ao $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, implicando na estabilização do estado $^3\text{MLCT}$ para o complexo **Ru-biot**.

Figura 17 - Espectro de emissão (excitação de 457 nm) para o **Ru-biot** (—) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (—) em acetonitrila, na concentração de $8,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C .



Fonte: elaborada pelo autor.

Os valores de rendimento quântico de emissão na presença de diferentes solventes (DMF, metanol, acetonitrila, diclorometano) foram calculados por excitação da banda MLCT em 460 nm. De acordo com a tabela, tem-se que com a mudança da polaridade do meio há um efeito de solvatocromismo, um deslocamento batocrômico (aumento do comprimento de onda de emissão) é visto com o aumento da polaridade do solvente, isso devido à estabilização do estado MLCT com solventes polares (SLIM; SLEIMAN, 2004). Analisando os valores de rendimento quântico, observou-se que no diclorometano (solvente mais apolar) o valor de rendimento quântico é o maior, inferindo que os processos de desativação intramolecular são minimizados em solventes apolares (REICHARDT, 1988; LAKOWICZ, 1983). Já em solvente polar prótico (metanol), o complexo possui o menor valor de rendimento quântico quando comparado aos solventes apróticos (acetonitrila, DMF e diclorometano), sendo resultado da perda de energia através de vias não radiativas (JURIS, et al., 1988).

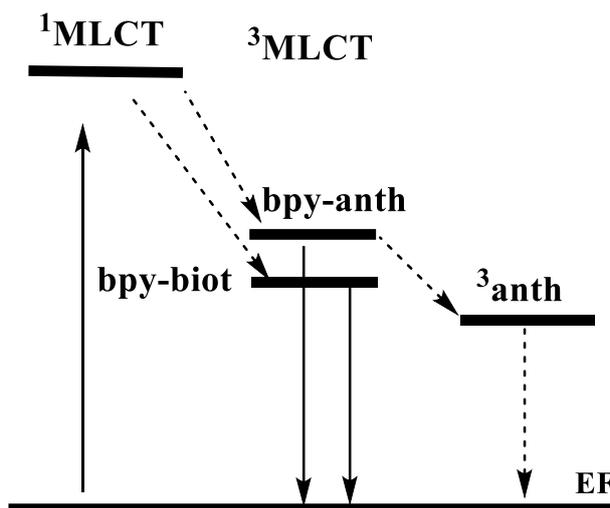
Tabela 6 - Rendimento quântico de emissão em diferentes solventes.

	$\Phi_{em}(\lambda_{em}(nm))$			
	Diclorometano	DMF	Acetonitrila	Metanol
Ru-biot	0,097 (610)	0,078 (646)	0,070 (631)	0,042 (636)
Ru-anth*	0,031 (627)	0,014 (660)	0,013 (648)	0,0055 (655)

Fonte: elaborada pelo autor. *ABREU, et al., 2017.

Os valores de rendimento quântico de emissão foram calculados de acordo com a equação 1. O complexo com o substituinte biotina apresenta maior valor de rendimento quântico de emissão quando comparado com o complexo sem esse substituinte, o Ru-anth (Tabela 6), sugerindo que o estado 3MLCT mais estável está localizado no fragmento Ru(bpy-biot). No caso do complexo Ru-anth, o estado 3MLCT localiza-se no Ru(bpy-anth), que por sua vez transfere energia para o estado $^3\pi\pi$ do ligante antraceno, ocasionando supressão de luminescência do composto (Figura 18).

Figura 18 - Diagrama hipotético simplificado de energia dos compostos Ru-anth e **Ru-biot**. EF: estado fundamental.

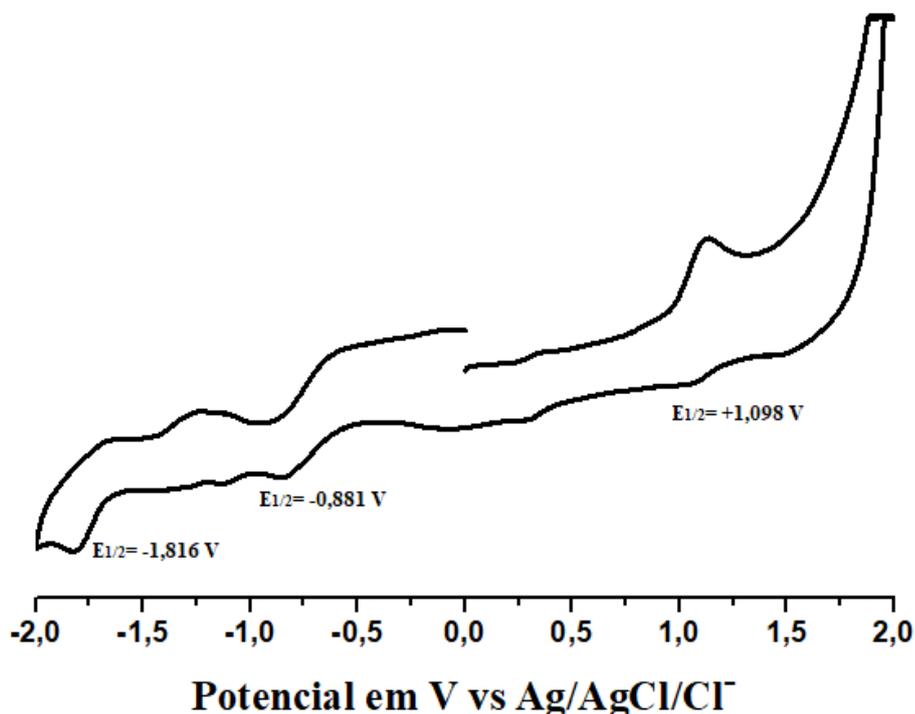


Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.6 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica relevante que fornece informações sobre a natureza redox do composto. O voltamograma cíclico do precursor Ru-dppzCl₂ em 0,1 mol L⁻¹ de PTBA e a 100 mV s⁻¹ está ilustrado na Figura 19. Observa-se um processo de oxidação Ru²⁺ → Ru³⁺ (E_{ox}= 1,10V) irreversível vs Ag/AgCl.

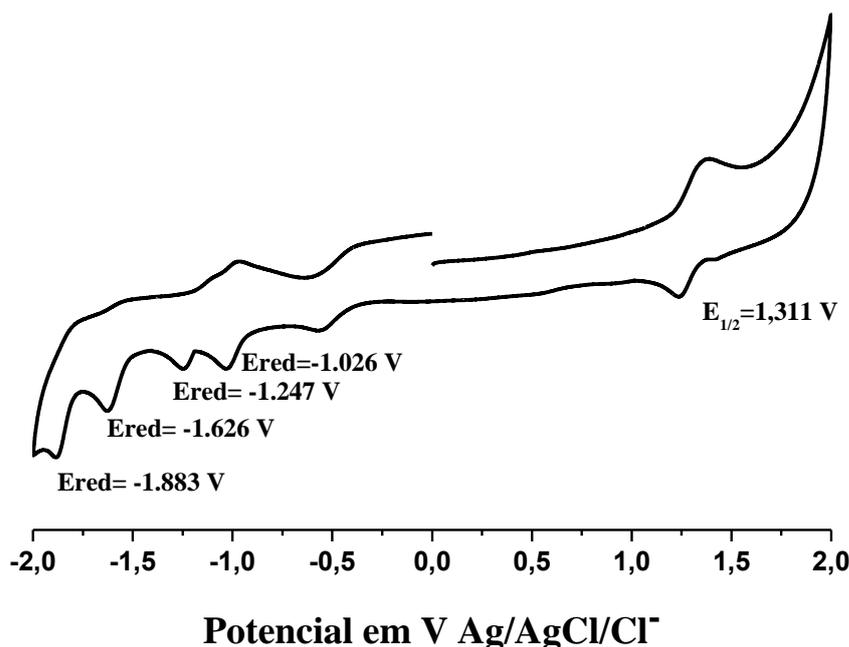
Figura 19 - Voltamograma cíclico do complexo precursor Ru-dpppzCl₂ obtidos em meio de acetonitrila contendo PTBA 0,1 mol L⁻¹ (eletrólito de suporte) com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag|AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se ferroceno como padrão interno.



Fonte: elaborada pelo autor.

O potencial de meia-onda referente ao par redox Ru^{III/II} do complexo **Ru-biot** (Figura 20) é de +1,31 V (processo reversível). Percebeu-se o deslocamento de potencial para valores mais positivos quando comparando com o precursor Rudppz-Cl₂, o qual é descrito na literatura para complexos de rutênio polipiridínicos, cujos valores de potencial de oxidação do centro metálico são alterados de acordo com a natureza dos ligantes. Pode-se comparar os valores de potenciais redox de diferentes complexos na Tabela 7 (YANG, et al., 2001). Após a coordenação da bipyridina substituída pelo grupo biotiniletlenodiamino ocorreu um deslocamento do potencial, revelando uma maior estabilidade devido a retrodoação entre os orbitais π^* do ligante e os orbitais $d\pi^*$ do centro metálico, assim há uma deslocalização de densidade eletrônica do rutênio em direção aos ligantes (TROIAN-GAUTIER; MOUCHERON, 2014).

Figura 20 - Voltamograma cíclico do complexo **Ru-biot** obtido em acetonitrila contendo PTBA $0,1\text{mol L}^{-1}$ (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.



Fonte: elaborada pelo autor.

Os potenciais observados na região negativa de potencial caracterizam a redução dos ligantes bipyridínicos, dppz, antraceno e biotina, sugerindo, portanto, a coordenação dos ligantes ao rutênio. Os potenciais em $-1,026\text{ V}$ é referente a redução do dppz (SUN, et al., 2010). Enquanto que em $-1,247$ e $-1,626\text{ V}$ são associados às bipyridinas modificadas com antraceno e biotina, respectivamente (LO; LEE, 2004).

Os dados obtidos na voltametria cíclica indicam fortemente a coordenação do ligante bpy-biot ao centro metálico devido ao adicional deslocamento do potencial redox. Relacionando os dados obtidos com os dados da espectroscopia de absorção eletrônica, pode-se observar que ocorreu uma mudança no valor do comprimento de onda de absorção do precursor, sendo deslocado para o azul, após a coordenação do ligante bpy-biot. Na tabela 7 tem-se os potenciais referentes aos processos redox do centro metálico e dos ligantes e alguns complexos para fins comparativos.

Tabela 7 – Voltametria cíclica do Ru-dppzCl₂, **Ru-biot** e Ru-anth obtidas em meio de acetonitrila contendo PTBA (eletrólito de suporte), utilizando eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag|AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

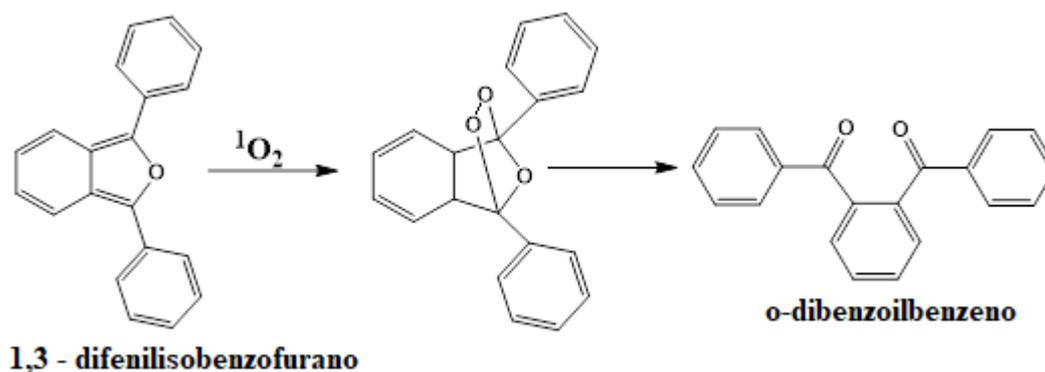
Complexo	Ru(III/II)	Redução dos ligantes E _{red}			
Ru-dppzCl₂	+1,091	-0,881	-	-	-1,81
Ru-biot	+1,311	-1,012	-1,302	-1,64	-1,88
[Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺^a	+1,51	-0,73	-1,15	-1,39	
Ru-anth^b	+1,30/ +1,33	-0,93	-	-1,54	-1,74

Fonte: elaborada pelo autor. ^a DELANEY, et al., 2002. ^b ABREU, et al., 2017.

4.2 Estudo de geração de oxigênio singlete

A geração de oxigênio singlete (¹O₂) foi monitorada, por meio da técnica de fluorescência, utilizando como sonda para detectar a presença dessa espécie o composto 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF). O consumo de DPBF pode ser quantificado pela diminuição da intensidade de sua banda de fluorescência no máximo de emissão, devido a ocorrência da reação de oxidação promovida pelo ¹O₂. Esse consumo pode ser expresso como uma função do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) (DING, et al., 2006; JIANG, et al., 2016). A Figura 21 ilustra a equação química que representa a reação de fotodegradação do DPBF promovida pelo oxigênio singlete.

Figura 21 - Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete.

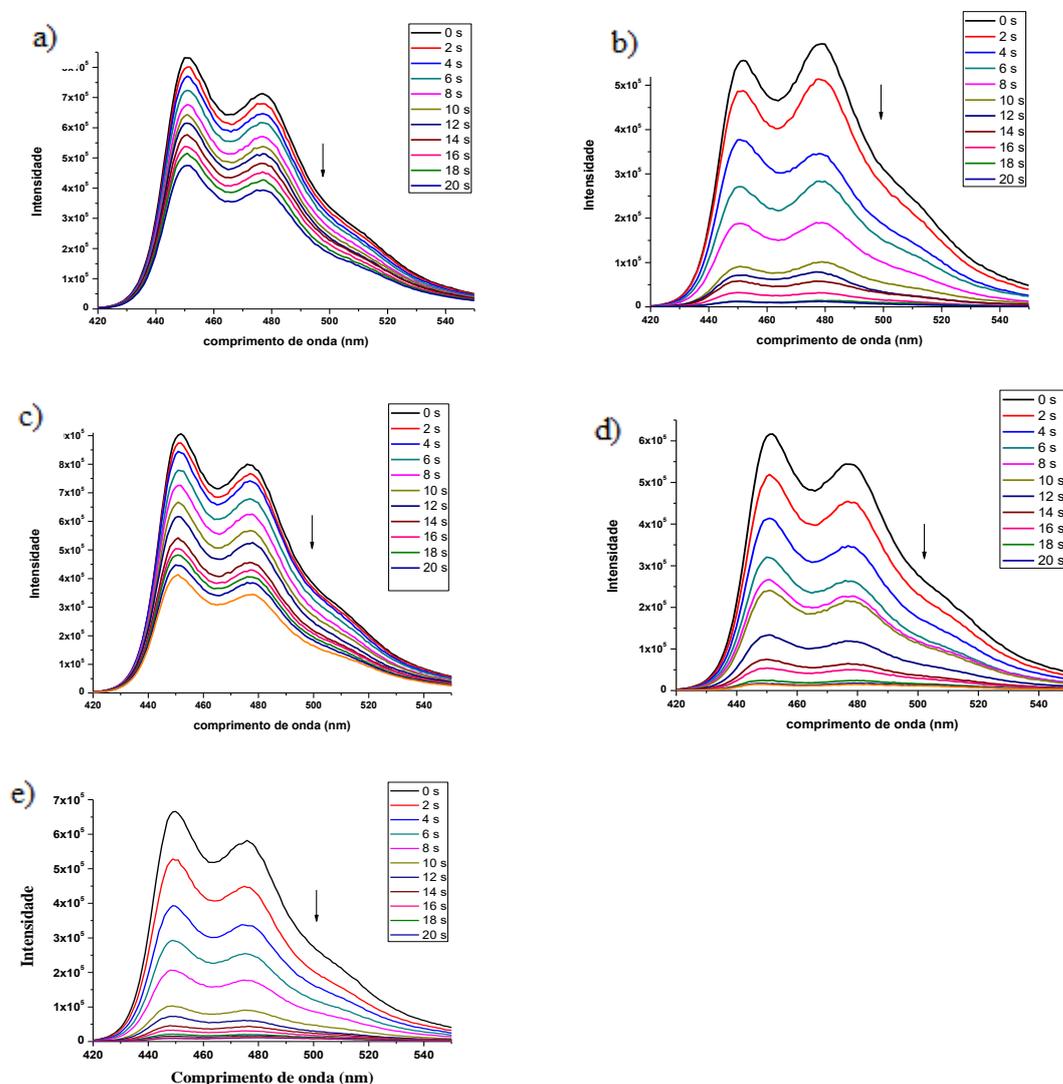


Fonte: elaborada pelo autor.

Os espectros de emissão da fotodegradação do DPBF na presença e na ausência dos complexos Ru-dppzCl₂, **Ru-biot** e Ru-anth, irradiado com LED azul são apresentados na Figura

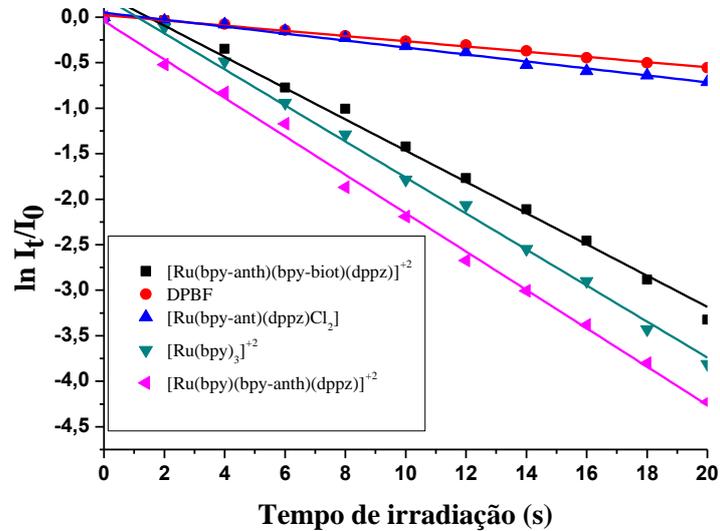
22, enquanto os espectros sob irradiação de luz verde e vermelho encontram-se no Apêndice D e E. Os valores de Φ_{Δ} foram calculados usando os dados da regressão linear das Figuras 23, 24 e 25 juntamente com a Equação 2. Os compostos $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, rosa bengala e azul de metileno foram utilizados como padrões de referência para as medidas de rendimento de geração de oxigênio singlete nas condições empregadas, ou seja sob irradiação com luz azul ($\Phi_{\Delta}=0,84$), luz verde ($\Phi_{\Delta}=0,68$) e luz vermelha ($\Phi_{\Delta}=0,52$) (TANIELIAN, et al., 1996; DEROSA; CRUTCHLEY, 2002). Para fins comparativos, utilizou-se ainda o complexo precursor Ru-dppzCl₂ e Ru-anth para verificar a influência do ligante bpy-biot.

Figura 22 - Espectros de emissão do DPBF em função do tempo de irradiação na ausência(a) e presença(b) de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$; (c) Ru-dppzCl₂ e (d) **Ru-biot**, em concentração de 16 μM em etanol. Fendas: 0,3 mm, $\lambda_{\text{exc}}=410$ nm. Tempo de irradiação = 2 segundos. Amostra irradiada ex situ usando LED azul.



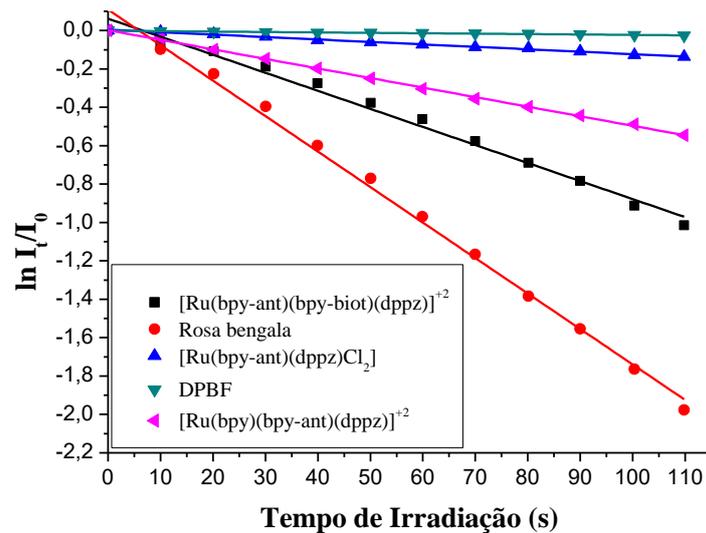
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 23 - Curvas cinéticas do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 24 - Curvas cinéticas do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED verde).



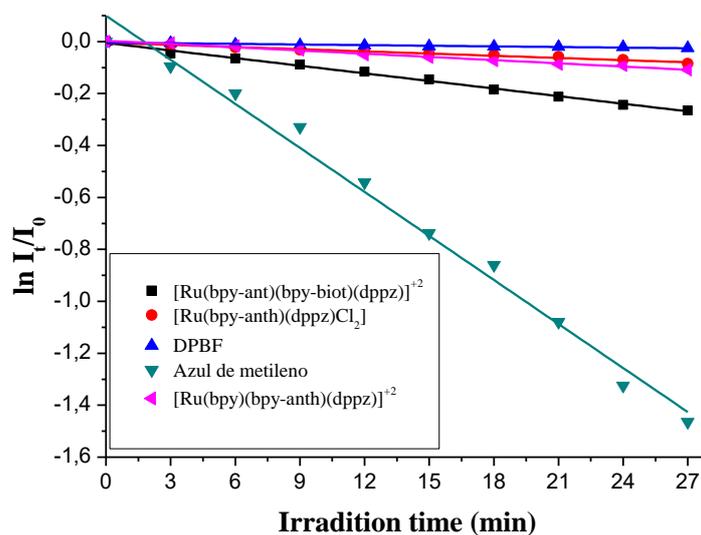
Fonte: elaborada pelo autor.

Baseando-se nos valores de Φ_{Δ} (Tabela 8), percebe-se que o valor para o **Ru-biot** é expressivo frente ao precursor ($\Phi_{\Delta}= 0,05$) e diminuiu ligeiramente de 0,96 (**Ru-anth**) para 0,75 (**Ru-biot**) quando irradiado com LED azul. Como mencionado anteriormente o ³MLCT para o **Ru-biot** está localizado na bpy-biot, enquanto para o complexo Ru-anth no fragmento ³anth,

que transfere energia facilmente para o oxigênio molecular, expressando maior valor de Φ_{Δ} . Essa diferença pode ser a principal razão para a geração mais baixa de oxigênio singlete do **Ru-biot**, sendo que a energia não pode ser transferida com eficiência para o oxigênio. Desta maneira, sugere-se que o estado $^3\text{MLCT}$ do complexo **Ru-biot** pode estar atuando como canal de transferência de energia (intra e intermolecular) para excitar o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) em função das proximidades de seus níveis energéticos (PASZKO, et al., 2010; DING, et al., 2006). Quando irradiado com luz verde o **Ru-biot** apresentou $\Phi_{\Delta}=0,51$ e o Ru-anth $\Phi_{\Delta}=0,19$, resultado bastante promissor para estudos futuros.

Testes de fotodegradação do DPBF irradiado com LED vermelho foram também realizados, usando como padrão de referência o azul de metileno ($\Phi_{\Delta} = 0,52$) (Apêndice D). A Figura 25 ilustra a cinética do consumo de DPBF.

Figura 25 - Curva cinética do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED vermelho).



Fonte: elaborada pelo autor.

Observa-se um menor Φ_{Δ} para o complexo **Ru-biot** ($\Phi_{\Delta}=0,19$), resultado esse que se mostra consistente com o esperado devido a menor energia da luz vermelha. Entretanto, a baixa geração de $^1\text{O}_2$ com luz vermelha para o complexo Ru-anth ($\Phi_{\Delta}=0,031$) indica que o estado $^3\text{MLCT}$ do complexo **Ru-biot**, localizado na bpy-biot, está atuando como canal de transferência de energia para excitar o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). Apesar do valor menor, quando comparado com a luz azul e verde, é considerada uma produção moderada, abrindo oportunidades futuras.

Tabela 8 – Valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) sob irradiação de luz azul e vermelha. ($\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$).

Composto	Φ_{Δ} (azul)	Φ_{Δ} (vermelha)	Φ_{Δ} (verde)
Ru-anth	0,96	0,031	0,20
Ru-biot	0,75	0,19	0,51
Ru-dppzCl ₂	-	-	-

Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Estudo de interação com DNA

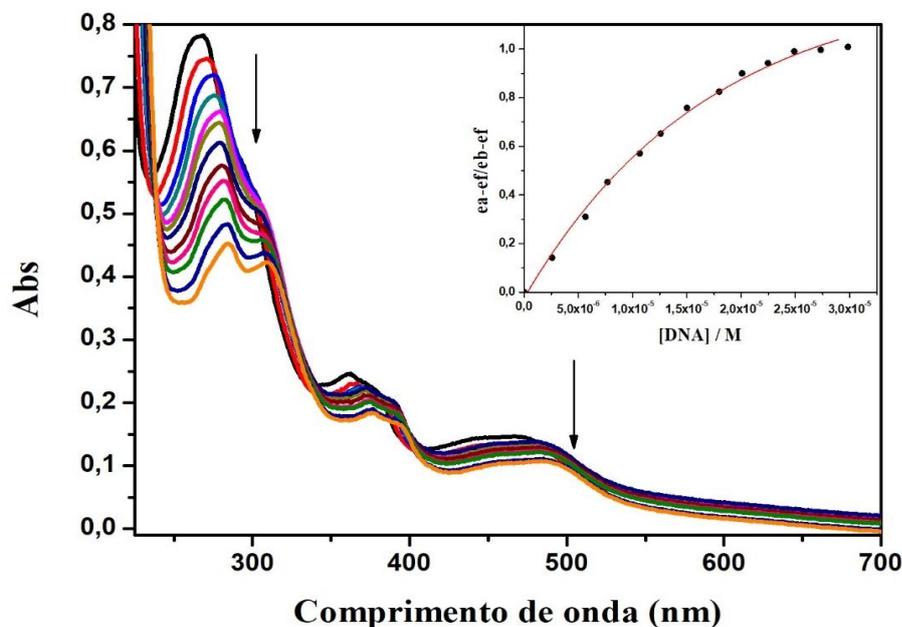
4.3.1 Constante de ligação (K_b) DNA-complexo medida por espectroscopia de absorção eletrônica

A magnitude da interação entre o complexo metálico com o DNA de timo de bezerro (*calf thymus*, CT DNA) foi determinada por titulação espectrofotométrica (MAHADEVAN; PALANIANDAVAR, 1997). As quantidades de DNA foram adicionadas sequencialmente e as mudanças provocadas nos perfis espectrais estão ilustrados na Figura 26.

Com o aumento da concentração de DNA, observa-se que ocorre um efeito de hipocromismo de 18% das bandas intraligantes (256, 268, 368 nm) e de transferência de carga (437 e 468 nm), além disso há um deslocamento batocrômico de 15 nm nestas bandas. Estas observações são indicativas de interações entre o DNA e o complexo metálico (LIU, et al., 2002; NIKOLIS, et al., 2003).

A fim de obter a constante intrínseca de ligação (K_b) utilizou-se a equação 3 para o tratamento dos dados. O valor calculado para K_b foi de $6,28 (\pm 0,4) \times 10^6$, o que corrobora com valores de K_b encontrados na literatura para intercaladores similares (Tabela 9). Na Tabela 9 tem-se diferentes complexos citados na literatura com características intercalativas e suas respectivas constantes de ligação. O valor de K_b do complexo sintetizado neste trabalho (Ru- biot) mostrou-se bastante similar ao seu análogo sem biotina conjugada, indicando que a incorporação de biotina não provocou perturbações expressivas, e manteve sua excelente capacidade de interagir com DNA.

Figura 26 – Espectro de absorção eletrônica do complexo **Ru-biot** na ausência de CT-DNA (—) e na presença de quantidades diferentes de CT-DNA em tampão 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5. Inset: gráfico de $\epsilon_a - \epsilon_f / \epsilon_b - \epsilon_f$ vs [DNA].



Fonte: elaborada pelo autor.

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

Complexos	K_b
Ru-biot	$6,28 (\pm 0,4) \times 10^6$
Ru-anth^a	$6,04 (\pm 0,2) \times 10^6$
[Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺ ^b	$3,20 \times 10^6$
[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ ^c	$2,10 \times 10^6$
[Ru(phen)(dianq)₂]²⁺ ^d	$3,30 \times 10^4$

Fonte: elaborada pelo autor. ^a ABREU, et al., 2017. ^b BURYA, et al., 2011. ^c CHEN, e al., 2009. ^d AMBROISE; MAIYA, 2000.

4.3.2 Constante de associação (K_b) DNA-Complexo metálico via espectroscopia de emissão

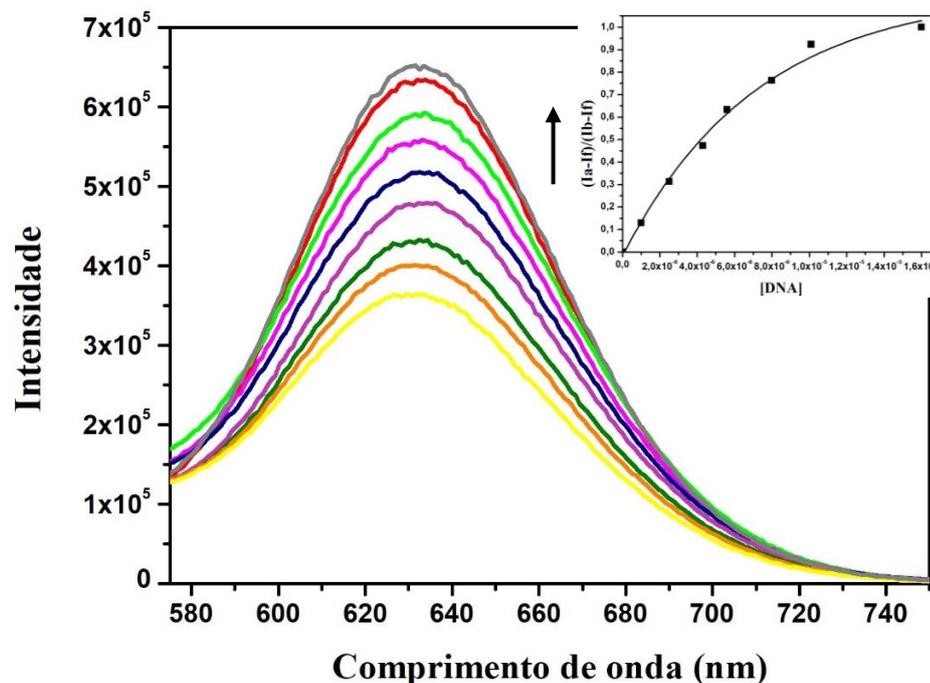
A interação do complexo **Ru-biot** com o DNA foi também investigada pela técnica de luminescência. Após adição do CT-DNA na solução, observou-se um aumento gradativo da banda de emissão do complexo (Figura 27).

O aumento da intensidade de emissão do complexo com o aumento da concentração de DNA sugere a interação complexo-DNA. Esta interação ocorre provavelmente no sítio hidrofóbico do DNA, protegendo o complexo do meio aquoso, incorporando-o entre as bases

nitrogenadas da hélice do DNA (HUANG, et al., 2011). Assim, a estrutura do complexo fica também mais rígida e há menor perda de energia por rotas de transferência de energia não radiativa.

O valor de K_b foi calculado a partir da equação 4, resultando em um K_b de $5,8 \times 10^6$. Este valor é comparável com o previamente medido por espectroscopia de absorção eletrônica ($6,28 \times 10^6$), reforçando a característica intercalativa do complexo metálico.

Figura 27 - Espectro de emissão do complexo **Ru-biot** na ausência de CT DNA (—) e na presença de quantidades crescentes de CT DNA em tampão Tris-HCl pH 7,5. Inset: gráfico de $(I_a - I_f)/(I_b - I_f)$ vs [DNA].



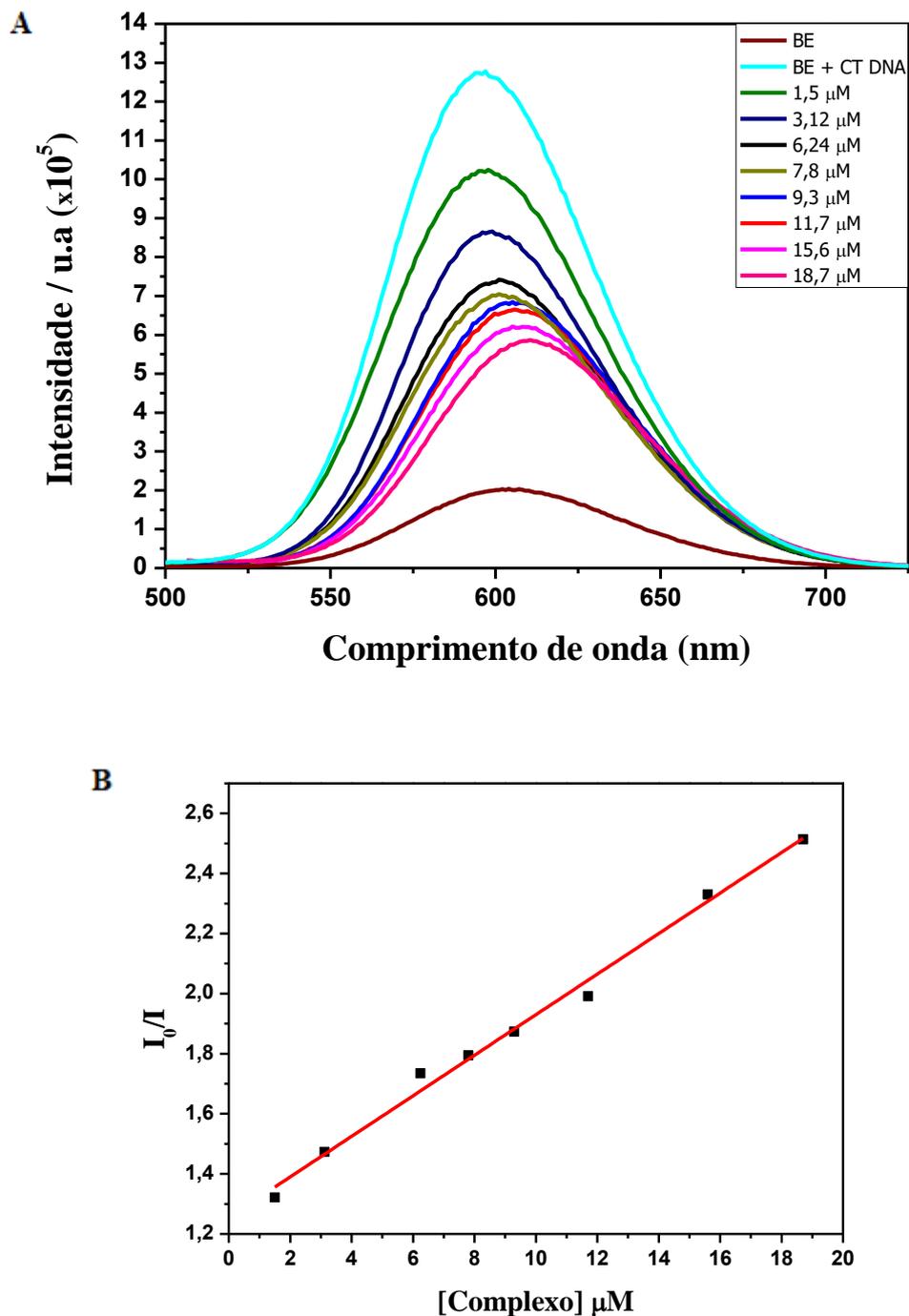
Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.3 *Competição com Brometo de Etídio*

O brometo de etídio (BE) (Atenção: reagente mutagênico) é conhecido por interagir com o DNA por intercalação, estabelecendo-se entre os pares de bases nitrogenadas (TUIE, et al., 1997). Este composto apresenta baixa fluorescência em solução aquosa, porém, quando intercalado ao DNA, ocorre um forte aumento de fluorescência. BE tem sido empregado em ensaios de competição frente a outros agentes intercalantes (MEZLER-NOLTE; SCHATZSCHNEIDER, 2009). A fim de confirmar a natureza intercalante do complexo **Ru-biot** foi realizado um estudo de competição na presença do brometo de etídio (Figura 28). O

deslocamento e intensificação da banda do aduto BE-CT DNA foi monitorado durante titulação com o complexo **Ru-biot**.

Figura 28 - Espectro de fluorescência de BE ($\lambda_{exc} = 480$ nm) na presença de CT DNA a diferentes concentrações de complexo metálico (0-18,7 μ M) em tampão Tris-HCl pH 7,5. [BE] = 1,5 μ M, [DNA]= 10 μ M (A). Gráfico I_0/I x [complexo] com $R^2 = 0,9793$ (B).



Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com os espectros de fluorescência da Figura 28, observou-se um aumento consistente de intensidade bem como um deslocamento do máximo da banda emissão de 600 nm para 596 nm, quando CT DNA é adicionado à solução de BE, confirmando a formação do aduto DNA-BE. Após a adição do complexo metálico à solução, observa-se uma supressão da banda de emissão, sugerindo que ocorra uma competição pelos sítios do biopolímero (SIRAJUDDIN; BADSHAH, 2013). Todavia, observa-se que não há uma diminuição total da banda de emissão mesmo após adição de 18,7 μ M do complexo. Esse comportamento pode ser justificado, uma vez que o complexo metálico ligado ao DNA apresenta luminescência em comprimento de onda máximo próximo ao de emissão do BE. Sendo assim, a luminescência do complexo contribui para a emissão total dos espectros (BURYA, e al., 2011).

Os resultados da titulação espectrofluorimétrica foram posteriormente analisados e calculado a constante de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), empregando-se a equação 5. O valor de K_{SV} encontrado foi de $6,5 \times 10^4$, resultado próximo ao encontrado na literatura para compostos com diferentes centros metálicos considerados com boa capacidade intercalativa, como Mn, Cu, Zn na ordem de 10^3 e Ru na ordem de 10^4 (SIRAJUDDIN; BADSHAH, 2013; LÁZIC, et al., 2016). Todavia, convém mencionar que esse valor não deve ser interpretado como exato, uma vez que não é possível eliminar completamente a contribuição de emissão que o complexo metálico confere nessas medidas.

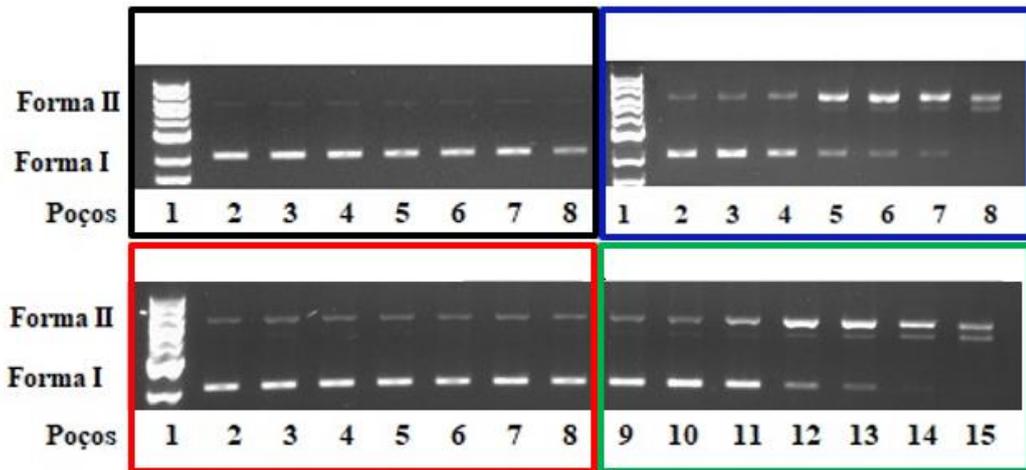
A constante aparente de ligação também foi calculada pela equação 6 e o valor de K_{app} encontrado foi de $1,28 \times 10^6$. Este valor indica que o complexo compete pelos sítios de ligação do DNA deslocando o BE. Assim, os resultados obtidos para o **Ru-biot** indica ser um forte agente intercalante de DNA e pode funcionar *in vivo* através da interação com esta biomolécula (MATHUR; TABASSUM, 2008).

4.3.4 *Ensaio de dano ao DNA por eletroforese em gel de agarose*

Realizou-se estudos de eletroforese em gel de agarose do DNA pBR322 no escuro e sob irradiação de luz (LED azul, $\lambda_{irrad} = 463$ nm, LED verde, $\lambda_{irrad} = 520$ nm e LED vermelho, $\lambda_{irrad} = 693$ nm), a fim de verificar a fotodegradação do DNA plasmidial através da ligação complexo-DNA e geração de espécies radicalares. O DNA plasmidial pBR322 pode se apresentar de três formas diferentes: forma I, forma II e forma III. A forma I apresenta-se tensionada sendo chamada de superenovelada, quando sofre quebra em umas das fitas é chamada de circular aberta ou relaxada (forma II), estando clivada em um único ponto, quando ocorre a quebra nas duas fitas simples, chama-se fita linear (forma III) (NAVARRO, et al, 2003;

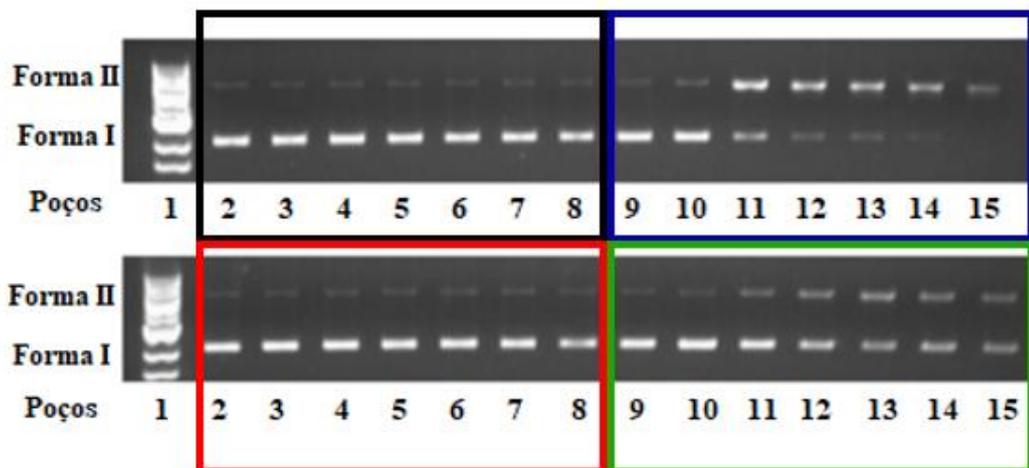
MEZLER-NOLTE; SCHATZSCHNEIDER, 2009). O controle utilizado sem complexo mostra o plasmídeo pBR322 superenovelado não danificado (Figura 29, forma I, linha 2).

Figura 29 - Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 μM) na presença do complexo **Ru-biot** em diferentes concentrações no escuro e após 1h de irradiação em LED azul, vermelho e verde. Poços 1: DNA marcador (ladder). Poço 2 e 9: apenas DNA pBR322. Poços 3-8 e 10-15: complexo + DNA pBR322 nas seguintes concentrações: 0,3, 3,0, 7,0, 10, 15 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 30 - Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 μM) na presença dos complexos Ru-anth em diferentes concentrações no escuro e após 1h de irradiação em LED azul, vermelho e verde. Poços 1: DNA marcador (ladder). Poço 2 e 9: apenas DNA pBR322. Poços 3-8 e 10-15: complexo + DNA pBR322 nas seguintes concentrações: 0,3, 3,0, 7,0, 10, 15 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: elaborada pelo autor.

As figuras 29 e 30 mostram as respostas da clivagem do DNA promovida por **Ru-biot** e Ru-anth no escuro e sob irradiação. Os complexos foram incubados no escuro e não mostraram evidência de clivagem do DNA. No entanto, o complexo **Ru-biot** mostrou fotoclivagem do DNA eficiente sob irradiação com luz azul. A forma II (forma clivada em fita simples) foi observada claramente. O complexo também mostrou atividade de clivagem do DNA aprimorada sob irradiação de luz verde em comparação ao complexo Ru-anth na presença de DNA. É observado uma formação moderada de plasmídeo linearizado (forma III) na presença do complexo **Ru-biot** a 15 μM , mesmo com luz verde, enquanto que o DNA circular (forma II) é visto a partir de 3 μM . Quando irradiado com luz vermelha o complexo não causou clivagem, mesmo com o aumento da concentração, apesar da moderada produção de oxigênio singlete. Assim, podemos confirmar que o complexo **Ru-biot** ocasiona uma maior clivagem sob irradiação quando comparado ao Ru-anth, sendo visto com o aumento das concentrações. Esses dados suportam a expectativa que o ligante biotina têm também papel importante no dano ao DNA.

Considerando que o máximo da transição MLCT do complexo **Ru-biot** (Figura 13) seja observada em 468 nm, o fato da fotoclivagem ser mais eficiente sob irradiação a 463 nm e 520 nm em comparação a 640 nm sugere que para esse sistema, o mecanismo de clivagem do DNA envolve a geração de oxigênio singlete (Tabela 8). Além disso, a fotoativação eficiente do complexo poderia ser explicada pela extensão da interação complexo - DNA em que o valor encontrado da constante foi na ordem de 10^6 (Figura 26).

4.4 Lipofilicidade (LogP)

A lipofilicidade de um composto tem sido quantificada como o logaritmo de um coeficiente de partição de uma molécula entre uma fase orgânica e uma fase aquosa (octanol e água). Moléculas lipofílicas possuem logP positivo e moléculas hidrofílicas possuem valores negativos.

É significativa a importância da lipofilicidade no estudo das interações de complexos de Ru(II) com células, pois tem grande influência na distribuição do complexo dentro das células, a mesma varia de acordo com a hidrofobicidade dos ligantes (GILL; THOMAS, 2012). Com o aumento da lipofilicidade do complexo poderá ocorrer um aumento da sua absorção pelas células, como também um aumento da probabilidade de sua ligação com outros alvos (sítios hidrofóbicos de proteínas) (LEESON, SPRINGTHORPE, 2007; SVENSSON, et al., 2010).

A quantificação dos compostos na fase aquosa foi realizada através de espectroscopia na região do UV-vis utilizando a equação 7. A concentração do composto na fase orgânica foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a final na fase aquosa (RAMA, et al., 2006). Para a quantificação dos complexos na fase aquosa, foi traçada uma curva de calibração (Absorbância x [complexo]).

A Tabela 10 nos mostra a diferença de log P dos complexos **Ru-biot**, Ru-anth e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$. Percebe-se que a medida em que há a funcionalização das bipyridinas, o logP migra de valores negativos para valores positivos, ilustrando uma evidente redução do perfil de hidrossolubilidade.

Os valores de logP estão geralmente associados a atividade biológica, indicando que há uma boa lipofilicidade quando os valores estão entre 1 – 3, sendo capaz de expressar condições farmacodinâmicas e farmacocinéticas ideais. Nesta faixa há uma melhor taxa de absorção e biodisponibilidade no organismo (BARREIRO, et al., 2015). A avaliação da captação celular por medicamentos tornou-se uma questão essencial durante o desenvolvimento de fármacos. Há casos interessantes da ausência de atividade biológica associada à fraca captação celular (ZHANG; SADLER, 2017; BUTLER; SADLER, 2013).

Uma vez administrado o complexo metálico, sua biodistribuição é fundamental para a eficácia e minimização dos efeitos colaterais, assim, é preciso fornecer ao complexo melhor acessibilidade celular, sendo necessário proporcionar um equilíbrio entre lipofilicidade e hidrofiliabilidade, buscando maior tempo de permanência no corpo, ainda que não excessivo.

O complexo estudado apresentou logP maior (+1,32) do que o Ru-anth (+0,808), apresentando preferência a estar associada à fase lipídica (maior afinidade com octanol) e provavelmente permeará pelas membranas biológicas espontaneamente. Esses valores ainda são muito melhores do que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$. Para alcançar uma melhor permeabilidade, é preciso ter um valor moderado (1-3) de logP, assim pode-se notar que este complexo provavelmente apresentará uma promissora taxa de permeabilidade nas biomembranas hidrofóbicas (POYNTON, et al., 2017).

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

Composto	Log P
Ru-biot	1,32
Ru-anth	0,808
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+a}$	-2,50

Fonte: elaborada pelo autor. ^a POYNTON, et al., 2017.

4.5 Ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e atividade bactericida (MBC) em bactérias Gram positivas e negativas.

Com o objetivo de investigar se o complexo sintetizado apresentaria atividade biológica frente a agentes patogênicos, como bactérias Gram positivas e negativas, foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) com as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* com e sem irradiação de luz azul, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 10. Essas medidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) (Dr. Prof. Edson Holanda).

Os resultados mostraram que nenhum dos complexos investigados, precursor ou o complexo modificado com biotina, foram capazes de apresentar atividade antibacteriana frente às cepas Gram-negativas empregadas, mesmo com irradiação de luz azul por 1h. Para as bactérias gram-positivas, o *S. epidermidis* quando tratado com complexo **Ru-biot** não apresentou resposta no escuro e com luz azul. Entretanto, o complexo **Ru-biot** mostrou-se ativo frente o *S. aureus* após irradiação com luz azul (MIC = 15 μ M), indicando uma ação seletiva a luz (Tabela 11). A conjugação com biotina reduziu a MIC e a MBC em 2 vezes, ao mesmo tempo que melhorou a seletividade da luz em pelo menos 6 vezes.

Assim, o complexo **Ru-biot** comparado ao Ru-anth apresentou menor atividade biológica, mas foi mais eficiente do que seu precursor (Ru-dppzCl₂) quando irradiado com luz azul, apenas para a bactéria *S. aureus*, sugerindo que o ligante funcionalizado (bpy-biot) confere uma atividade antibacteriana específica com luz. Esse comportamento é bastante desejado, cujo objetivo em fototerapia é conferir atividade somente com o estímulo luminoso, o que demonstra grande potencial para esse complexo sintetizado. Adicionalmente, convém mencionar que devido a *S. aureus* possuir enzimas dependentes de biotina, em que é usada como repressor/regulador de transcrição, ainda assim o efeito antibacteriano só foi observado sob ação da luz. Assim, percebe-se que o **Ru-biot** demonstra citotoxicidade seletiva a *S. aureus* (SOARES DA COSTA, et al., 2012).

A estratégia de biotinação foi empregada anteriormente para promover a captação de grandes peptídeos por *Escherichia coli* (e outras bactérias Gram-negativas) e também trabalhou para melhorar a atividade de alguns complexos metálicos (WALKER; ALTMAN, 2005; SAUVAGEOT, et al., 2017). No entanto, não funcionou bem para o complexo **Ru-biot**. Isso pode ser devido a uma captação bacteriana mais seletiva e restritiva devido a características estruturais adicionais. A razão molecular para esse comportamento ainda não está clara, no

entanto, estimula novas investigações também com outras bactérias e parasitas patogênicos distintos.

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [valores em $\mu\text{g/mL}$ (μM)].

Complexos	LED Azul Irradiação		Gram-Positiva		Gram-Negativa	
			<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>E. coli</i> ATCC 11303
Ru-biot	SIM	MIC ^a *	15,6 (13,75)	ND	ND	ND
		MBC ^b	62,5 (55,1)	ND	ND	ND
	NÃO	MIC	ND	ND	ND	ND
		MBC	ND	ND	ND	ND
Ru-dppzCl ₂	SIM	MIC	62,5 (84,15)	ND	ND	ND
		MBC	125 (168,31)	ND	ND	ND
	NÃO	MIC	125 (168,31)	ND	ND	ND
		MBC	500 (673,26)	ND	ND	ND
Ru-anth	SIM	MIC	6,4 (7,75)	25,6 (31,03)	ND	ND
		MBC	6,4 (7,75)	25,6 (31,03)	ND	ND
	NÃO	MIC	6,4 (7,75)	102 (123,68)	ND	ND
		MBC	12,8 (15,51)	102 (123,68)	ND	ND

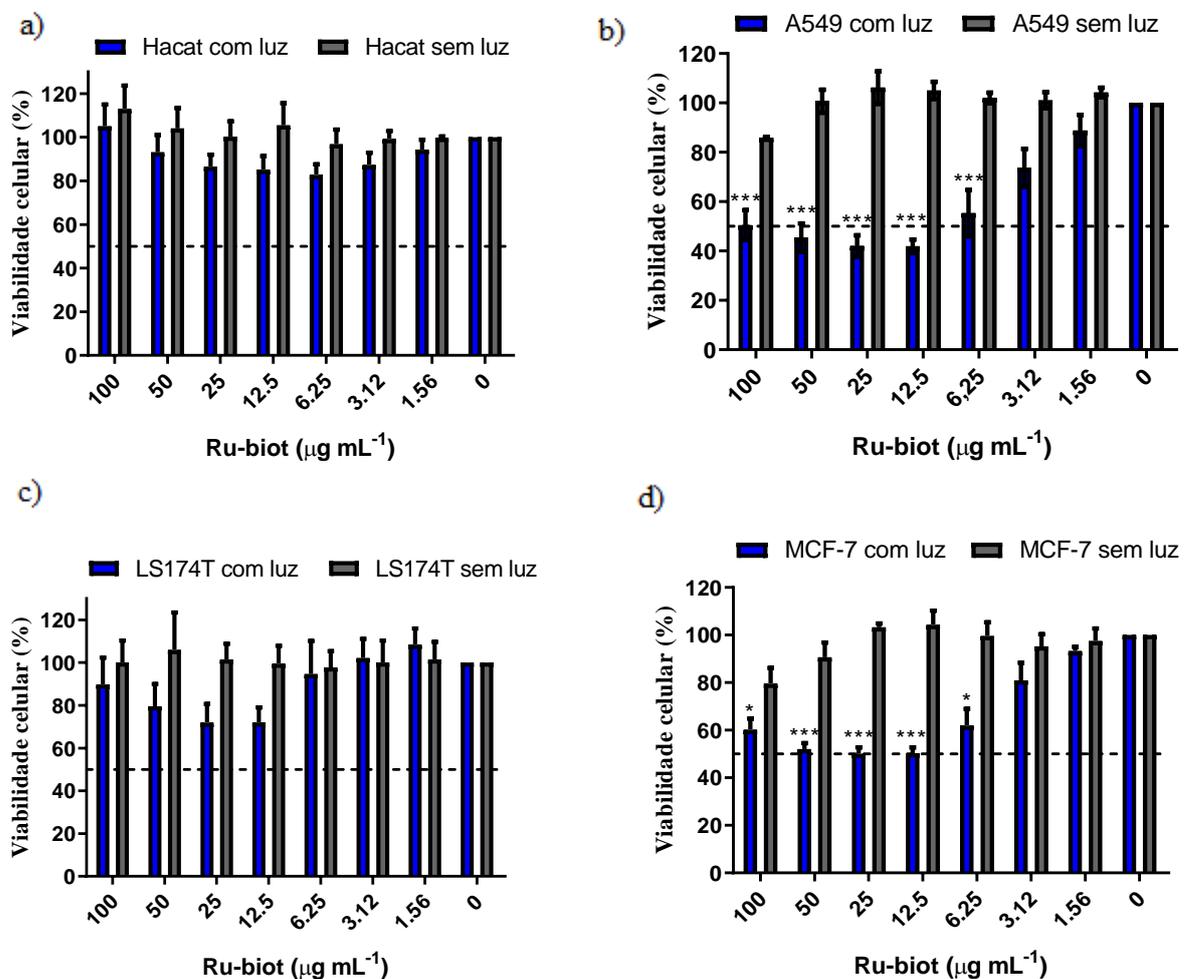
^aConcentração inibitória mínima. ^bConcentração bactericida mínima. *MIC e MBC são expressas em $\mu\text{g/mL}$ (μM). (ND) Não determinado.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.6 Ensaios em células cancerígenas

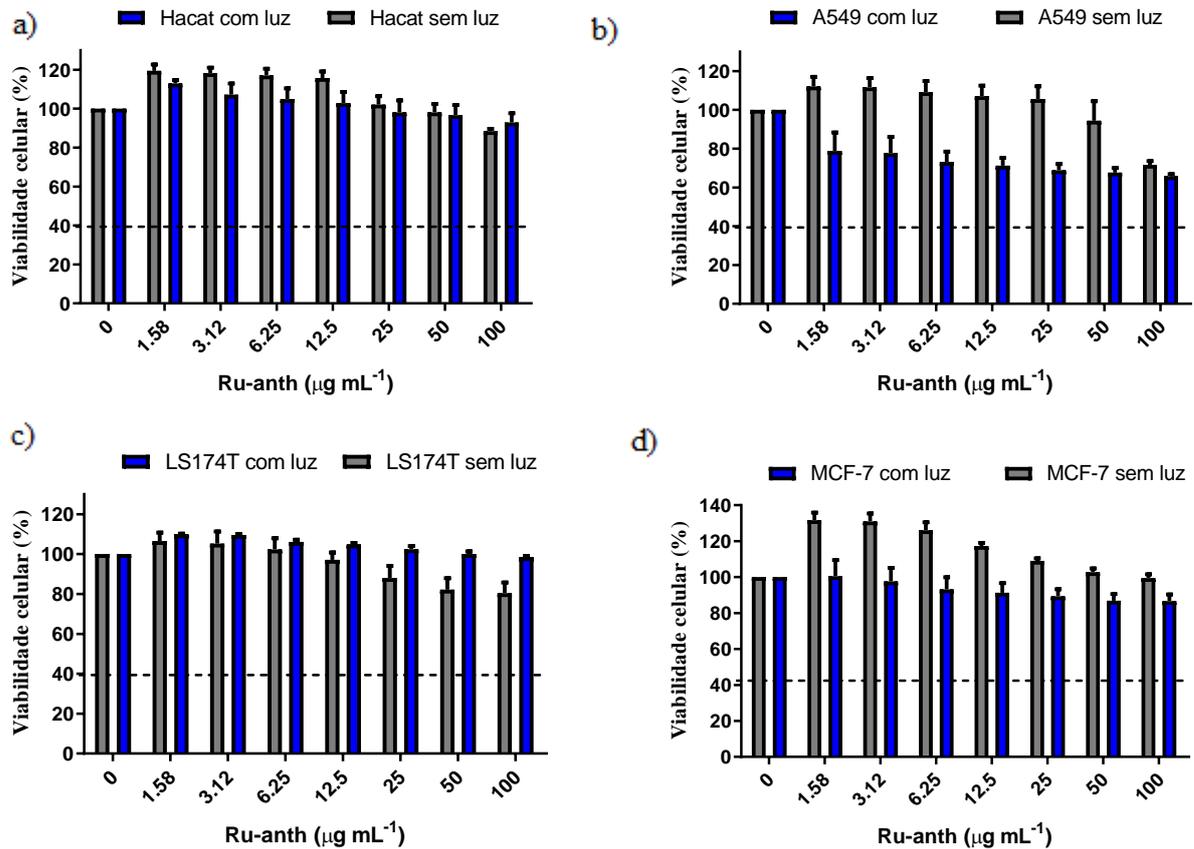
Foram realizados dois ensaios: (a) sem luz (após a adição do composto as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C) e (b) com luz (após a adição do composto as placas foram submetidas à ação de led azul durante uma hora e posteriormente incubadas por 48 horas), a fim de avaliar a viabilidade celular. Foram testados em células saudáveis (Hacat) e em células cancerígenas da mama (MCF-7), pulmão (A549) e colorretal (LS174T) na presença dos complexos: **Ru-biot** e Ru-anth, em diferentes concentrações. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 31 e 32. Essas medidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) (Dr. Prof. Edson Holanda).

Figura 31 - Efeito do **Ru-biot** na viabilidade celular. **A:** Hacat (queratinócitos humanos); **B:** A549 (carcinoma de pulmão); **C:** LS174T (adenocarcinoma colorretal); **D:** MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Complexo de Rutênio em $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 32 - Efeito do Ru-anth na viabilidade celular. A: HacaT (queratinócitos humanos); B: A549 (carcinoma de pulmão); C: LS174T (adenocarcinoma colorretal); D: MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Complexo de Rutênio em $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: elaborada pelo autor.

Para o complexo Ru-anth não apresentou toxicidade para HacaT e não mostrou atividade antiproliferativa promissora sem ou com irradiação nessas linhagens (Figura 32).

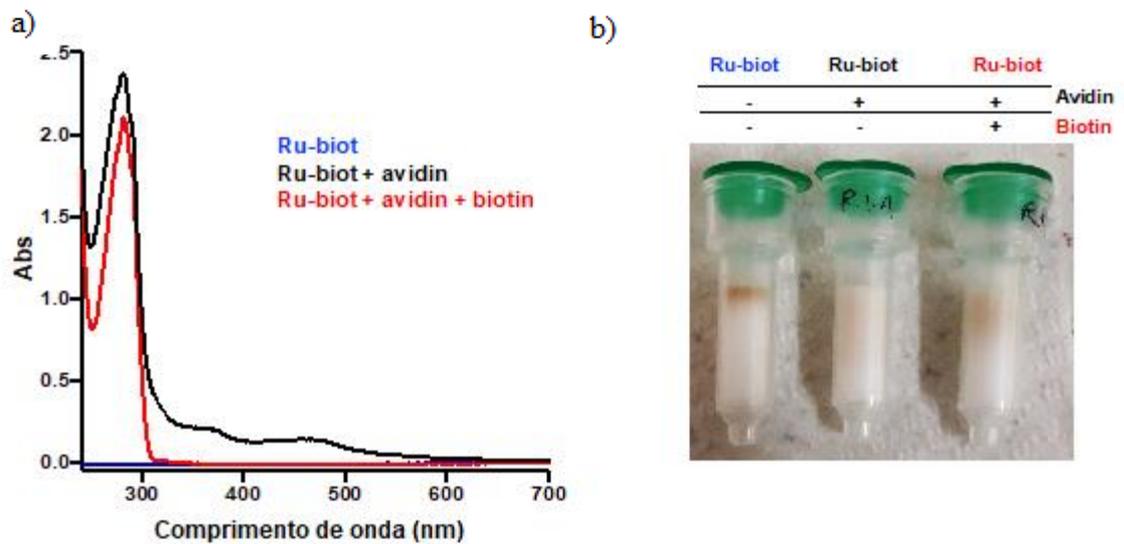
Por outro lado, o composto **Ru-biot** apresentou inibição de crescimento celular frente as linhagens de pulmão (A549) e mama (MCF-7), particularmente quando tratados e expostos a luz o efeito do complexo é potencializado e apresenta inibição próxima a 50% (Figura 31), mas para a linhagem de colorretal (LS174T) não se mostrou suficientemente ativo, indicando especificidade na sua ação citotóxica. O resultado é esperado, devido a maior presença de receptores de biotina para essas linhagens de células cancerígenas (KALLUS; UHLIK, 2018; MUHAMMAD, et al., 2017; MAITI; PAIRA, 2018). Nessas células, a irradiação com luz azul promoveu efeito citotóxico significativo, que não foi perceptível no escuro mesmo em concentrações elevadas. Para células normais da pele e LS174T (cólon) não apresentou citotoxicidade no escuro ou mesmo com irradiação de luz azul. Tais resultados sugerem, portanto, que o complexo sintetizado apresenta potencial antineoplásico seletivo, podendo avançar para testes que permitam elucidar os mecanismos envolvidos em sua ação.

4.7 Ensaios com Avidina

Conforme descrito anteriormente, a biotina exibe uma afinidade muito forte com a avidina ($K_d \sim 10^{-15}$), o que torna essa interação muito eficiente. Com o objetivo de validar que o Ru-biot pode, de fato, se ligar à avidina, foi realizado medições usando duas estratégias: exclusão de gel e luminescência. Na primeira tentativa de mostrar que Ru-biot se liga seletivamente à avidina, empregou-se uma coluna de exclusão de gel muito eficiente (micro bio-spin® 6), feita de poliacrilamida com tamanho de exclusão acima de 6 kDa. Foram preparadas três amostras contendo A: Ru-biot, B: Ru-biot + avidina e C: Ru-biot + avidina + biotina (excesso de 10 vezes), as quais foram aplicadas nesta coluna, e a amostra excluída coletada e analisada por espectroscopia eletrônica (Figura 34). A amostra contendo Ru-biot e avidina foi a única em que as bandas do complexo de rutênio foram vistas, indicando que foi transportado após a ligação à avidina. A adição de biotina evitou que o complexo de rutênio se ligasse à avidina, conforme indicado pela falta de bandas correspondentes a esse complexo de metal, o que favorece a competição com os locais de ligação da biotina.

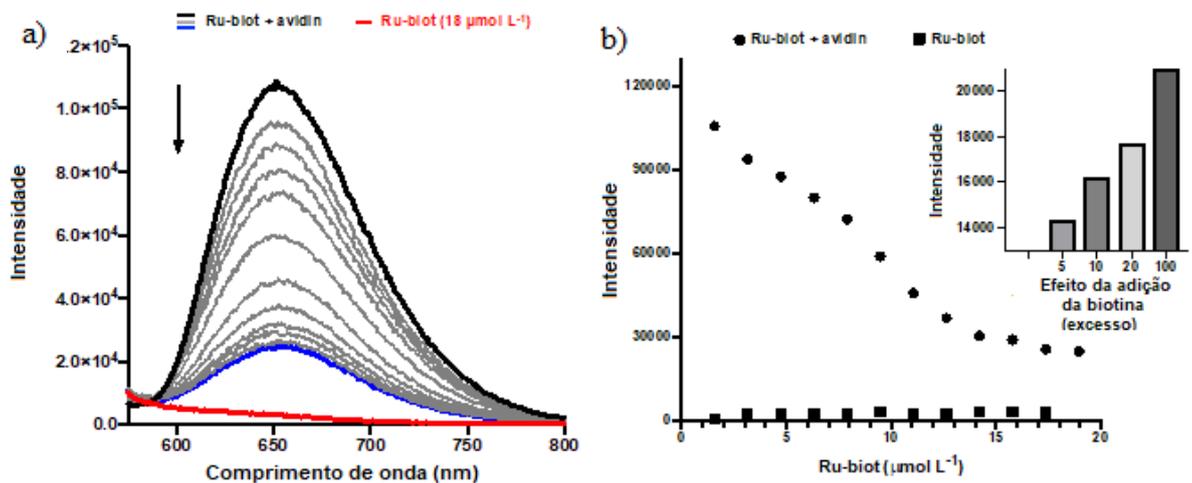
Além disso, uma titulação de Ru-biot em uma solução contendo avidina foi realizada e monitorada por luminescência. Curiosamente, a ligação de Ru-biot à avidina em baixa concentração exibiu um grande aumento na luminescência, que após a saturação dos locais de ligação, há um processo de extinção adicional até a saturação (Figura 35). Uma vez que a luminescência não mudou, biotina livre adicional foi adicionada causando um aumento dependente da dose na luminescência, consistente com uma competição para os locais de ligação da avidina (inserção da Figura 35B). Esses estudos sustentaram que Ru-biot pode se ligar de forma bastante eficiente à avidina, sugerindo seu papel nos efeitos biológicos observados em células cancerosas específicas.

Figura 33 - Ligação à avidina medida usando coluna de exclusão de gel. A: Espectros eletrônicos das amostras excluídas após aplicadas em uma microcoluna Biospin 6, as amostras coletadas eram de uma mistura contendo apenas Ru-biot (aplicado como 100 μM) (Blue trace), Ru-biot (100 μM) com avidina (100 μM) (traço preto) e Ru-biot (100 μM) com avidina (100 μM) mais biotina (1 mM) (traço vermelho). B: Resina com a amostra incluída logo após a centrifugação, onde a cor observada indica a presença de Ru-biot.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 34 – Titulação de avidina usando Ru-biot. A: Perfil de luminescência durante a adição de Ru-biot em uma solução contendo avidina ($4 \mu\text{M}$), traço preto é o espectro de emissão de $1,6 \mu\text{M}$ de Ru-biot adicionado, enquanto os traços cinza são adições adicionais até o último ($19 \mu\text{M}$) (traço azul). O traço vermelho é o espectro de luminescência para Ru-biot ($18 \mu\text{M}$) sem avidina. B: conjuntos de dados, um para a titulação de Ru-biot em uma solução contendo avidina (círculos) e outro sem avidina (quadrados) monitorado por luminescência (a 656 nm). Insert: gráfico de barras das mudanças na luminescência após a adição de um excesso de biotina logo após a titulação da avidina com Ru-biot.



Fonte: elaborada pelo autor.

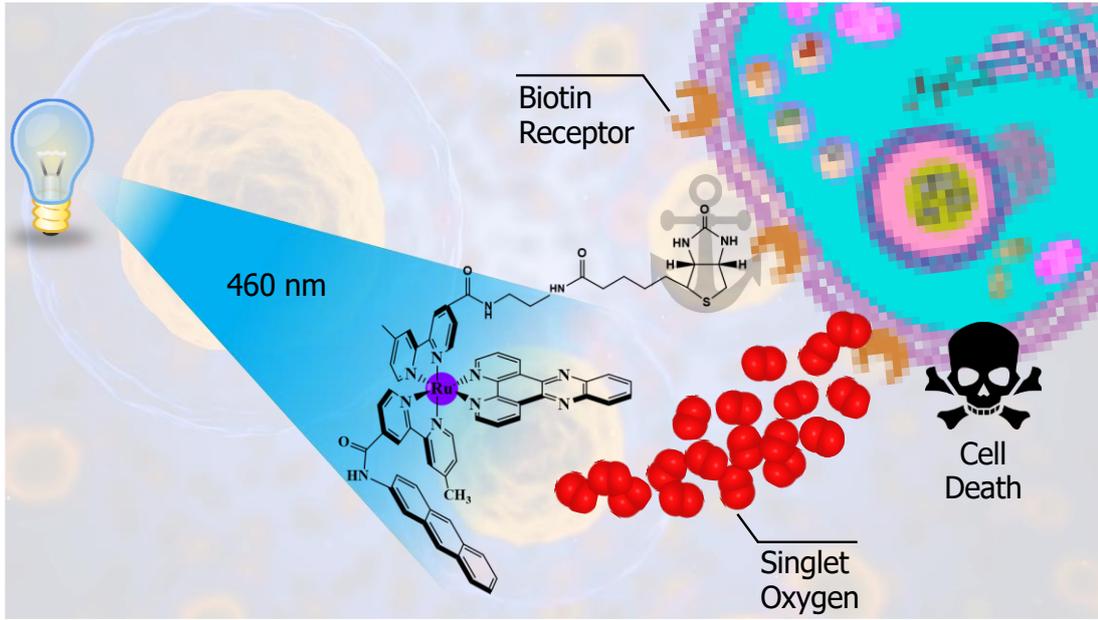
5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que o complexo em estudo foi sintetizado satisfatoriamente e sua caracterização realizada com sucesso através das técnicas: espectroscopia na região do UV-Vis, infravermelho, voltametria cíclica, RMN e análise elementar. O complexo **Ru-biot** gerou $^1\text{O}_2$ de maneira satisfatória com luz azul ($\Phi_{\Delta}=0,75$) e luz verde ($\Phi_{\Delta}=0,51$) quando comparada com os padrões $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($\Phi_{\Delta}=0,84$) e rosa bengala ($\Phi_{\Delta}=0,52$), já com luz vermelha apresentou ($\Phi_{\Delta}=0,19$) e seu padrão azul de metileno ($\Phi_{\Delta}=0,64$), indicando ser potencialmente aplicável em terapia fotodinâmica.

O valor da constante de associação ao DNA (K_b) para o complexo em estudo foi na ordem de 10^6 , valor superior a complexos similares citados na literatura, e equivalente à de moléculas intercalantes, o que demonstra excelente afinidade destes compostos com o DNA, abrindo a perspectiva de outros estudos de interação e degradação do DNA.

No estudo de competição com brometo de etídio foi confirmado a natureza intercalante do composto **Ru-biot**, através da diminuição da banda de emissão do BE, com valor de $K_{app} = 1,28 \times 10^6$ (afinidade aparente). Esse valor reforça o perfil de ligação aparente entre DNA-complexo por via intercalativa.

O complexo **Ru-biot** apresentou ainda $\log P = +1,32$, caracterizando-o como lipossolúvel, com promissor perfil para permear membrana plasmática e dispor de satisfatória biodisponibilidade. Além disso, apresentou promissora atividade antibacteriana frente a bactéria *S. aureus*, o que somente ocorreu na presença de luz azul, indicando seletiva ativação luminosa. A fotoclivagem de DNA pBR322 na presença do complexo é, aparentemente, mais eficiente após irradiação do complexo com luz azul e verde, notadamente influenciada pela geração de espécies oxidativas e a interação DNA-complexo. Além disso, verificou-se a importância da biotina para terapia seletiva de câncer, sendo observado que o complexo não biotinilado não mostrou atividade citotóxica frente às células cancerígenas. Esse perfil é bastante curioso considerando que esse composto apresentou excelente interação com DNA, geração de espécies radiculares e fotoclivagem in vitro, as quais foram tão eficientes ou até melhores do que o **Ru-biot**. Entretanto, somente com a incorporação da biotina foi possível conferir maior citotoxicidade e seletividade ao complexo, demonstrando a promissora atividade frente às células que possuem receptores de biotina. Assim, os resultados obtidos ilustram o potencial desse composto, reforçando a importância crítica da captação celular durante o desenvolvimento de medicamentos.



Fonte: elaborada pelo autor.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.D et al. Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 56, 15, 9084-9096, 2017. doi:10.1021/acs.inorgchem.7b01108
- ALESSIO, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. **European Journal of Inorganic Chemistry**, [s.l.], 12, 1549-1560, 2017. doi:10.1002/ejic.201600986
- ALLARDYCE, C. S; DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, [s.l.], 45, 62-69, 2001.
- AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological Research**, [s.l.], 106, 27-36., 2016. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.001
- AMBROISE, A; MAIYA, B.G. Ruthenium(II) complexes of 6,7-dicyanodipyridoquinoxaline: Synthesis, luminescence studies, and DNA interaction. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 39, 19, 4264-4272, 2000. doi:10.1021/ic9914692
- ATKINS, P. W; SHRIVER, D.F. **Química Inorgânica**. (Bookman, ed.). Porto Alegre, 2008.
- BAKHTIAR, R; OCHIAI EI. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, [s.l.], 32, 5, 525-540, 1999. doi:10.1016/S0306-3623(98)00223-7
- BALZANI, V; JURIS, A. Photochemistry and photophysics of Ru(II)-polypyridine complexes in the Bologna group. From early studies to recent developments. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], 21, 1, 97-115, 2001. doi:10.1016/S0010-8545(00)00274-5
- BARREIRO, ELIEZER J.; FRAGA, CAM. **Química Medicinal: As Bases Moleculares Da Ação Dos Fármacos**. 3 edição. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BECHER, D et al. A proteomic view of an important human pathogen-Towards the quantification of the entire staphylococcus aureus proteome. **PLoS One**, [s.l.], 4, 12, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0008176
- BECKE, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], 98, 7, 5648-5652, 1993.
- BONNETT, R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. **Gordon Breach Sci Publ**. [s.l.], 2000.
- BURYA, S.J; LUTTERMAN, D.A; TURRO, C. Absence of quenching by [Fe(CN)6]4- is not proof of DNA intercalation. **Chemical Communications**, [s.l.], 47, 6, 1848-1850, 2011. doi:10.1039/c0cc04973e
- BUTLER, J.S; SADLER, P.J. Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes. **Curr Opin Chem Biol**, [s.l.], 17, 2, 175-188, 2013. doi:10.1016/j.cbpa.2013.01.004
- By J. E. DIGKESON* and L. A. SUMMERS*. [s.l.], 5-9, 1970.

CHEN, M; LI, H; SHAO, J; HUANG, Y; XU, Z. Preparation of a [Ru(bpy)₂(dppz)]₂. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 2, 2043-2045, 2011. doi: 10.1021/ic102128z

CHEN, S et al. Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release. **Bioconjugate Chemistry**, [s.l.], 21, 5, 979-987, 2010. doi:10.1021/bc9005656

CHEN, Y.M; LIU, Y.J; LI, Q; WANG, K.Z. pH- and DNA-induced dual molecular light switches based on a novel ruthenium(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], 10, 10, 1395-1404, 2010. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.08.002

COLEMAN, W.B; TSONGALIS, G.J. **The Molecular Basis of Human Cancer**. Humana Press, [s.l.], 2002.

COLLINA, S. New Perspectives in Cancer Therapy: The Biotin-Antitumor Molecule Conjugates. **Med Chem** (Los Angeles), [s.l.], S(1), 2014. doi:10.4172/2161-0444.s1-004

CRAVER, E.; MCCRATE, A.; NIELSEN, M.; SWAVEY, S. Trisruthenium(II)/copper(II) multimetallic porphyrin: Synthesis, characterization, DNA binding and supercoiled DNA photocleavage studies. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], 363, 2, 453-456, 2010.

DELANEY, S; PASCALY, M; BHATTACHARYA, P.K; HAN, K; BARTON, J.K. Oxidative damage by ruthenium complexes containing the dipyridophenazine ligand or its derivatives: A focus on intercalation. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 41, 7, 1966-1974, 2002. doi:10.1021/ic0111738

DENNINGTON, R; KEITH, T; MILLAM, J. GaussView, Version 5. **Semichem Inc Shawnee Mission KS**, [s.l.], 2009.

DEO, K.M; PAGES, B.J; ANG, D.L; GORDON, C.P; ALDRICH-WRIGHT, J.R. Transition Metal Intercalators as Anticancer Agents-Recent Advances. **Int J Mol Sci**, [s.l.], 17, 11, 2016. doi:10.3390/ijms17111818

DEROSA, M.C; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coord Chem Rev**, [s.l.], 233-234, 351-371, 2002. doi:10.1016/S0010-8545(02)00034-6

DING, H.Y et al. Aryl-modified ruthenium bis(terpyridine) complexes: Quantum yield of ¹O₂ generation and photocleavage on DNA. **J Photochem Photobiol A Chem**, [s.l.], 177, 2-3, 286-294, 2006. doi:10.1016/j.jphotochem.2005.06.008

FERLAY, J et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, [s.l.], 144, 8, 1941-1953, 2019. doi:10.1002/ijc.31937

FRENKING, G. E; KOCH, W. A MO/LLER–Plesset study of the electron affinities of the diatomic hydrides XH (X=Li, B, Be, C, N, O). **J Chem Phys**, [s.l.], 84, 6, 3224-3229, 1986.

FRISCH, M.J et al. Gaussian 09. **Gaussian, Inc Wallingford, CT, USA**. 2009.

GILL, M.R; THOMAS, J.A. Ruthenium(ii) polypyridyl complexes and DNA - From structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chem Soc Rev**, [s.l.], 41, 8, 3179-3192, 2012. doi:10.1039/c2cs15299a

GOLLA, U; SWAGATIKA, S; CHAUHAN, S; TOMAR, R.S. A systematic assessment of chemical, genetic, and epigenetic factors influencing the activity of anticancer drug KP1019

(FFC14A). **Oncotarget**, [s.l.], 8, 58, 98426-98454, 2017. doi:10.18632/oncotarget.21416

GRANSBURY, G.K et al. Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments. **Metalomics**, [s.l.], 8, 8, 762-773, 2016. doi:10.1039/c6mt00145a

HARRISON, D.P et al. Coordination chemistry of single-site catalyst precursors in reductively electropolymerized vinylbipyridine films. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 52, 9, 4747-4749, 2013. doi:10.1021/ic302472r

HAY, P.J; WADT, W.R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], 82, 1, 299-310, 1985.

HECKER, M; BECHER, D; FUCHS, S; ENGELMANN, S. A proteomic view of cell physiology and virulence of Staphylococcus aureus. **International Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], 300, 2-3, 76-87, 2010. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.006

HUANG, H.L; LI, Z.Z; LIANG, Z.H; YAO, J.H; LIU, Y.J. Synthesis, cellular uptake, apoptosis, cytotoxicity, cell cycle arrest, interaction with DNA and antioxidant activity of ruthenium(II) complexes. **Europeana Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], 46, 8, 3282-3290, 2011. doi:10.1016/j.ejmech.2011.04.049

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. *Rio Janeiro INCA*. 2018.

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.], 59, 1, 40-52, 2016. doi:10.1007/s11426-015-5519-2

JIRSOVA, K; MANDYS, V; GISPEN, W.H; BÄR, P.R. Cisplatin-induced apoptosis in cultures of human Schwann cells. **Neuroscience Letters**, [s.l.], 392, 1-2, 22-26, 2006. doi:10.1016/j.neulet.2005.08.068

JURIS, A; BALZANI, V; BARIGELLETI, F; CAMPAGNA, S; BELSER, P AND VON ZELEWSKY A. Ru(II) Polypyridine complexes: photophysical, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. **Coordination Chemistry Review**, [s.l.], 84, 85-277, 1988.

KALLUS, S et al. Synthesis and biological evaluation of biotin-conjugated anticancer thiosemicarbazones and their iron(III) and copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], 190(Iii), 85-97, 2019. doi:10.1016/j.jinorgbio.2018.10.006

KAMER, S; ATASOY, B.M. Mechanisms of resistance to radiation. **Princ Pract Mod Radiother Tech Breast Cancer**, [s.l.], 478, 49-57, 2013. doi:10.1007/978-1-4614-5116-7_5

KATCKA, M.; URBANSKI, T. Infrared Absorption Spectra of Quaternary Salts of Pyridine. **Bull L'ACADEMIE Pol DES Sci**, [s.l.], XII, 615-621, 1964.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Review Cancer**, [s.l.], 7, 8, 573-584, 2007. doi:10.1038/nrc2167

KIM, T; JEON, H.M; LE, H.T; KIM, T.W; KANG, C; KIM, J.S. A biotin-guided fluorescent-peptide drug delivery system for cancer treatment. **Chemical Communications**, [s.l.], 50, 57, 7690-7693, 2014. doi:10.1039/c4cc02878c

KIRGAN, R. A; SULLIVAN, B. P; RILLEMA, D.P. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Copper. In: Chemistry T in C, ed. **Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy, A Division of Plenum Publishing Corporation**. 1. °ed, Plenum Press New York. 1983.

LAZIĆ, D; ARSENIJEVIĆ, A; PUCHTA, R; BUGARČIĆ, Ž.D; RILAK, A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(II) terpyridine complexes. **Dalton Transactions**, [s.l.], 45, 11, 4633-4646, 2016. doi:10.1039/c5dt04132e

LEE, M; RHODES, A.L; WYATT, M.D; FORROW, S; HARTLEY, J.A. GC Base Sequence Recognition by Oligo(imidazolecarboxamide) and C-Terminus-Modified Analogues of Distamycin Deduced from Circular Dichroism, Proton Nuclear Magnetic Resonance, and Methidiumpropylethylenediaminetetraacetate-Iron(II) Footprinting Studies. **Biochemistry**, [s.l.], 32, 16, 4237-4245, 1993. doi:10.1021/bi00067a011

LEE, C.; YANG, W; PARR, R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, [s.l.], 37, 2, 785-789, 1982.

LEESON, P.D; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], 6, 11, 881-890, 2007. doi:10.1038/nrd2445

LISKA, P; VLACHOPOULOS, N; NAZEERUDDIN, M.K; COMTE, P; GRATZEL, M. ci5-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 American Chemical Society**, [s.l.], 110, 11, 3686-3687, 1988. doi:10.1021/ja00219a068

LIU, J et al. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], 91, 1, 269-276, 2002. doi:10.1016/S0162-0134(02)00441-5

LO, K.K.W; LAU, J.S.Y. Cyclometalated iridium(III) diimine bis(biotin) complexes as the first luminescent biotin-based cross-linkers for avidin. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 46, 3, 700-709, 2007. doi:10.1021/ic0612202

LO, K.K.W; LEE, T.K.M. Luminescent ruthenium(II) polypyridine biotin complexes: Synthesis, characterization, photophysical and electrochemical properties, and avidin-binding studies. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 43, 17, 5275-5282, 2004. doi:10.1021/ic049750q

MAHADEVAN, S; 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.], 254, 2, 291-302, 1997. doi:10.1016/S0020-1693(96)05175-4

MAITI, S; PAIRA, P. Biotin conjugated organic molecules and proteins for cancer therapy: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], 145, 206-223, 2018. doi:10.1016/j.ejmech.2018.01.001

MAITI, S et al. Gemcitabine-coumarin-biotin conjugates: A target specific theranostic

anticancer prodrug. **Journal American Chemical Society**, [s.l.], 135, 11, 4567-4572, 2013. doi:10.1021/ja401350x

MARQUES, M.A.L; MAITRA, N.T; NOGUEIRA, F.M.S; GROSS, E.K.U; RUBIO, A. **Fundamentals of Time-Dependent Density Functional Theory**. Springer Verlag. 2012.

MATHUR, S; TABASSUM, S. Template synthesis of novel carboxamide dinuclear copper (II) complex: Spectral characterization and reactivity towards calf-thymus DNA. **BioMetals**, [s.l.], 21, 3, 299-310, 2008. doi:10.1007/s10534-007-9119-2

MCCAFFERTY, D.G et al. Synthesis of redox derivatives of lysine and their use in solid-phase synthesis of a light-harvesting peptide. **Tetrahedron**, [s.l.], 51, 4, 1093-1106, 1995. doi:10.1016/0040-4020(94)01018-U

MENNUCCI, B.; CANCÈS, E. 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. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], 101, 49, 10506-10517, 1997.

METZLER-NOLTE, N.; SCHATZSCHNEIDER, U. **Bioinorganic Chemistry: A Practical Course**. (Co. W de GG, ed.). Berlin; 2009.

MONRO, S et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. **Chemical Reviews**, [s.l.], 119, 2, 797-828, 2019. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00211

MUHAMMAD, N; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Curr Opin Chem Biol**, [s.l.], 19, 1, 144-153, 2014. doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.003

MUHAMMAD, N; SADIA, N; ZHU, C; LUO, C; GUO, Z; WANG, X. Biotin-tagged platinum(IV) complexes as targeted cytostatic agents against breast cancer cells. **Chemical Communications**, [s.l.], 53, 72, 9971-9974, 2017. doi:10.1039/c7cc05311h

NAIR, R.S; POTTI, M.E; THANKAPPAN, R; CHANDRIKA, S.K; KURUP, M.R.P; SRINIVAS, P. Molecular trail for the anticancer behavior of a novel copper carbohydrazone complex in BRCA1 mutated breast cancer. **Molecular Carcinogenesis**, [s.l.], 56, 5, 1501-1514, 2017. doi:10.1002/mc.22610

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 of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], 97, 4, 364-369, 2003. doi:10.1016/S0162-0134(03)00290-3

NIKOLIS, N; METHENITIS, C; PNEUMATIKAKIS, G. Studies on the interaction of altromycin B and its platinum(II) and palladium(II) metal complexes with calf thymus DNA and nucleotides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], 95, 2-3, 177-193, 2003. doi:10.1016/S0162-0134(03)00102-8

Organization. WH. **Global Health Observatory**. Geneva World Heal Organ, 2018.

PAGES, B.J; ANG, D.L; WRIGHT, E.P; ALDRICH-WRIGHT, J.R. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, [s.l.], 44, 8, 3505-3526, 2015. doi:10.1039/c4dt02700k

- PARK, S; KIM, E; KIM, W.Y; KANG, C; KIM, J.S. Biotin-guided anticancer drug delivery with acidity-triggered drug release. **Chemical Communications**, [s.l.], 51, 45, 9343-9345, 2015. doi:10.1039/c5cc03003j
- PASZKO, E; EHRHARDT, C; SENGE, M.O; KELLEHER, D.P; REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, [s.l.], 8, 1, 14-29, 2011. doi:10.1016/j.pdpdt.2010.12.001
- PAVIA, DONALD L.; LAMPMAN, GARY M.; KRIZ, GEORGE S.; VYVYAN JR. **Introdução à Espectroscopia** – Tradução Da 4ª Edição Norte-Americana. (Learning C, ed.). São Paulo; 2010.
- PERKAMPUS, H.-H; SANDEMAN, I.; TIMMONS, C.J. **DMS UV Atlas of Organic Compounds**. Vol II. (Butterworths, ed.). London; 1966.
- POYNTON, F.E et al. The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for: In vitro cellular and in vivo applications. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], 46, 24, 7706-7756, 2017. doi:10.1039/c7cs00680b
- PYLE, A.M et al. Mixed-Ligand complexes of ruthenium(II): Factors governing binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], 111, 8, 3051-3058, 1989. doi:10.1021/ja00190a046
- RAMA, A. C. R; VEIGA, F. ; FIGUEIREDO, I. V; SOUSA, A; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β - ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Brazilian J Pharm Sci**, [s.l.], 42, 2006.
- REICHARDT, C. **Solvents and Solvents Effects in Organic Chemistry**. 2° ed VCH Publ Weinheim. 1988.
- REISNER, E; ARION, V.B; KEPPLER, B.K; POMBEIRO, A.J.L. Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], 361, 6, 1569-1583, 2008. doi:10.1016/j.ica.2006.12.005
- REN, W.X et al. Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. **Chemistry Communications**, [s.l.], 51, 52, 10403-10418, 2015. doi:10.1039/c5cc03075g
- SAHA, S et al. Biotin-conjugated photocytotoxic iron (III) complexes. **Philosophical Transactions of The Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Sciences**, [s.l.], 371, 1995, 2013.
- SATIAPUTRA, J; SHEARWIN, K.E; BOOKER, G.W; POLYAK, S.W. Mechanisms of biotin-regulated gene expression in microbes. **Synthetic and Systemic Biotechnology**, [s.l.], 1, 1, 17-24, 2016. doi:10.1016/j.synbio.2016.01.005
- SAUVAGEOT, E et al. Antipseudomonal activity enhancement of luminescent iridium(iii) dipyrindylamine complexes under visible blue light. **Metallomics**, [s.l.], 9, 12, 1820-1827, 2017. doi:10.1039/c7mt00262a
- SHALOAM, D; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: 46 Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], 740, 364–378, 2014.

- SHI JF, WU P, JIANG ZH, WEI XY. Synthesis and tumor cell growth inhibitory activity of biotinylated annonaceous acetogenins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], 71, 219-228, 2014. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.012
- SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, [s.l.], seventh ed.; 2005.
- SIRAJUDDIN, M; ALI, S; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology**, [s.l.], 124, 1-19, 2013. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013
- SLIM, M; SLEIMAN, H.F. Ruthenium(II)-phenanthroline-biotin complexes: Synthesis and luminescence enhancement upon binding to avidin. **Bioconjugate Chemistry**, [s.l.], 15, 5, 949-953, 2004. doi:10.1021/bc049919o
- SOARES DA COSTA, T.P et al. Selective inhibition of biotin protein ligase from *Staphylococcus aureus*. **Journal Biological Chemistry**, [s.l.], 287, 21, 17823-17832, 2012. doi:10.1074/jbc.M112.356576
- SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B., SNYDER SA. **Química Orgânica. LTC**, [s.l.], 1 e 2(11 ed, 2014.
- STEPHENS, P.J; DELVIN, 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.], 98, 45, 11623-11627, 1994.
- SUN, Y; COLLINS, S.N; JOYCE, L.E; TURRO, C. Unusual photophysical properties of a ruthenium(II) complex related to [Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 49, 9, 4257-4262, 2010. doi:10.1021/ic9025365
- SVENSSON, F.R; MATSON, M; LI, M; LINCOLN, P. Lipophilic ruthenium complexes with tuned cell membrane affinity and photoactivated uptake. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], 149, 3, 102-106, 2010. doi:10.1016/j.bpc.2010.04.006
- TABRIZI, L; ABYAR, F. De New Design of Cu(II) Complex Containing CNC-Pincer-Vitamin B3 and B7 Conjugates for Breast Cancer Application. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], 16, 9, 3802-3813, 2019. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00399
- TANIELIAN, C; WOLFF, C; ESCH, M. Singlet oxygen production in water: Aggregation and charge-transfer effects. **Journal Physical Chemistry**, 100, 16, 6555-6560, 1996. doi:10.1021/jp952107s
- TROIAN-GAUTIER, L; MOUCHERON, C. Ruthenium(II) complexes bearing fused polycyclic ligands: From fundamental aspects to potential applications. **Molecules**, [s.l.], 19, 4, 5028-5087, 2014. doi:10.3390/molecules19045028
- TUITE, E et al. Effects of Minor and Major Groove-Binding Drugs and Intercalator on the DNA Association of Minor Groove-Binding Proteins Rec A and Deoxyribonuclease I Detected by Flow Linear Dichroism. **European Journal Biochemistry**, [s.l.], 243, 1-2, 482-492, 1997.
- URRUTICOECHEA A, ALEMANY R, BALART J, VILLANUEVA A, VINALS F, CAPELLA G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], 16, 1, 3-10, 2010. doi:10.2174/138161210789941847

VADLAPUDI, A.D; VADLAPATLA, R.K; PAL, D; MITRA, A.K. Functional and molecular aspects of biotin uptake via SMVT in Human corneal epithelial (HCEC) and retinal pigment epithelial (D407) Cells. **The AAPS Journal**, [s.l.], 14, 4, 832-842, 2012. doi:10.1208/s12248-012-9399-5

VAN RIJT, S.H; SADLER, P.J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, [s.l.], 14, 23-24, 1089-1097, 2009. doi:10.1016/j.drudis.2009.09.003

WALKER, J.R; ALTMAN, E. Biotinylation Facilitates the Uptake of Large Peptides by Escherichia coli and Other Gram-Negative Bacteria. **American Society for Microbiology**, [s.l.], 71, 4, 1850-1855, 2005. doi:10.1128/AEM.71.4.1850

WARING, M.J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], 13, 269-282, 1965.

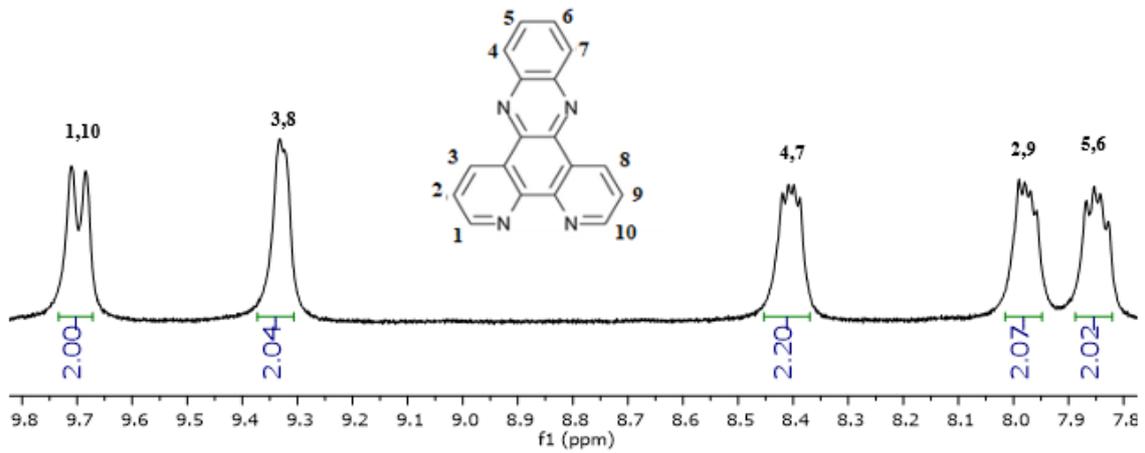
YANG, XIAO-JUAN et al. Heteroleptic 5,5_-disubstituted-2,2_-bipyridine complexes of Heteroleptic 5,5_-disubstituted-2,2_-bipyridine complexes of ruthenium(II): spectral, electrochemical, and structural investigations ruthenium(II): spectral, electrochemical, and structural inves. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], 318, 103–116, 2001.

ZAKI, M; ARJMAND, F; TABASSUM, S. Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], 444, 1-22, 2016. doi:10.1016/j.ica.2016.01.006

ZHANG, P; SADLER, P.J. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. **European Journal Inorganic Chemistry**, [s.l.], 12, 1541-1548, 2017. doi:10.1002/ejic.201600908

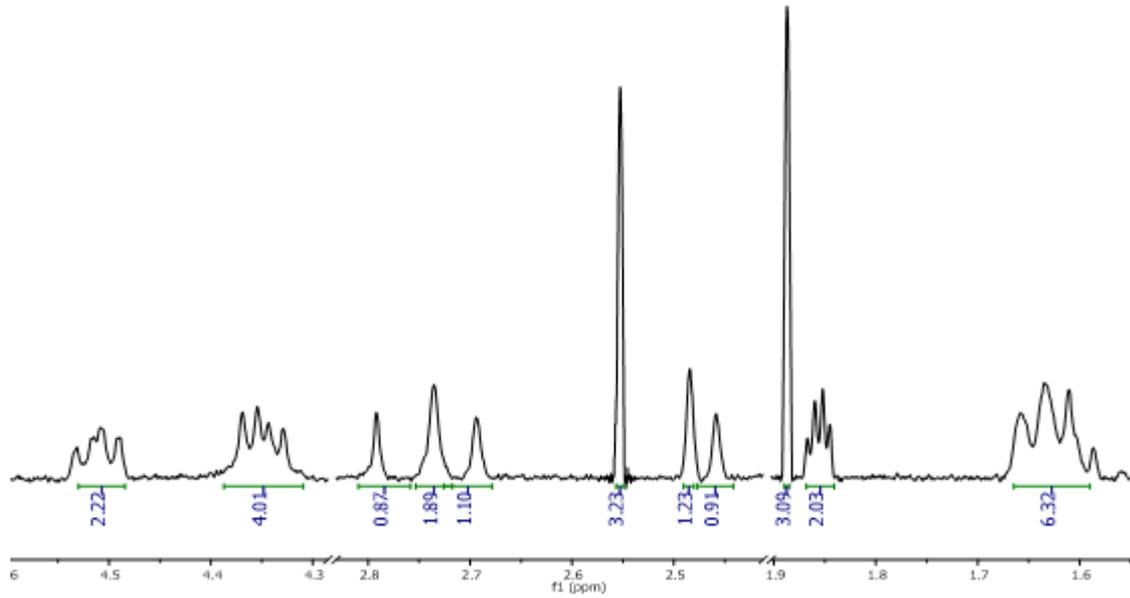
ZIGLER, D.F; ELVINGTON, M.C; HEINECKE, J; BREWER, K.J. Luminescently tagged 2,2'-bipyridine complex of FeII: Synthesis and photophysical studies of 4-[N-(2-anthryl)carbamoyl]-4'-methyl-2,2'-bipyridine. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], 45, 17, 6565-6567, 2006. doi:10.1021/ic060207e

**APÊNDICE A – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H
PARA O LIGANTE DPPZ EM CLOROFÓRMIO DEUTERADO, OBTIDO NA
FREQUÊNCIA DE 300 MHz.**



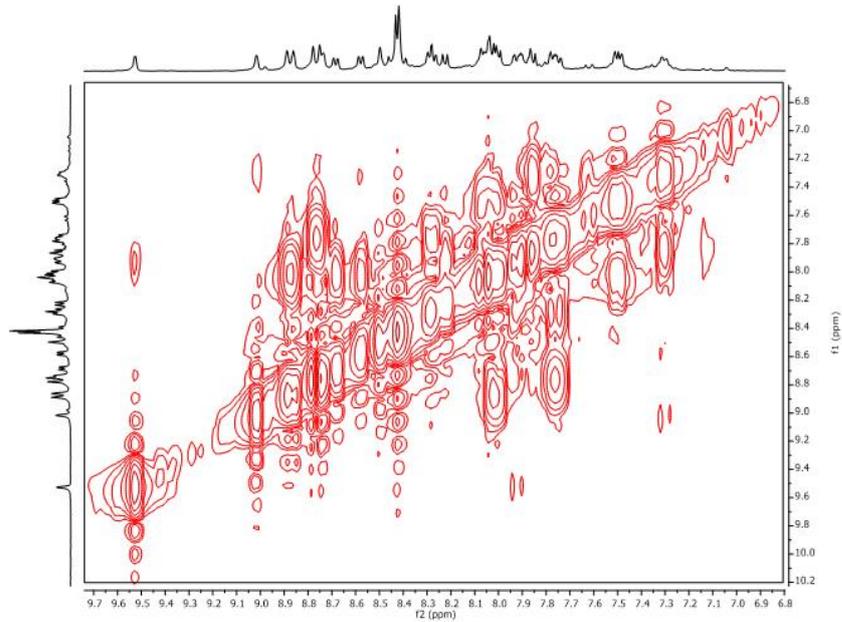
Fonte: elaborada pelo autor.

**APÊNDICE B – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H
PARA O RU-BIOT EM DMSO DEUTERADO NA REGIÃO DE 1,8 ppm A 4,55 ppm,
OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz.**



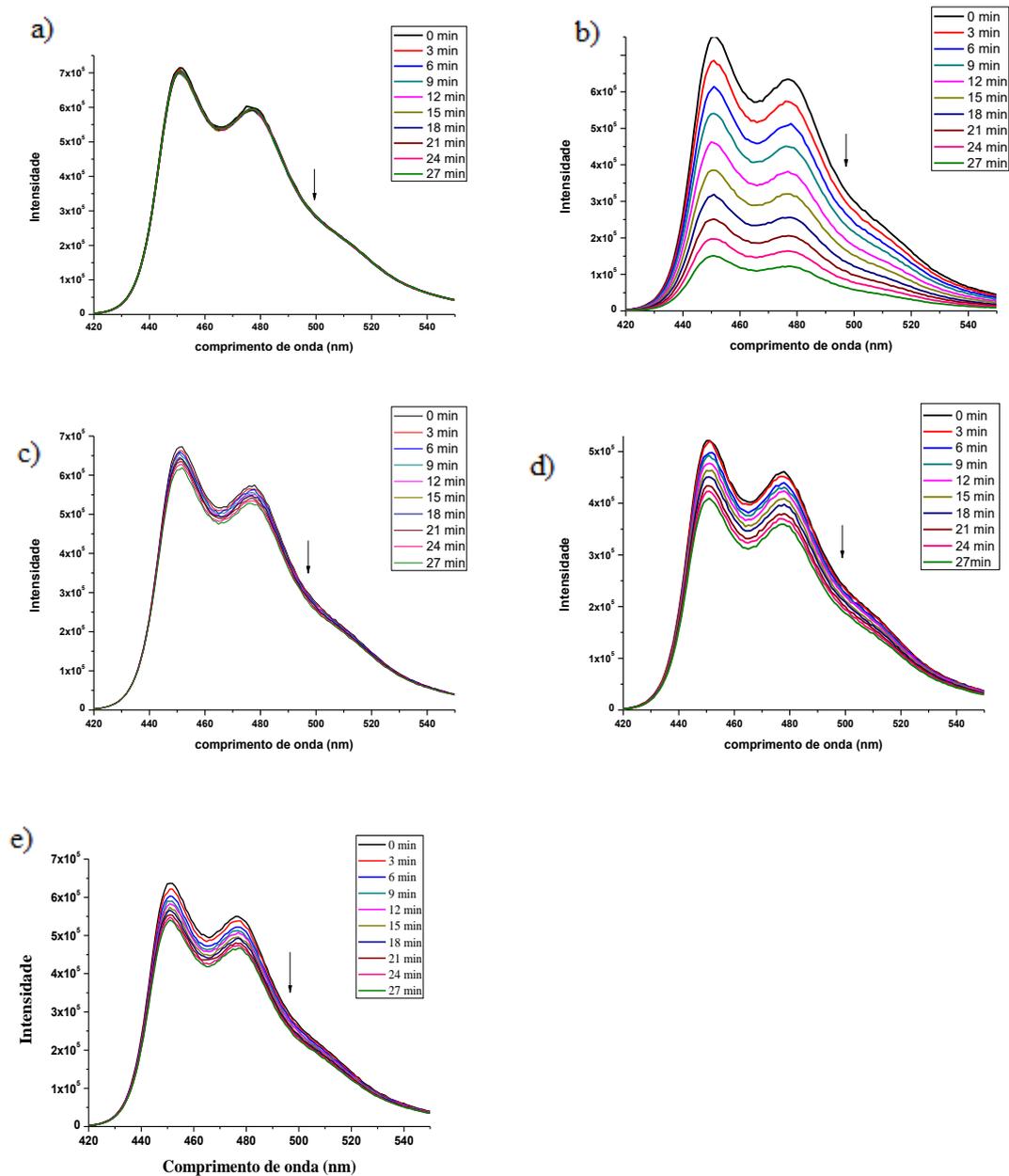
Fonte: elaborada pelo autor.

**APÊNDICE C – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H
BIDIMENSIONAL PARA O COMPLEXO RU-BIOT EM DMSO DEUTERADO,
OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz.**



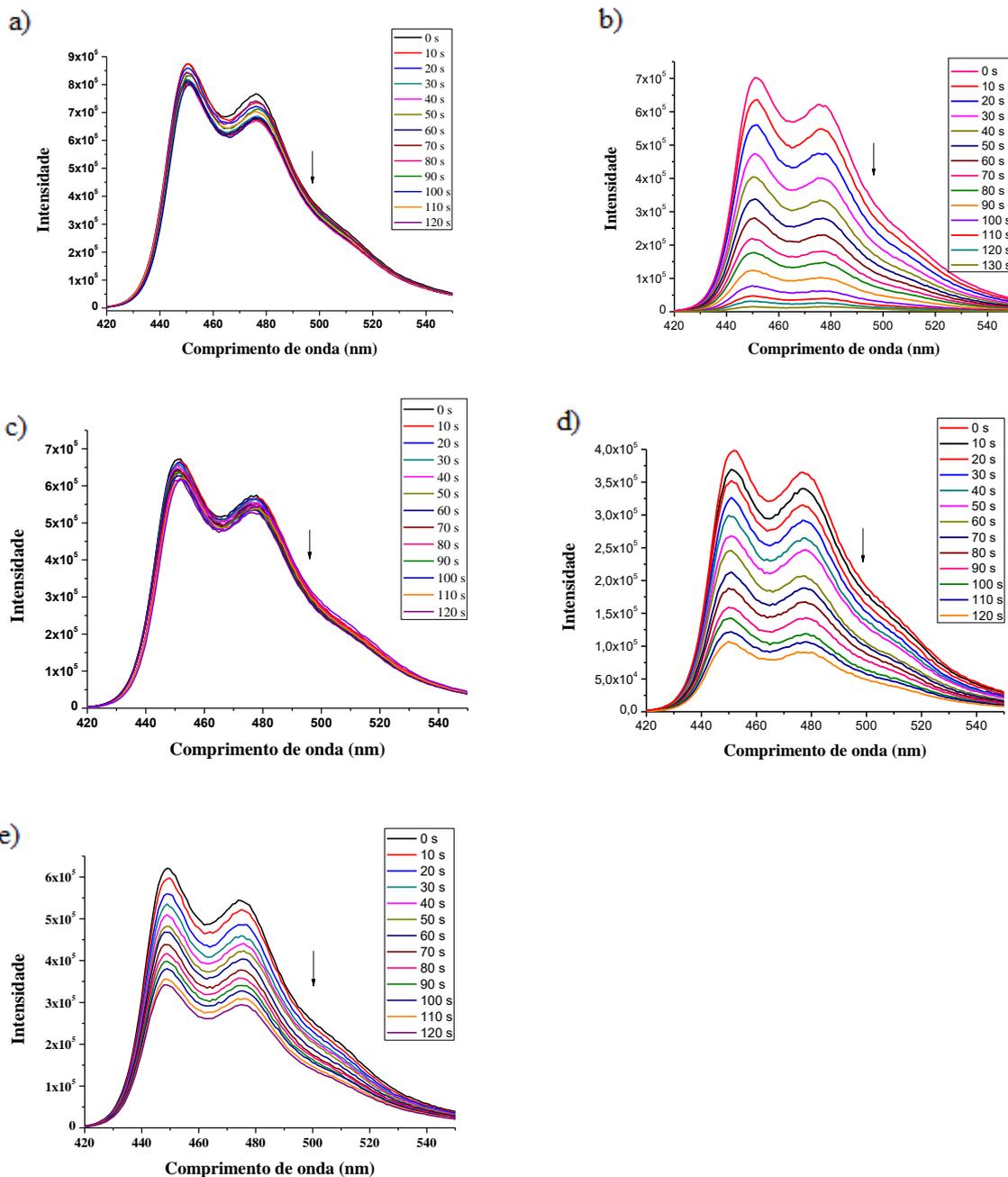
Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE D – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE AZUL DE METILENO; (C) RU-DPPZCL₂; (D) RU-BIOT E (E) RU-ANTH, NA CONCENTRAÇÃO DE 16 μM EM ACETONITRILA. FENDAS:0,3 MM, $\lambda_{\text{EXC}}= 410 \text{ NM}$ E EMISSÃO DE 420-550 NM. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 3 MINUTOS. AMOSTRA IRRADIADA *EX SITU* USANDO LED VERMELHO.



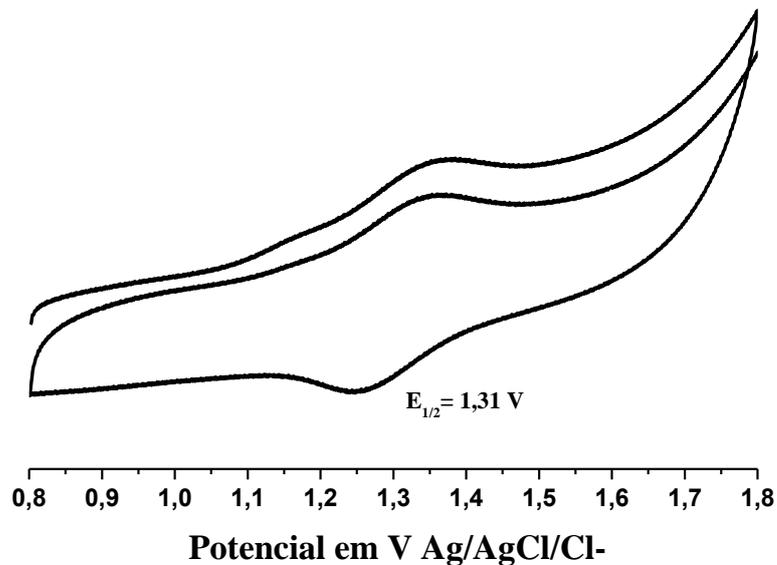
Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE E – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE ROSA BENGALA; (C) RU-DPPZCL₂; (D) RU-BIOT E (E) RU-ANTH, NA CONCENTRAÇÃO DE 16 μ M EM ACETONITRILA. FENDAS:0,3 mm, λ_{EXC} = 410 nm E EMISSÃO DE 420-550 nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 3 MINUTOS. AMOSTRA IRRADIADA *EX SITU* USANDO LED VERDE.



Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE F – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO COMPLEXO [RU(BPY-ANTH)(BPY-BIOT)(DPPZ)]²⁺ OBTIDOS EM MEIO DE ACETONITRILA 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.



Fonte: elaborada pelo autor.