



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

GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA OLIVEIRA

**COMPLEXOS DE RUTÊNIO FUNCIONALIZADOS COMO POTENCIAIS
AGENTES FOTOTERAPÊUTICOS**

FORTALEZA

2024

GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA OLIVEIRA

COMPLEXOS DE RUTÊNIO FUNCIONALIZADOS COMO POTENCIAIS AGENTES
FOTOTERAPÊUTICOS

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

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

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

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O47c Oliveira, Geângela de Fátima Sousa.
Complexos de rutênio funcionalizados como potenciais agentes fototerapêuticos. / Geângela de
Fátima Sousa Oliveira. – 2024.
197 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
Química, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
Coorientação: Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho.

1. Rutênio. 2. Câncer. 3. Bactéria. 4. Oxigênio Singlete. 5. G-quadruplex. I. Título.

CDD 540

GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA OLIVEIRA

COMPLEXOS DE RUTÊNIO FUNCIONALIZADOS COMO POTENCIAIS AGENTES
FOTOTERAPÊUTICOS

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

Aprovada em: 06 / 12 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, saúde e fé que me permitiram realizar este trabalho, superando os obstáculos e me permitindo aprender e evoluir. Sua presença constante foi o guia que me sustentou em todos os momentos.

Aos meus pais, Francisco Giovanni Oliveira da Silva e Maria Rosângela de Souza Bezerra, meu profundo agradecimento pelo amor incondicional, pela educação e valores que me transmitiram, e por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos. Vocês são minha base, e toda conquista é também de vocês.

Ao meu irmão, Jefferson Wisner, por ser meu amigo e refúgio, especialmente nos momentos mais difíceis. Sua fraternidade e apoio me deram força em muitas etapas dessa jornada.

À minha noiva, Jeane Nobre, meu amor e gratidão por todo carinho, paciência e apoio inabalável. Você esteve ao meu lado em cada desafio, sendo minha companhia mais fiel. Às minhas cachorrinhas, Kyra e Kathe, que, com sua alegria e amor, transformam o cansaço do dia em felicidade ao voltar para casa.

Aos meus amigos, que me acompanharam ao longo dessa caminhada. Em especial, a Antônio Caian e Mayara Alencar, por todo apoio nos trabalhos e disciplinas, além das palavras de encorajamento, confiança, e pelas risadas e conselhos que tornaram essa jornada mais leve. Vocês foram e sempre serão essenciais na minha vida.

Ao grupo do Laboratório de Bioinorgânica e da UFC, por todos os momentos de convivência e aprendizado que compartilhamos: Walysson, Wellington, Victor (mineiro da Bahia), Victor Milk, Hermes, Victor Sombra, Leo Solzinho, Filipe e Thaís Nena. Obrigada pela disposição, pelas conversas, discussões e pelas brincadeiras que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável e produtivo.

Aos meus orientadores, Prof. Eduardo Henrique Silva de Sousa e Prof^a Idalina Maria Moreira de Carvalho, pela confiança, paciência, e pela dedicação incansável ao longo de toda essa trajetória. Agradeço profundamente pela orientação, pela constante troca de conhecimentos e pela oportunidade de fazer parte desse incrível projeto. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores Izaura Diógenes e Luiz Gonzaga, pelos ensinamentos valiosos ao longo do doutorado. Suas contribuições foram essenciais para meu desenvolvimento acadêmico.

Aos membros da banca examinadora, por gentilmente aceitarem avaliar esta tese e por suas valiosas contribuições.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pela oportunidade de realizar minha formação acadêmica com excelência, e à CAPES, pelo apoio financeiro que viabilizou minha jornada.

A todos vocês, meu mais profundo e sincero agradecimento. Muito obrigada!

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

RESUMO

Durante as últimas décadas, complexos de rutênio têm sido amplamente investigados, havendo destaque para os compostos polipiridínicos com potenciais aplicações como agentes anticancerígenos, antivirais, antibacterianos, dentre outras. Novas estratégias, incluindo o uso da luz, têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a citotoxicidade com aumento de seletividade ao alvo e menor toxicidade. Com o objetivo de combinar essas propriedades foram sintetizados dois complexos polipiridínicos de rutênio: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-anth})](\text{PF}_6)_2$ (GRBA) e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-anth})](\text{PF}_6)_2$ (GRPA), os quais contém a bipiridina conjugada com antraceno como um dos ligantes. Estes complexos foram caracterizados por várias técnicas de espectroscopia na região do UV-vis e infravermelho, espectroscopia de emissão, ressonância magnética nuclear e voltametria cíclica. O complexo GRPA apresentou fotogeração de oxigênio singlete expressivamente elevada (luz azul, $\Phi_{\Delta} = 0,95$) medida usando a sonda SOSG em água, enquanto que GRBA mostrou-se bem mais eficiente (1,8x) em fotogerar radical superóxido. Adicionalmente, uma série de experimentos foram implementados para avaliar a interação desses compostos com DNA canônicos e estruturas não canônicas. Não se observou interação mensurável do GRBA com DNA genômico, enquanto GRPA apresentou interação com $K_b = 4,51 \times 10^4$ e indícios de intercalação nessa macromolécula. Estudos com sequencias de DNA do tipo G-quadruplex demonstraram interações e estabilizações significativas desse tipo de estrutura, em particular das sequencias hTel e 22AG, com interação evidentemente seletiva em comparação ao DNA duplex. Adicionalmente, GRPA exibiu um perfil lipofílico ($\log P = +0,310$) quando comparado ao GRBA ($\log P = -0,018$), indicando características promissoras para satisfatória permeabilidade celular. Ensaios antimicrobianos foram realizados observando-se notável atividade antibacteriana, particularmente para o GRPA, incluindo efeito sinérgico em combinação com antibióticos comerciais. Por outro lado, o complexo GRBA apresentou potente atividade citotóxica sob irradiação de luz azul, com valores de IC_{50} de 43 nmol L⁻¹ e 13 nmol L⁻¹ para células MDA-MB-231 (linhagem de câncer de mama triplo-negativo) e A2780 (linhagem de câncer de ovário). Estes resultados promissores representam um caso interessante de uma modificação simples em um complexo de rutênio polipiridínico com um aumento expressivo de 130x da atividade biológica com luz azul, e ressalta a necessidade de futuros estudos a fim de explorar o potencial terapêutico desses complexos metálicos.

Palavras-chave: rutênio; câncer; bactéria; oxigênio singlete; fototerapia; antraceno; g-quadruplex.

ABSTRACT

During the last decades, ruthenium metal complexes have been extensively investigated, with polypyridine compounds standing out for their potential applications as anticancer, antiviral and antibacterial agents. New strategies, including the use of light, have been developed to enhance cytotoxicity with increased target selectivity and lower toxicity. In order to combine these properties, two polypyridine complexes of ruthenium containing conjugated anthracene were synthesized, GRBA = $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-anth})](\text{PF}_6)_2$ and GRPA = $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-anth})](\text{PF}_6)_2$, linkers: (bpy-anth = 4'-methyl-N-(anthracen-2-yl)-[2,2'bipyridine]-4-carboxamide). These complexes characterized by UV-vis and infrared spectroscopy, emission spectroscopy, nuclear magnetic resonance and cyclic voltammetry. The GRPA complex showed very high singlet oxygen photogeneration (blue light, $\Phi_\Delta = 0.95$) measured using the SOSG probe in water, while GRBA demonstrated 1.8 times higher efficiency in photogenerating superoxide radicals. Additionally, DNA interaction studies revealed that GRBA did not exhibit measurable binding to genomic DNA, whereas GRPA displayed an association constant of $K_b = 4.51 \times 10^4$, suggesting intercalation with genomic DNA. Experiments with G-quadruplex DNA sequences, particularly hTel and 22AG, showed significant interactions and stabilization, with evident selectivity over duplex DNA. In addition, this complex was shown to be lipophilic ($\log P = +0.310$) when compared to GRBA ($\log P = -0.018$), showing promising characteristics for good cell permeability. In antimicrobial tests, the complexes exhibited notable antibacterial activity, including a synergistic effect when combined with commercial antibiotics. On the other hand, GRBA showed potent cytotoxic activity under blue light irradiation, with IC_{50} values of 43 nmol L^{-1} and 13 nmol L^{-1} for MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer) and A2780 (ovarian cancer) cells, respectively. These promising findings illustrate an impressive 130-fold increase in biological activity under blue light for a simple modification in the ruthenium polypyridine complex, underscoring the need for further studies to explore their therapeutic potential.

Keywords: ruthenium; cancer; bacteria; singlet oxygen; phototherapy; anthracene; g-quadruplex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- G-tétrade formado por quatro guaninas através da ligação de hidrogênio de Hoogsteen (linha tracejada azul) (A) e estrutura do DNA G-quadruplex intramolecular com três G-tétrades na conformação Híbrida (B)	30
Figura 2	- Conformação do DNA G-quadruplex intermolecular: paralela (A), antiparalela (B) e Híbrida (C)	32
Figura 3	- Estruturas químicas dos potenciais metalofármacos TLD1433 e NKP1339 de Rutênio	35
Figura 4	- Estruturas dos compostos QN-302 e CX-5461	37
Figura 5	- Processos físico-químicos relacionados à TFD	38
Figura 6	- Estrutura química dos complexos de rutênio descritos	40
Figura 7	- Espectro vibracional na região do Infravermelho dos compostos: bpy-anth (—), [Ru(bpy) ₂ Cl ₂] (—) e GRBA (—) em pastilha de KBr	59
Figura 8	- Espectro vibracional na região do Infravermelho dos compostos: bpy-anth (—), RuphenCl ₂ (—) e GRPA (—) em pastilha de KBr	59
Figura 9	- Espectros eletrônicos do complexo GRPA em metanol, experimental (—) e teórico (—)	62
Figura 10	- Espectros eletrônicos do complexo GRPA em metanol, experimental (—) e teórico (—)	63
Figura 11	- Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo GRPA calculados por TD-DFT	65
Figura 12	- Contribuições dos orbitais moleculares da espécie GRPA em função de seus fragmentos: Ru (—), phen (—) e bpy-anth (—)	66
Figura 13	- Espectro de emissão para o GRPA em metanol (—), em tampão (—) e [Ru(bpy) ₃] ²⁺ (—) em metanol, na concentração de 2x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ a 25°C	67
Figura 14	- Espectro de emissão para o GRBA em metanol (—), em tampão (—) e [Ru(bpy) ₃] ²⁺ (—) em metanol, na concentração de 2 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ a 25°C ..	68

Figura 15 - Voltamograma cíclico do complexo GRPA obtido em acetonitrila contendo PTBA 0,1mol 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	79
Figura 16 - Voltamograma cíclico do complexo GRBA obtido em acetonitrila contendo PTBA 0,1mol 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	70
Figura 17 - Espectro de Ressonância Magnética de ¹ H para o complexo GRPA em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz	72
Figura 18 - Estudo da estabilidade dos complexos monitorado por espetroscopia de absorção eletrônica. Em A e D tem-se os espectros do GRPA monitorados por 48h no escuro e durante 270 min irradiados com luz azul, respectivamente. Em B e E mostram os espectros do GRBA nas mesmas condições, respetivamente	74
Figura 19 - Estudo de estabilidade do complexo GRPA monitorado por HPLC durante 48 horas, com injeções de 20 µL em uma fase móvel de 15% de acetonitrila e 85% de NaTFA a 0,1% pH 3,5.	76
Figura 20 - Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete	77
Figura 21 - Curvas cinéticas do consumo de DPBF (20 µmol L ⁻¹) em função do tempo de irradiação dos complexos (10 µmol L ⁻¹) em metanol (LED azul)	78
Figura 22 - Curvas cinéticas do consumo de DPBF (20 µmol L ⁻¹) em função do tempo de irradiação dos complexos (10 µmol L ⁻¹) em metanol (LED verde)	78
Figura 23 - Diagrama hipotético de energia dos compostos GRBA e GRPA	79
Figura 24 - Curva cinética do consumo de DPBF (20 µmol L ⁻¹) em função do tempo de irradiação dos complexos (10 µmol L ⁻¹) em metanol (LED vermelho)	80
Figura 25 - Medidas da geração de oxigênio singlete sob irradiação de luz azul usando a sonda SOSG (1 µmol L ⁻¹) em metanol (sonda λ_{exc} = 490 nm). Em A mostra	

uma mudança linear da fluorescência durante a irradiação com luz azul em metanol para SOSG (preto), GRPA (verde), GRBA (vermelho) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (azul). Em B, C e D mostram os espectros de emissão para SOSG com GRPA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), GRBA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) durante a irradiação com luz azul	82
Figura 26 - Detecção de superóxido usando NBT ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), GSH ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e GRPA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), monitorada por 100 minutos no escuro (A), com irradiação de luz azul por 100 minutos (B) e na presença de SOD com irradiação de luz azul (C); e de forma semelhante para GRBA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) no escuro (D), com irradiação de luz azul (E) e na presença de SOD com irradiação de luz azul (F). Todas as reações foram realizadas a 25°C	84
Figura 27 - Ensaio da produção de radical hidroxila sob irradiação de luz azul usando a sonda APF ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato de 100 mmol L^{-1} , pH 7,4 ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$). Em A e B mostram os espectros de emissão para APF com GRBA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e GRPA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e também com a adição de manitol (10 mmol L^{-1}) ou azida de sódio (10 mmol L^{-1}), durante a irradiação de luz azul. Em C e D mostram uma mudança linear de fluorescência durante a irradiação de luz em tampão fosfato para APF com GRBA e GRPA , respectivamente	85
Figura 28 - Medidas de ligação ao DNA. Os gráficos mostram a titulação de GRPA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência de CT-DNA (—) e na presença de quantidades crescentes de CT-DNA monitorada por espectroscopia de absorção eletrônica (A), gráfico de $(\epsilon_a - \epsilon_f) / (\epsilon_b - \epsilon_f)$ vs [DNA] (B) em Tris-HCl 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 a 25°C	87
Figura 29 - Espectro de absorção eletrônica do complexo GRBA na ausência de CT-DNA e na presença de quantidades diferentes de CT-DNA em tampão 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4	88
Figura 30 - Espectro de emissão do complexo GRPA 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]	90

Figura 31 - Espectro de emissão do complexo GRBA na ausência de CT DNA (—) e na presença de quantidades crescentes de CT DNA em tampão Tris-HCl pH 7,5.....	90
Figura 32 - Espectro de fluorescência de BE (—) ($\lambda_{exc} = 480$ nm) na presença de CT-DNA (—) a crescentes concentrações de complexo metálico GRPA (0 - 11,57 μM) em tampão Tris-HCl pH 7,5. [BE] = 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [DNA]= 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inset: Gráfico I_0/I x [complexo]	91
Figura 33 - Espectro de emissão do Verde de Metila (—) na presença de CT-DNA (—) em diferentes concentrações de complexo (0-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), GRPA (A) e GRBA (B). [Methyl Green] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [CT DNA] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{exc}=340$ nm	93
Figura 34 - Espectro de emissão do Hoechst (—) na presença do CT-DNA (—) em diferentes concentrações dos complexos (0-28 $\mu\text{mol L}^{-1}$), GRPA (A) e GRBA (B). [Hoechst] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and [CT DNA] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{exc}=340$ nm	94
Figura 35 - Representação esquemática das três diferentes formas das moléculas de DNA plasmidial: Forma I (superenovelado), Forma II (circular) e Forma III (linear).	95
Figura 36 - Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 μM) na presença do complexo GRPA 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: 0,5; 1; 3; 5; 7 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente	96
Figura 37 - Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 μM) na presença dos complexos GRBA 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: 0,5; 1; 3; 5; 7 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente	96
Figura 38 - Supressão de ERO em um ensaio de fotoclivagem usando DNA pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de GRPA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após 1 h de irradiação com LED azul e com supressores de radicais. Poço 1: apenas DNA linear (ladder,	

1). Poço 2: apenas DNA pBR322. Poço 3: DNA + complexos no escuro. Poço 4: DNA + complexos com irradiação de luz azul. Outros poços 5 – 8: DNA pBR322 + GRPA + supressor: piruvato (5), histidina (6), D-manitol (7) e tiron (8), respectivamente.	98
Figura 39 - Interação dos complexos metálicos com o DNA investigada por dicroísmo circular. Em A mostra os espectros de CD apenas do CT-DNA (linha preta, a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do complexo GRPA ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$), e misturas de DNA e complexo metálico nas concentrações de 2, 5, 7, 10, 15, 20 e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha cinza). Em B mostra os espectros de CD do CT-DNA (linha preta) e do complexo metálico GRBA ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) e as misturas de DNA e deste complexo metálico, conforme especificado acima. O espectro de CD apenas dos complexos é visto na linha vermelha.	100
Figura 40 - Espectro de dicroísmo circular do Poli-AT ($10 \mu\text{M}$) na presença dos complexos GRPA (a) e GRBA (b) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{M}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.4.	101
Figura 41 - Espectro de dicroísmo circular do 3WJ ($10 \mu\text{M}$) na presença dos complexos GRPA (a) e GRBA (b) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{M}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.4	103
Figura 42 - Espectro de dicroísmo circular do <i>i-motif</i> ($10 \mu\text{M}$) na presença dos complexos GRBA (A) e GRPA (B) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{M}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4	104
Figura 43 - Espectro de dicroísmo circular do <i>i-motif</i> ($10 \mu\text{M}$) na presença dos complexos GRBA (A) e GRPA (B) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{M}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 5.4	105
Figura 44 - Espectros de Dicroísmo Circular do GRPA ($0 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA G-quadruplex hif-1 α (A), vegf (B), EGFR (C), bcl2 (D), c-myc (E), c-kit (F), kras (G), trombina (H) ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão tris-HCl 10 mmol L $^{-1}$ pH 7,4.	107
Figura 45 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA G-quadurplex hTel ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do complexo GRPA (A) e GRBA (B) ($0 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão tris-HCl 10 mmol L $^{-1}$ pH 7,4	109

- Figura 46 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com o complexo **GRPA** (A) e **GRBA** (B) (0 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4). 110
- Figura 47 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA mosR (A), ndhA (B) e ERB1 (C) (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do complexo **GRPA** (0 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4). 111
- Figura 48 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4) na ausência dos cátions (linha preta) e na presença de K^+ (linha vermelha) e Na^+ (linha verde). 112
- Figura 49 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (A) e **GRBA** (B) (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4), KCl 100 mmol L^{-1} , EDTA 0,1 mmol L^{-1} 113
- Figura 50 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4) na ausência dos cátions (linha preta) e na presença de K^+ (linha vermelha) e Na^+ (linha verde) 114
- Figura 51 - Espectros de Dicroísmo Circular do DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (A) e **GRBA** (B) (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4), KCl 100 mmol L^{-1} , EDTA 0,1 mmol L^{-1} 115
- Figura 52 - Espectros de Dicroísmo Circular do complexo **GRPA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4). Tempo de irradiação= 10 minutos. led azul 116
- Figura 53 - Espectros de dicroísmo circular do complexo **GRBA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4). Tempo de irradiação= 10 minutos. Led azul. 117
- Figura 54 - Espectros de Dicroísmo Circular do complexo **GRPA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4), KCl 100 mmol L^{-1} e EDTA 0,1mmol L^{-1} . Tempo de irradiação = 10 minutos. led azul. 118

Figura 55 - Medidas de fusão de hTel (A), 22AG (B) e ds-match (C) na ausência (linha preta) e na presença dos complexos GRPA (linha vermelha) e GRBA (linha verde)	119
Figura 56 - Curva de emissão dos complexos GRPA (A) e GRBA (B) ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de DNA duplex (ds-match) e G-quadruplex (22AG e hTel), até a saturação, em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} na ausência e presença de K^+ (100 mmol L^{-1} KCl)	121
Figura 57 - Gráfico de barras de emissão do complexo GRPA ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e GRBA (B) com DNA duplex (ds-match) e G-quadruplex (22AG e hTel) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} na ausência e presença do cátion K^+ (100 mmol L^{-1} KCl)	122
Figura 58 - Efeito do complexo GRPA sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	132
Figura 59{ - Efeito do complexo GRBA sobre biofilmes de <i>S.aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	133
Figura 60 - Efeito do complexo GRPA sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> e <i>S.epidermidis</i>	134
Figura 61 - Efeito do complexo GRBA sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> e <i>S.epidermidis</i>	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bandas mais relevantes dos ligantes e complexos metálicos sintetizados medidos por espectroscopia vibracional na região do infravermelho	60
Tabela 2 - Transições eletrônicas na região do UV-vis para os complexos GRPA e GRBA em metanol.	61
Tabela 3 - Transições calculadas de estado singlete para o complexo GRPA e GRBA .	64
Tabela 4 - Rendimento quântico de emissão (Φ_{em}) e máximo de emissão (λ_{max} , nm) para GRPA e GRBA	69
Tabela 5 - Voltametria cíclica do GRPA e GRBA 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	71
Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN 1H e atribuições para o ligante livre (bpy-anth) e GRPA	73
Tabela 7 - Valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) sob irradiação de luz azul, verde e vermelha. (Para DPBF, $\lambda_{exc} = 410$ nm. Para SOSG, $\lambda_{exc} = 490$ nm).	81
Tabela 8 - Constantes de ligação ao DNA (K_b) para diferentes complexos metálicos de rutênio	88
Tabela 9 - Valores de T_m e ΔT_m dos complexos GRPA , GRBA e DNA	120
Tabela 10 - Valores de K_d ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para os complexos GRPA e GRBA com os G-quadruplexes hTel e 22AG na ausência e presença do cátion K^+	122
Tabela 11 - Valores de coeficientes de partição ($\log P$) para os compostos	125
Tabela 12 - Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas [valores em $\mu\text{g/mL}$ e em (μM)]	127
Tabela 13 - Efeito do GRPA associado com os antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) em <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	129
Tabela 14 - Efeito do GRBA associado com os antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) em <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	130

Tabela 15 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para os complexos **GRPA** e **GRBA** nas linhas celulares MDA-MB-231 (adenocarcinoma da mama humano triplo-negativo de fenótipo mesenquimal), A2780 (adenocarcinoma do ovário humano), A549 (adenocarcinoma de células basais do epitélio alveolar do pulmão humano) e MRC-5 (pulmão humano não tumoral) no escuro e após irradiação de luz (460 nm, 10 min, $10,8 \text{ J cm}^{-2}$) e 48 h de incubação 137

Tabela 16 - Índice de seletividade (SI) dos compostos metálicos na ausência de luz para diferentes linhagens de células tumorais através da razão $SI = IC_{50}(\text{MRC-5})/IC_{50}(\text{tumor cell})$ 138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
Abs	Absorbância
Anth	Grupo antracenil
BE	Brometo de Etídio
Bpy-anth	4' metil - <i>N</i> -(antracen-2-il) -[2,2'bipiridina]-4-carboxamida
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
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 tetrabutilâmônio
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
T_m	<i>Temperature melting</i> (Temperatura de fusão)
GRBA	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-anth})]^{2+}$
GRPA	$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-anth})]^{2+}$
TFD	Terapia Fotodinâmica
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máximo
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete
Φ_{em}	Rendimento quântico de emissão
Δ	Deformação angular
E	Coeficiente de Absortividade Molar

N	Estiramento ou deformação axial
<i>F</i>	Força do oscilador
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
TD-DFT	Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Câncer e bactérias.....	26
1.2	Alvos específicos.....	28
1.3	DNA G-quadruplex.....	29
1.4	G-quadruplex e Moléculas.....	32
1.5	Complexos de Rutênio.....	36
1.6	Terapia Fotodinâmica e complexos de rutênio.....	37
2	OBJETIVOS.....	42
2.1	Objetivo Geral.....	42
2.2	Objetivos Específicos.....	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1	Reagentes, solventes e soluções.....	43
3.2	Síntese dos ligantes.....	44
3.2.1	Síntese do ligante 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico (bpy-COOH)	44
3.2.2	Síntese do 4' metil -N-(antracen-2-il) -[2,2'bipiridina] – 4 – carboxamida (bpy-anth)	44
3.3	Síntese dos complexos metálicos.....	44
3.3.1	Síntese dos complexos precursores [Ru(bpy)₂Cl₂] e [Ru(phen)₂Cl₂].....	44
3.3.2	Síntese dos complexos [Ru(bpy)₂(bpy-ant)](PF₆)₂ e [Ru(phen)₂(bpy-ant)](PF₆)₂.....	45
3.4	Equipamentos e Técnicas experimentais.....	45
3.4.1	Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV-visível....	45
3.4.2	Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....	45
3.4.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	46
3.4.4	Modelagem Molecular – Cálculos quanto-mecânicos.....	46
3.4.5	Medidas eletroquímicas.....	46
3.4.6	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H.....	47
3.4.7	Espectroscopia de emissão.....	47
3.4.7.1	Rendimento quântico de geração de 1O₂.....	47

3.4.7.2	<i>Geração de radical hidroxila (OH•).....</i>	48
3.4.8	<i>Geração de Radical Superóxido (O2•-)</i>.....	48
3.4.9	<i>Interação com DNA.....</i>	49
3.4.9.1	<i>Titulação de DNA (monitorado por espectroscopia de absorção eletrônica).....</i>	49
3.4.9.2	<i>Titulação de DNA (Monitorado por luminescência).....</i>	49
3.4.9.3	<i>Titulação competitiva do DNA com Brometo de Etídio, Verde de Metila ou Hoechst.....</i>	50
3.4.9.4	<i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	50
3.4.10	<i>Dicroísmo Circular.....</i>	51
3.4.11	<i>Coeficiente de Partição (LogP).....</i>	52
3.4.12	<i>Ensaios Biológicos.....</i>	53
3.4.12.1	<i>Microorganismos, Linhagem celular e condições de cultura.....</i>	53
3.4.12.2	<i>Atividade antibacteriana.....</i>	54
3.4.12.3	<i>Efeito sinérgico.....</i>	54
3.4.12.4	<i>Ensaios sobre a formação do biofilme.....</i>	55
3.4.12.5	<i>Ensaios sobre a formação do biofilme pré-formados.....</i>	56
3.4.12.6	<i>Ensaio de Citotoxicidade.....</i>	56
3.4.12.7	<i>Determinação da viabilidade celular.....</i>	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	Caracterização de compostos.....	57
4.1.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....</i>	57
4.1.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.....</i>	60
4.1.3	<i>Luminescência.....</i>	67
4.1.4	<i>Voltametria Cíclica.....</i>	69
4.1.5	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H.....</i>	71
4.2	Estudo de Estabilidade.....	74
4.3	Estudo de geração de oxigênio singlete.....	77
4.4	Geração de radical superóxido.....	82
4.5	Geração de radical hidroxila.....	84
4.6	Estudo de interação com DNA.....	86

4.6.1	<i>Constante de ligação (K_b) DNA-complexo medida por espectroscopia de absorção eletrônica.....</i>	86
4.6.2	<i>Constante de associação (K_b) DNA-Complexo metálico via espectroscopia de emissão.....</i>	88
4.6.3	<i>Competição com Brometo de Etídio.....</i>	91
4.6.4	<i>Competição com Verde de metila e Hoechst.....</i>	92
4.6.5	<i>Ensaios de dano ao DNA por eletroforese em gel de agarose.....</i>	94
4.7	<i>Estudos de interação com diversas sequências de DNA por Dicroísmo Circular.....</i>	99
4.7.1	<i>DNA duplex, Junctions e i-motif.....</i>	100
4.7.2	<i>DNA i-motif.....</i>	103
4.7.3	<i>DNA G-Quadruplex na ausência de cátions.....</i>	105
4.7.4	<i>DNA G-Quadruplex hTel e 22AG na presença dos cátions K⁺ e Na⁺.....</i>	111
4.7.5	<i>Efeito da irradiação de luz azul nos hTel e 22AG.....</i>	116
4.7.6	<i>Estudo de Estabilidade Térmica das Estruturas de DNA.....</i>	119
4.8	<i>Espectroscopia de Emissão (Complexos-DNA).....</i>	120
4.9	<i>Lipofilicidade.....</i>	123
4.10	<i>Ensaios biológicos.....</i>	125
4.10.1	<i>Ensaios de MIC e MBC em bactérias Gram positivas e negativas...</i>	125
4.10.2	<i>Sinergismo.....</i>	127
4.10.3	<i>Biofilme.....</i>	131
4.10.4	<i>Ensaios de Citotoxicidade.....</i>	136
5	CONCLUSÃO.....	140
	REFERÊNCIAS.....	142
	APÊNDICE A – ESPECTRO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS COMPOSTOS: BPY-ANTH (—) E BPY-COOH (—)	163
	APÊNDICE B – ESPECTRO ELETRÔNICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL DO COMPLEXO [Ru(bpy)₂Cl₂] EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO DE 2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹	164

APÊNDICE C – ESPECTRO ELETRÔNICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL DO COMPLEXO [Ru(phen) ₂ Cl ₂] EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO DE 2 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	165
APÊNDICE D – SUPERFÍCIES DE CONTORNO DOS ORBITAIS MOLECULARES DO COMPLEXO GRBA CALCULADOS POR TD-DFT	166
APÊNDICE E – CONTRIBUIÇÕES DOS ORBITAIS MOLECULARES DA ESPÉCIE GRBA EM FUNÇÃO DE SEUS FRAGMENTOS: RU (—), BPY (—) E BPY-ANTH (—) ...	167
APÊNDICE F – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO COMPLEXO PRECURSOR [Ru(bpy) ₂ Cl 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	168
APÊNDICE G – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO COMPLEXO PRECURSOR [Ru(phen) ₂ Cl 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	169
APÊNDICE H – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ¹ H PARA O LIGANTE BPY-ANTH EM DMSO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHZ	170
APÊNDICE I – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ¹ H PARA O COMPLEXO GRBA EM DMSO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz	171

APÊNDICE J - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H BIDIMENSIONAL COSY PARA O COMPLEXO GRPA EM DMSO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz	172
APÊNDICE K - ESTUDO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO GRBA MONITORADO POR HPLC POR 48h, COM INJEÇÕES DE 10 μL EM FASE MÓVEL EM 15% ACETONITRILE E 85% NATFA A 0,1%	173
APÊNDICE L - ESTUDO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO GRBA MONITORADO POR HPLC DURANTE 1h IRRADIADO COM LUZ AZUL (A), COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ (B) E COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mbpy-COOH})]^{2+}$ (C) EM UMA FASE MÓVEL DE 15% ACETONITRILA E 85% NATFA A 0,1%	174
APÊNDICE M - ESTUDO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO GRPA MONITORADO POR HPLC DURANTE 1 HORA IRRADIADO COM LUZ AZUL (A), COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ (B) E COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{mbpy-COOH})]^{2+}$ (C) EM UMA FASE MÓVEL DE 15% ACETONITRILA E 85% NATFA A 0,1%	175
APÊNDICE N - 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) GRPA E (D) GRBA, EM CONCENTRAÇÃO DE 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EM METANOL. FENDAS: 0,3 mm, $\lambda_{\text{EXC}} = 410$ nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO = 5 s. AMOSTRA IRRADIADA EX SITU USANDO LED AZUL ..	176
APÊNDICE O - ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE ROSA BENGALA; (C) GRPA; (D) GRBA, NA CONCENTRAÇÃO DE 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EM METANOL. FENDAS: 0,3 mm, $\lambda_{\text{EXC}} = 410$ nm E EMISSÃO DE 420-550 nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 15 s. AMOSTRA IRRADIADA EX SITU USANDO LED VERDE	177

APÊNDICE P – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE AZUL DE METILENO; (C) GRPA; (D) GRBA, NA CONCENTRAÇÃO DE 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EM METANOL. FENDAS:0,3 mm, $\lambda_{\text{EXC}}= 410 \text{ nm}$ E EMISSÃO DE 420-550 nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 2 min. AMOSTRA IRRADIADA <i>EX SITU</i> USANDO LED VERMELHO	178
APÊNDICE Q – ESTUDO DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EMPREGANDO NBT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) COM GRBA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) OU GRPA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B), NBT COM APENAS GSH (1,5 mmol L^{-1}) (C) E O GRÁFICO DE ABS_{590} X TEMPO DOS COMPLEXOS GRPA E GRBA (D), TODOS COM IRRADIAÇÃO DE LUZ AZUL	179
APÊNDICE R – FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DE GRBA (5 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) APÓS 1 H DE IRRADIAÇÃO COM LED AZUL NA PRESENÇA DE SEQUESTRADORES DE RADICAIS. POÇO 1: APENAS DNA PBR322 COM IRRADIAÇÃO AZUL. POÇO 2: DNA + COMPLEXOS NO ESCURO. POÇO 3: DNA + COMPLEXOS COM IRRADIAÇÃO DE LUZ AZUL. POÇOS 4 – 7: DNA PBR322 + GRBA + SUPRESSORES PIRUVATO (4), HISTIDINA (5), D-MANITOL (6) E TIRON (7), RESPECTIVAMENTE	180
APÊNDICE S – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO POLY GC (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L^{-1} pH 7,4	181
APÊNDICE T – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DS-MATCH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L^{-1} pH 7,4	182

APÊNDICE U – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DS-MISMATCH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4	183
APÊNDICE V – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DS-CRUCIFORM (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4	184
APÊNDICE W – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO 4WJ (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4	185
APÊNDICE X – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO GRPA (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO DNA G- QUADURPLEX HIF-1A (A), VEGF (B), EGFR (C), BCL2 (D), C-MYC (E), C-KIT (F), KRAS (G), TROMBINA (H) (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4	186
APÊNDICE Y – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DNA MOSR (A), NDHA (B) E ERB1 (C) (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO COMPLEXO GRBA (0 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4)	187
APÊNDICE Z – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DNA HTEL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10mmol L⁻¹ (pH 7,4), NaCl 100 mmol L⁻¹, EDTA 0,1 mmol L⁻¹	188

APÊNDICE AA – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L$^{-1}$ (pH 7,4), NaCl 100 mmol L$^{-1}$, EDTA 0,1 mmol L$^{-1}$	189
APÊNDICE AB – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO COMPLEXO GRBA NA PRESENÇA DO DNA mosR (A), EBR1 (B) E ndhA (C) (20 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) E DO COMPLEXO GRPA NA PRESENÇA DO DNA mosR (D), EBR1 (E) E ndhA (F) (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L$^{-1}$ (pH 7,4), KCl 100 mmol L$^{-1}$ E EDTA 0,1 mmol L$^{-1}$	190
APÊNDICE AC – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO COMPLEXO GRBA (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO DNA HTEL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) E DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L$^{-1}$ (pH 7,4), KCl 100 mmol L$^{-1}$ E EDTA 0,1 mmol L$^{-1}$. TEMPO DE IRRADIAÇÃO = 10 min. LED AZUL	191
APÊNDICE AD – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO COMPLEXO GRPA (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO DNA HTEL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A), DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) E DO COMPLEXO GRBA COM DNA HTEL (C), DNA 22AG (D) EM TAMPÃO TRIS-HCL 10 mmol L$^{-1}$ (pH 7,4), NaCl 100 mmol L$^{-1}$ E EDTA 0,1 mmol L$^{-1}$. TEMPO DE IRRADIAÇÃO = 10 min. LED AZUL	192
APÊNDICE AE – PRODUTOS ORIUNDOS DA TESE	193

1 INTRODUÇÃO

1.1. Câncer e Bactérias

Câncer é o termo que envolve mais de 100 tipos de doenças que correspondem aos vários tipos de células existentes do corpo, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anômalas e agressivas no organismo, que ocorre devido a mutações genéticas acumuladas, falhas nos mecanismos de reparo celular e desregulação do processo de apoptose.¹ O desenvolvimento de células cancerosas envolve processos que incluem proliferação excessiva e invasão de tecidos, podendo levar à formação de metástases, em que as células se espalham para outras partes do corpo, comprometendo múltiplos órgãos. Entre os fatores de riscos para o câncer estão a predisposição genética, o tabagismo, a exposição a agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos), estilo e hábitos de vida, exposição à radiação ionizante, dentre outros.

O câncer é responsável por uma parte significativa da morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento, trazendo também problemas econômicos para a saúde pública. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), surgiram cerca de 20 milhões de novos casos de câncer levando a, aproximadamente, 10 milhões de mortes em 2020, sendo as formas mais incidentes o câncer de pele não-melanoma, pulmão, colorretal e mama. Esses números são alarmantes e refletem a necessidade urgente de desenvolver novas terapias que sejam mais eficazes e seletivas.²

O tratamento é realizado por meio de diversas abordagens, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea. Recentemente, terapias mais avançadas, como o uso de anticorpos monoclonais, viroterapia e agentes antiangiogênicos,³ têm sido introduzidas para ampliar as opções de combate à doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, complexos metálicos surgem como candidatos promissores na busca por novos fármacos antineoplásicos, especialmente devido ao seu potencial uso na terapia fotodinâmica. Alguns destes compostos possuem propriedades fotoquímicas e fotofísicas que os tornam atraentes como fotossensibilizadores, uma vez que podem ser ativados de maneira controlada através da exposição à luz visível em comprimentos de onda específicos, sendo utilizados na Terapia Fotodinâmica (TFD). Esse efeito ocorre quando o fotossensibilizador, ativado pela luz, gera espécies reativas de oxigênio (ERO) no ambiente tumoral, resultando em danos celulares oxidativos que promovem a morte das células.⁴ Assim, o desenvolvimento de

fotossensibilizadores com alta seletividade para células cancerosas, como complexos metálicos, tem se mostrado uma estratégia com potencial no tratamento destas doenças.

As infecções bacterianas também representam um desafio global significativo, sendo responsáveis por elevado número de casos e mortes anuais, principalmente devido a patógenos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas, caracterizadas por uma parede celular espessa composta por peptidoglicano e incluem patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Estas espécies são frequentemente associadas a infecções nosocomiais e têm capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, tornando-se altamente resistentes ao tratamento antibacteriano. A *Staphylococcus aureus*, em especial, é uma das bactérias Gram-positivas mais preocupantes, devido à sua resistência a múltiplos antibióticos, incluindo a meticilina.^{5,6} Essa resistência têm contribuído para sua associação com ampla gama de infecções, desde infecções de pele e tecidos moles até infecções invasivas graves, como pneumonia e bacteremia, que podem ser fatais. Estudos mostram que aproximadamente 20% das infecções hospitalares são causadas por MRSA (*Staphylococcus Aureus* resistente à meticilina), representando uma taxa de mortalidade significativa e representando um problema crítico de saúde pública. A *Staphylococcus epidermidis* é um dos principais patógenos responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde, particularmente em ambientes hospitalares e em pacientes com dispositivos médicos, como cateteres e próteses. Sua relevância no contexto de infecções hospitalares se deve principalmente à sua capacidade de formar biofilmes resistentes, especialmente em superfícies de materiais sintéticos, criando um ambiente que facilita sua sobrevivência e dificulta a ação dos agentes antimicrobianos.⁷ Estima-se que essa bactéria seja responsável por 30 a 40% das infecções de corrente sanguínea, as quais frequentemente se originam de biofilmes que se formam em cateteres venosos e se disseminam pela corrente sanguínea.^{7,8}

Essas infecções de corrente sanguínea são um grande desafio clínico, já que podem evoluir para quadros críticos, incluindo sepse, choque séptico e endocardite infecciosa.⁸ Com isso, têm-se a necessidade de estratégias de controle mais eficazes, incluindo o desenvolvimento de materiais antimicrobianos, terapias antibiofilme e novos agentes antimicrobianos que possam superar a resistência e prevenir a formação de biofilmes.⁹ Naturalmente, a associação de uma infecção bacteriana com um paciente de câncer é ainda mais preocupante devido à sua vulnerabilidade imunológica. Em muitos casos, esses pacientes apresentam um sistema imunológico enfraquecido por tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia, o que os torna mais suscetíveis a infecções agressivas. Infecções em pacientes com câncer frequentemente envolvem bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, dificultando o tratamento convencional

e exigindo estratégias terapêuticas inovadoras que possam controlar a infecção sem comprometer ainda mais a saúde do paciente.

1.2 Alvos específicos

O DNA de dupla fita (duplex) é um alvo terapêutico de grande relevância para o desenvolvimento de agentes anticâncer e tratamento de outras doenças, devido à sua estrutura helicoidal que apresenta regiões de sulco maior e sulco menor. Essa estrutura desempenha papel importante na replicação do material genético permitindo que cada fita sirva de molde para a síntese de uma nova cadeia complementar.¹⁰ O DNA duplex não é uma estrutura estável, o qual apresenta outras conformações estruturais, as formas A, B e Z.¹¹ A forma B é a conformação mais comum em condições fisiológicas e apresenta a hélice direita.¹²

O DNA duplex se torna alvo para uma variedade de compostos antitumorais, que exploram essa estrutura para induzir alterações genéticas, levar à morte celular ou inibir a proliferação de células tumorais. Dentre os principais agentes terapêuticos que atuam sobre o DNA duplex estão a cisplatina, seus derivados e os intercaladores de DNA,^{13,14} ambos com mecanismos de ação distintos que têm sido amplamente utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer.

A cisplatina é um composto de coordenação utilizado no tratamento de cânceres que interage com o DNA duplex através da formação de ligações covalentes com bases nitrogenadas, gerando pontes que distorcem a hélice e bloqueiam a transcrição e replicação celular.^{13,15} Essa interação é eficaz, mas limitada devido a falta de seletividade a célula tumoral e a resistência desenvolvida por alguns tipos de câncer.

Os intercaladores de DNA atuam por um mecanismo diferente. Esses compostos, geralmente aromáticos e planos (sistemas π estendidos), se inserem entre as bases nitrogenadas do DNA, estabilizando-o pela formação de interações de empilhamento π com as bases.¹⁴ Um exemplo é a doxorrubicina que atua inibindo a topoisomerase II e bloqueando o processo de replicação e transcrição, provocando morte celular.¹⁶ Além disso, o DNA duplex pode atuar como referência para a especificidade de novos agentes terapêuticos, como nos estudos que compararam a seletividade de interações entre DNA duplex e DNA G-quadruplex.

Estruturas não canônicas de DNA, como os G-quadruplexes, têm ganhado destaque como alvos terapêuticos promissores nos últimos anos devido à sua capacidade de modular processos celulares específicos.

O DNA G-quadruplex é um alvo terapêutico visto que essas estruturas são comumente encontradas em regiões genômicas de importância biológica, como os telômeros, promotores de oncogenes e podem causar instabilidade no genoma.¹⁷ Nos telômeros, o G-quadruplex regula a atividade da telomerase, uma enzima altamente ativa em células cancerosas que contribui para a imortalidade celular e multiplicação desordenada. A estabilização do G-quadruplex telomérico inibe a telomerase, promovendo a senescência ou apoptose das células tumorais, uma estratégia promissora para o tratamento de câncer.^{18,19}

Além disso, os G-quadruplexes presentes nos promotores de genes oncogênicos, têm demonstrado capacidade de regular a transcrição gênica. A indução e estabilização de G-quadruplexes nesses locais impedem a progressão da transcrição, inibindo a expressão dos oncogenes e, consequentemente, reduzindo a proliferação celular.^{20,21} Esse mecanismo seletivo de atuação sobre os G-quadruplexes em oncogenes torna-os alvos terapêuticos específicos.

O desenvolvimento de moléculas seletivas para G-quadruplexes visa potencializar essa abordagem terapêutica, uma vez que o design de moléculas pode ser realizado para reconhecer, se ligar e estabilizar G-quadruplexes do que ao DNA duplex. Essas moléculas são especialmente desenvolvidos para favorecer a formação e estabilização de G-quadruplexes, destacando-se como moduladores conformacionais que podem induzir a formação e transição de conformações. Dessa forma, há um interesse crescente na síntese de complexos metálicos e compostos orgânicos que possam interagir preferencialmente com os G-quadruplexes e, assim, direcionar suas ações terapêuticas.

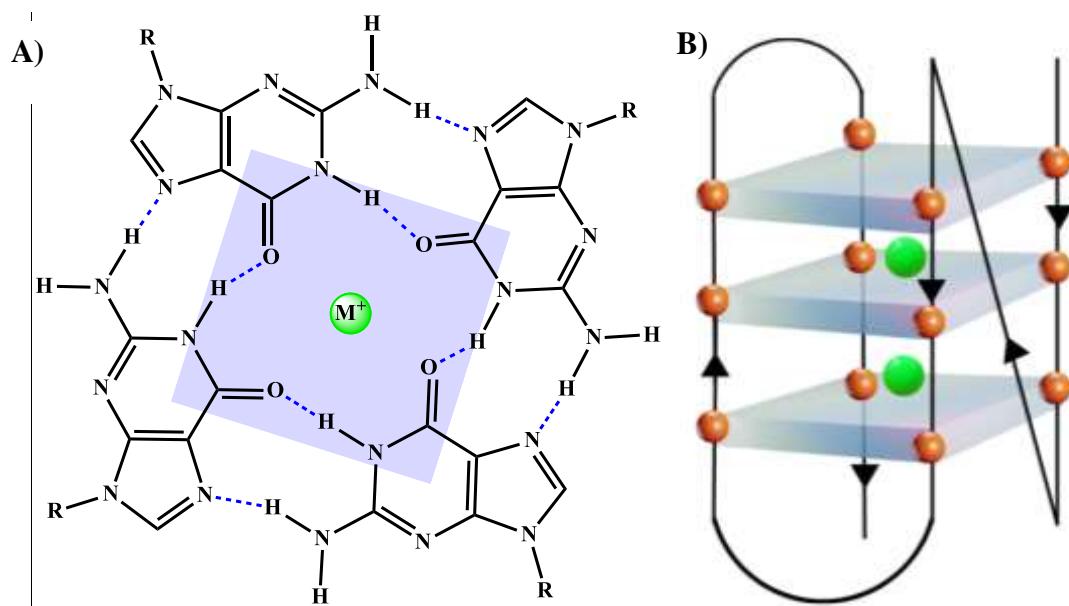
Assim, enquanto o DNA duplex continua a ser um alvo terapêutico fundamental para muitos agentes antitumorais, o DNA G-quadruplex oferece uma via mais seletiva e com potencial para o tratamento de câncer e outras doenças.

1.3 DNA G-quadruplex

Entre os alvos de interesse no tratamento do câncer e outras doenças, inclusive bacterianas, as estruturas não canônicas de DNA, em particular do tipo G-quadruplex, têm ganhado destaque devido ao seu importante papel em vários processos biológicos. Essas estruturas não canônicas são formadas por sequências ricas em guanina, em que ocorre o emparelhamento de quatro bases de guaninas, formando os G-quartetos ou G-tétrades na região interna através de ligações de hidrogênio específicas chamadas de ligações de Hoogsteen (Figura 1A). Os G-tétrades se empilham em uma configuração estável (Figura 1B),

possibilitando a sua formação sob condições fisiológicas de várias camadas de G-tétrades que podem adotar diversas conformações.^{22,23}

Figura 1 – G-tétrade formado por quatro guaninas através da ligação de hidrogênio de Hoogsteen (linha tracejada azul) (A) e estrutura do DNA G-quadruplex intramolecular com três G-tétrades na conformação Híbrida (B). O símbolo M^+ representa um metal alcalino estabilizando a estrutura.

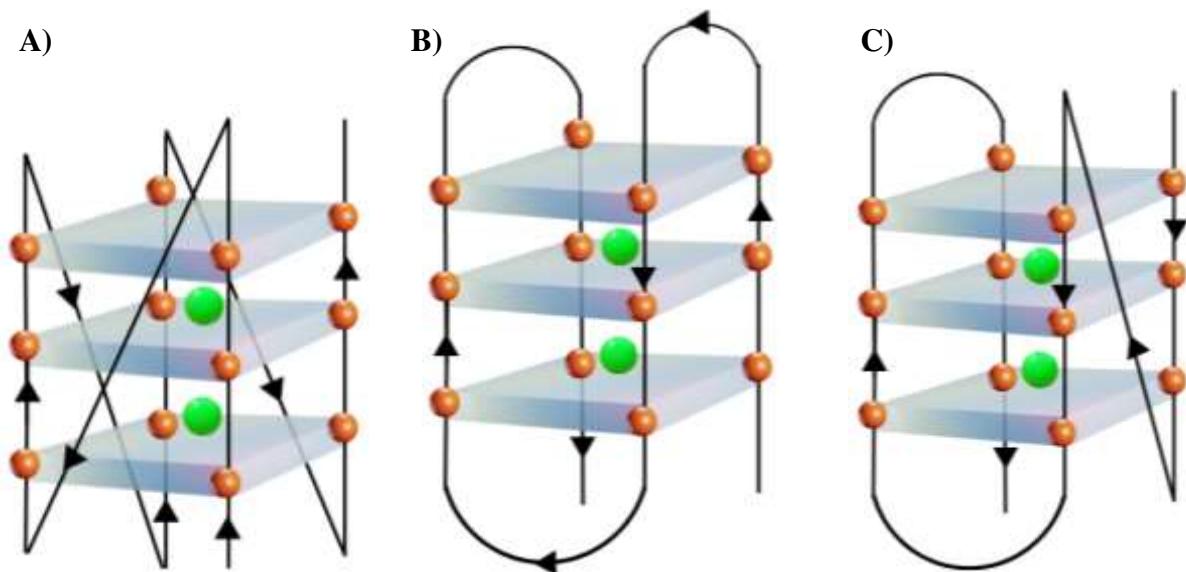


Fonte: Elaborada pelo autor

A topologia dessas conformações é fortemente influenciada pelos *loops* presentes na região mais externa da estrutura, os quais ligam os G-tétrades. Esses *loops* são fundamentais para a variedade conformacional dos G-quadruplexes possuindo papel importante na especificidade de reconhecimento por ligantes distintos.²⁴ As conformações de G-quadruplex podem ser variáveis, sendo classificadas em intramoleculares e intermoleculares. Nas conformações intramoleculares, uma fita de DNA rica em guanina se dobra sobre si mesma para formar a estrutura G-quadruplex. As conformações intermoleculares resultam da interação entre duas ou mais fitas de DNA, formando estruturas complexas.²⁵ As topologias de G-quadruplex são determinadas pela orientação das fitas de DNA e pelos loops que ligam os G-tétrades, resultando em conformações paralelas, antiparalelas e híbridas (Figura 2). A conformação paralela é caracterizada pela orientação das fitas no mesmo sentido, enquanto as conformações antiparalelas têm fitas que se orientam em direções opostas, o que afeta a estabilidade e a interação com ligantes.

Essas estruturas são estabilizadas por cátions monovalentes, como potássio (K^+) ou sódio (Na^+), que se inserem nos espaços intercalados, no núcleo ou entre os G-tétrades, neutralizando as cargas negativas dos fosfatos na estrutura do DNA, estabilizando-o.²⁶ O K^+ tem uma afinidade maior para estabilizar a estrutura, pois seu raio iônico permite uma maior interação com o arranjo dos G-tétrades.

Figura 2 – Conformação do DNA G-quadruplex intermolecular: paralela (A), antiparalela (B) e Híbrida (C).



Fonte: Elaborada pelo autor

Regiões ricas em guanina capazes de formar G-quadruplexes foram identificadas em locais genômicos de grande relevância biológica, como nos telômeros e em promotores de genes oncogênicos, como c-kit,²⁷ bcl2,²⁸ kras,²⁹ vegf,³⁰ c-myc, hif-1 α ,³¹ dentre outros, no qual estão associados a diversos câncer como pulmão, mama, ovário, pâncreas.

Nos telômeros, que são as extremidades repetitivas que protegem os cromossomos, os G-quadruplexes desempenham função na regulação da atividade da telomerase, enzima responsável por manter a integridade telomérica. A telomerase é altamente ativa em células cancerosas, permitindo replicação celular infinita. A estabilização dos G-quadruplexes em regiões teloméricas pode inibir a ação da telomerase, resultando na senescência ou apoptose celular.³² Além disso, DNA do tipo G-quadruplex está envolvido em outros processos celulares inibindo replicação do DNA,³³ na transcrição modeulando a expressão gênica e aumentando instabilidade do genoma, contribuindo para eventos de recombinação e mutagênese em determinadas condições celulares..^{34,35} A sequência 22AG, derivada do telômero humano,³⁶ é

conhecida por formar G-quadruplexes em células cancerosas. Essa sequência é capaz de formar estruturas G-quadruplex no organismo e está associada à regulação da atividade telomérica. A inibição da telomerase pela estabilização de G-quadruplexes em telômeros é considerada uma abordagem promissora no tratamento do câncer. Além dos telômeros, os G-quadruplexes localizados em promotores de genes oncogênicos podem controlar a expressão desses genes. A formação de G-quadruplexes nos promotores de oncogenes pode suprimir a transcrição, o que reforça o potencial dessas estruturas como alvos terapêuticos.

A sequência hTel tem sido associada a leishmaniose, doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* que pode se manifestar nas formas cutânea, mucocutânea ou visceral, sendo esta última a mais grave.³⁷ O G-quadruplex pode regular a expressão de genes envolvidos na sobrevivência e virulência dos patógenos, tornando-os alvos para o desenvolvimento de novas terapias. Assim, o G-quadruplex, com sua capacidade de modular processos biológicos essenciais, como a replicação telomérica e a transcrição de oncogenes, surge como um alvo terapêutico promissor. Além disso, essa mesma sequência está relacionada aos telômeros, uma região terminal dos cromossomos essencial para a estabilidade genética e a regulação da replicação celular.

Essas estruturas são, portanto, alvos promissores para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, através da interferência em processos celulares ou pela modulação da expressão gênica. A variedade de conformações e o papel dos G-quadruplexes em processos biológicos fazem deles alvos estratégicos tanto para estudos básicos quanto para o planejamento de sítios-alvos para fármacos inovadores que visam a modulação de suas propriedades estruturais.

1.4 G-quadruplex e Moléculas

Diante do papel dos G-quadruplexes na regulação da expressão gênica e na manutenção da estabilidade genômica, surge o interesse no desenvolvimento de moléculas que possam interagir seletivamente com essas estruturas, que vem ganhando destaque nas pesquisas biomédica.^{17,38,39} Ligantes capazes de estabilizar os G-quadruplexes podem interferir em processos biológicos celulares importantes, como a atividade da telomerase e a transcrição de oncogenes.⁴⁰ Além disso, a estabilização dos G-quadruplexes em regiões promotoras pode alterar a expressão de genes essenciais, promovendo, inclusive, a morte celular.

Compostos orgânicos têm sido estudados por sua capacidade de interagir com DNA G-quadruplex. A porfirina catiônica TMPyP4, por exemplo, é um estabilizador eficaz de G-

quadruplexes e inibe tanto a atividade da telomerase quanto a expressão do oncogenes como c-myc⁴¹ e kras.⁴² Além disso, a TMPyP4 demonstrou estabilizar estruturas do tipo G-quadruplex encontrada no genoma do vírus da hepatite B,⁴³ mostrando seu potencial em diferentes contextos patológicos. A seletividade dos derivados de porfirina para G-quadruplex em relação ao DNA duplex reforça sua potencial aplicação.⁴⁴

Outro interessante exemplo é o BRACO-19,⁴⁵ um ligante conhecido por sua alta afinidade e capacidade de estabilizar estruturas do tipo G-quadruplexes, alterando sua conformação e aumentando a resistência térmica dessas estruturas secundárias. Ao estabilizar o G-quadruplex, este ligante inibe a ação de proteínas essenciais como a telomerase, limitando o alongamento dos telômeros e consequente proliferação celular. Os derivados de naftaleno diimida, MM41 e CM03, também são exemplos de ligantes estabilizadores de G-quadruplex atuando em regiões teloméricas e promotoras de oncogenes, como HSP90, bcl2 e kras. A estabilização de sequências específicas do DNA do tipo G-quadruplex nessas regiões, resulta em uma repressão da transcrição desses genes, que são frequentemente superexpressos em vários tipos de câncer, como o câncer pancreático.^{46,47}

Complexos metálicos também têm ganhado visibilidade devido à sua capacidade de interação seletiva às estruturas secundárias não canônicas de DNA. Diversos complexos metálicos que possuem ligantes π-estendidos, por exemplo, podem interagir com as extremidades do DNA, mas também entre as G-tétrades, tornando-se seletivos. Isso permite que esses compostos sejam moldados com ligantes específicos, a fim de alcançar interações específicas com o alvo G-quadruplex.⁴⁸

Um exemplo desse tipo de sistema se trata do complexo $[\text{Ru}(\text{tatp})_2\text{ASC}](\text{PF}_6)_2$ (ASC = ascididemina, tatp = 1,4,8,9-tetra-aza-trifenileno), que interage fortemente e estabiliza o DNA G-quadruplex (hTel, c-myc e c-kit).⁴⁹ Outro complexo, $\Lambda\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{qdppz})]^{2+}$, sendo qdppz = 12,17-dihydronaphtho[2,3-h]dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine-12,17-dione, demonstrou capacidade de estabilizar o DNA quadruplex htel21 em uma conformação antiparalela.⁵⁰ O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dph})]^{2+}$, sendo dph = dipyrazino[2,3-a:2',3'-h]phenazine, mostrou alta seletividade para G-quadruplex em relação ao DNA duplex, atribuída a conjugação estendida do ligante dph, além de apresentar forte absorção de luz visível.⁵¹ Curiosamente, os complexos $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{dph})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{bpph})]^{2+}$, (sendo TAP = 1,4,5,8-tetraazafenantreno e bpph = benzo[apirazino[2,3-h]fenazina), exibem intensa absorção de luz visível e podem oxidar resíduos de guanina sob irradiação, além de se ligarem fortemente às estruturas de G-quadruplex da sequência telomérica humana $(\text{TTAGGG})_n$.⁵² O complexo $[\text{Ru}(\text{ip})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ip= 1H-iminazol [4,5-f][1,10] fenantrolina) foi capaz de

induzir e estabilizar a formação de G-quadruplex bcl2 de forma mais eficaz e induziu também a apoptose celular em ensaios *in vitro*.⁵³

A modulação das propriedades de metalocompostos através da introdução de ligantes relativamente simples é uma estratégia amplamente utilizada para melhorar características, como lipofilicidade, estabilidade e interação com alvos biológicos específicos.^{54,55} No contexto de interação com o DNA do tipo G-quadruplex, é comum que as moléculas possuam estruturas planares com sistemas π -estendidos, facilitando o empilhamento com os G-tétrades de guanina.⁵⁶ A estabilização do G-quadruplex por moléculas pequenas tem sido alvo de intensa investigação,⁵⁷ uma vez que as moléculas orgânicas identificadas para essa finalidade são significativamente grandes e trazem desafios adicionais na solubilidade e biodisponibilidade.

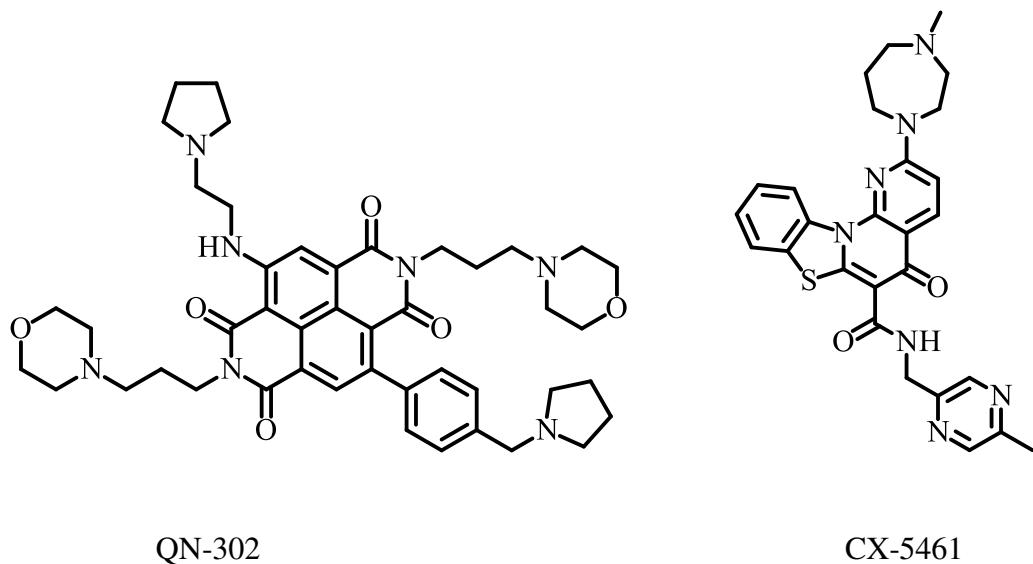
Ligantes aromáticos como 2,2'-bipiridinas e 1,10'-fenantrolinas metiladas podem melhorar a afinidade dos complexos metálicos por alvos celulares, incluindo o DNA.⁵⁸ Esses ligantes aromáticos apresentam capacidade de interação com o DNA por empilhamento π - π com as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, devido à sua estrutura planar e ao caráter π -conjugado. A metilação em posições específicas desses ligantes pode aumentar a lipofilicidade, modulando a permeabilidade em membranas celulares e afinidade com alvos intracelulares. Derivados de 1,10-fenantrolina têm demonstrado atividade anticâncer e antibacteriana significativas.⁵⁹ Estudos indicam que derivados deste ligante exibem uma afinidade marcadamente elevada pelo DNA G-quadruplex em relação ao DNA de dupla fita, com constantes de dissociação (K_d) entre 28 e 43 nmol L⁻¹ para o G-quadruplex c-kit, enquanto para o DNA duplex, os valores de K_d são acima de 1000 nmol L⁻¹ indicando seletividade.⁶⁰ Complexos contendo fenantrolinas mostraram maior afinidade e seletividade ao DNA do tipo G-quadruplex em comparação ao DNA de dupla fita.^{61,62} Além disso, compostos derivados de imidazo-fenantrolina demonstraram afinidade para G-quadruplex hTel, c-myc e c-kit com seletividade melhorada para o G-quadruplex frente ao DNA duplex.⁶³ Estudos sugerem que ligantes, como o phen-2 (2,9-bis(oxazol-5-il)-1,10-fenantrolina), podem induzir a formação de G-quadruplexes na conformação antiparalela para o G-quadruplex 22AG e inibir a atividade da telomerase. Além disso, podem estabilizar c-myc e 22AG com valores de ΔT_m de 30° e 10°, respectivamente.⁶⁴

Ligantes baseados em naftaleno, com sistemas π estendidos, também são promissores para a interação com o G-quadruplex. Sua estrutura aromática extensa permite um empilhamento π - π eficiente com as tetrades de guanina, promovendo maior estabilidade para o G-quadruplex. Esse efeito é ainda mais relevante em derivados como o naftaleno diimida, amplamente estudado como estabilizador de G-quadruplexes. O naftaleno diimida, por

exemplo, não só interage por empilhamento com o G-quadruplex, mas também apresenta uma forte capacidade de estabilizar essas estruturas em condições celulares, potencialmente bloqueando a ação da telomerase e dificultando a replicação de células tumorais.⁶⁵ Outro derivado de naftaleno diimida mostrou se ligar e estabilizar o DNA G-quadruplex LTR, demonstrando também atividade em células que reduziram a atividade do promotor LTR.⁶⁶

Apesar de ainda não existirem drogas aprovadas direcionadas especificamente para G-quadruplexes, atualmente, dois compostos têm mostrado progressos significativos em ensaios clínicos, refletindo o potencial do DNA G-quadruplex como alvo terapêutico. O QN-302 (Figura 3), composto de naftaleno diimida tetrasubstituído, desenvolvido pela Qualigen Therapeutics, está em fase I de ensaios clínicos para o tratamento de adenocarcinoma ductal pancreático, em que se liga fortemente aos G-quadruplexes, induzindo uma estabilização que resulta na inibição da transcrição de genes relacionados ao câncer nessas células.^{67,68} O CX-5461 (Figura 3), Cylene Pharmaceuticals, também em fase I, atua como inibidor da RNA polimerase I, interferindo na síntese de rRNA, com potencial terapêutico em cânceres hematológicos, também atua como um potente ligante e estabilizador de estruturas G-quadruplexes (G4), tanto in vitro quanto in vivo, promovendo o bloqueio das forquilhas de replicação do DNA.^{69,70}

Figura 3 – Estruturas dos compostos QN-302 e CX-5461.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses avanços reforçam o potencial dos G-quadruplexes como alvos terapêuticos no tratamento do câncer. No entanto, alguns desafios ainda precisam ser superados, como a

compreensão detalhada das interações desses ligantes com diferentes tipos de G-quadruplex, a seletividade dessas interações e o desenvolvimento de estratégias para a entrega eficiente desses compostos aos locais-alvo. Além disso, é necessário investigar como essas interações afetam a função biológica dos G-quadruplexes e as implicações dessas alterações para o tratamento de diferentes tipos de câncer.

1.5 Complexos de Rutênio

Complexos de rutênio têm se destacado como uma classe promissora de agentes terapêuticos devido a sua ampla gama de atividades biológicas, como propriedades anticancerígenas, antimicrobianas e antiparasitárias. Além disso, suas diversas propriedades estruturais e eletrônicas proporcionam estabilidade química e eletroquímica, permitindo interações específicas com o DNA duplex e G-quadruplex, fundamentais para seu mecanismo de ação biológica.⁷¹

Essas características, aliadas à possibilidade de modulação de suas propriedades fotoquímicas, tornam esses compostos ideais para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e fototerapêuticos. A geometria octaédrica do rutênio amplia a versatilidade espacial desses complexos, sua facilidade de troca de ligantes favorece modificações sintéticas que podem ser ajustadas para aplicações específicas. Essa variedade de interações faz dos complexos de rutênio agentes importantes no direcionamento terapêutico, no estudo de biopolímeros, como o DNA, e no desenvolvimento de novas terapias para o câncer e outras doenças. Além disso, a multifuncionalização dos seus complexos os torna capazes de participar de reações redox, estabilizar G-quadruplex, e gerar espécies reativas de oxigênio sob irradiação. Assim, esses aspectos os tornam adequados para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD).

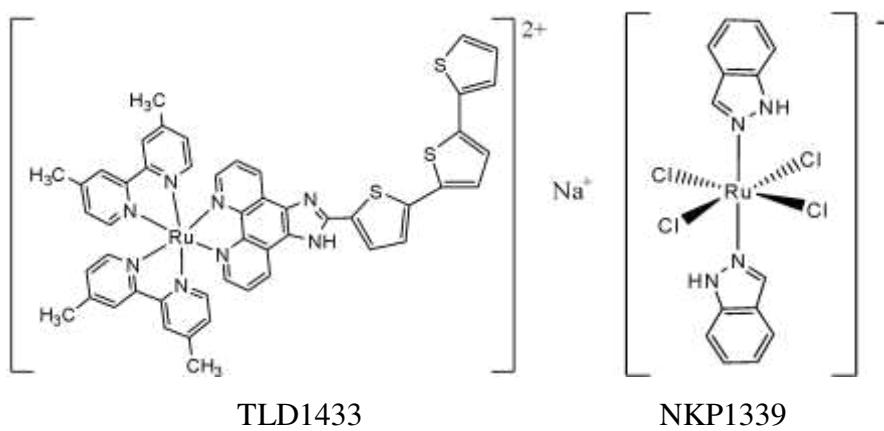
Dessa forma, tais compostos apresentam ampla aplicação, podendo ser usados em química supramolecular, nanomateriais, polímeros e combinados com biomoléculas. Também possuem potencial uso terapêutico contra agentes infecciosos, câncer e outras doenças.⁷² Esses compostos oferecem diferentes mecanismos de ação, combinando alvos distintos e variadas respostas biológicas.⁷³

Alguns complexos de rutênio podem emitir luz quando ligados às estruturas de DNA do tipo G-quadruplex, podendo agir como sonda luminescente,⁷⁴ enquanto outros podem funcionar como sistemas de estabilização ou desestabilização da conformação dos G-quadruplexes.⁵⁰ Complexos metálicos previamente estudados contendo o ligante fenazínico dppz (dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina) como $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ foram

explorados e evidenciaram propriedades de intercalação ao DNA duplex bem como interação com o DNA do tipo G-quadruplex, ainda que com pouca seletividade.^{75,76}

Atualmente dois complexos de rutênio, denominados NKP1339 (trans-[tetracloridobis(1H-indazol)rutenato(III)] de sódio) e TLD1433 (rac-[Ru(dmb)₂(IP-3T)]²⁺) (Figura 4), encontram-se em fases mais avançadas de testes clínicos, e exibem promissoras atividades antitumorais. O complexo TLD1433 se trata do primeiro fotossensibilizador de rutênio que entrou em ensaios clínicos, demonstrando alta fototoxicidade e fotoestabilidade sob irradiação.^{77,78} Por outro lado, o mecanismo de ação do complexo NKP1339 parece estar ligado à sua química redox, apesar do progresso nos ensaios clínicos, o estado de oxidação do rutênio *in vivo* permanece incerto.⁷⁹ Outro complexo que chamou atenção foi o NAMI-A, primeiro complexo de rutênio com potencialidades anticâncer a entrar em ensaios clínicos, o que contribuiu bastante no aumento do interesse em compostos metálicos anticâncer, porém estudos da combinação terapêutica de fase I/II com gentamicina em pacientes com câncer de pulmão não se mostraram promissores e esses estudos foram encerrados.⁸⁰ Convém mencionar que há ainda um significativo número de outros metalocompostos avançando em estudos pré-clínicos e clínicos no mundo.

Figura 4 - Estruturas químicas dos potenciais metalofármacos TLD1433 e NKP1339 de Rutênio.



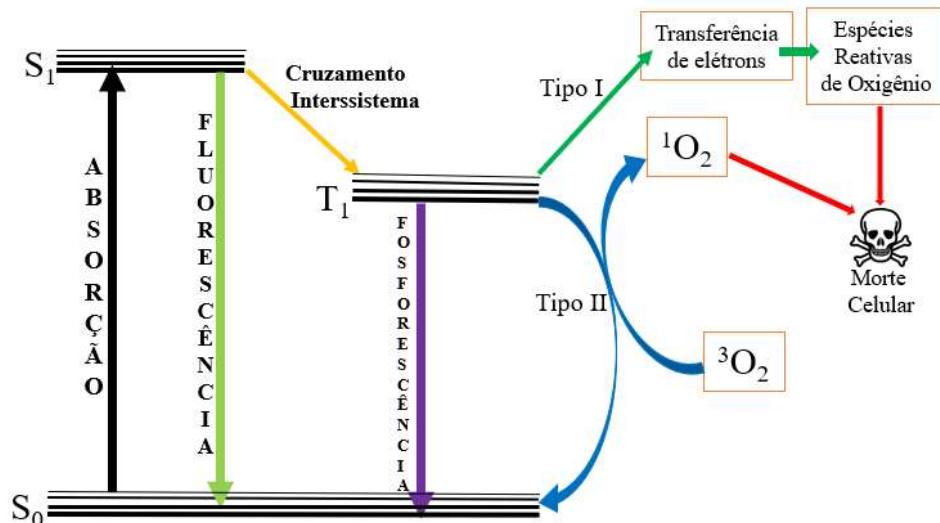
Fonte: Elaborada pelo autor.

1.6 Terapia Fotodinâmica e complexos de rutênio

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método relativamente novo para o tratamento de tumores, envolvendo a ativação seletiva de um medicamento fotossensível com luz em um

determinado comprimento de onda (janela terapêutica ≥ 600 nm e < 900 nm).^{77,81} O efeito fotodinâmico refere-se ao dano no tecido vivo na presença de um fotossensibilizador (PS) através de luz visível e oxigênio. A absorção de luz pelo PS resulta na população de um estado eletrônico excitado, PS^* . A TFD, que opera através de uma via dependente de oxigênio, é classificada atualmente como dois tipos: mecanismo do tipo I e mecanismo do tipo II. Assim, quando acessado o estado excitado S_1 pode ocorrer cruzamento intersistema e o estado de longa vida tripleto pode ser acessado. Neste estado, o sensibilizador interage (geralmente com tempo de vida longo, ms a μ s) com o substrato produzindo um radical ou um íon radical do sensibilizador e do substrato, sendo chamado de mecanismo do tipo I. No mecanismo do tipo II, a molécula transfere energia do estado excitado tripleto para o estado fundamental do oxigênio molecular, produzindo 1O_2 , que pode reagir diretamente com substratos para produzir espécies oxidadas (Figura 5). A interação do PS^* com o oxigênio molecular (3O_2) pode produzir oxigênio singlete (1O_2) ou espécies reativas de oxigênio (ERO), respectivamente, levando a dano celular irreparável e, portanto, a morte celular.⁸²

Figura 5 – Processos físico-químicos relacionados à TFD.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No contexto dos complexos de rutênio, a TFD surge como uma abordagem promissora para direcionar células tumorais ou patógenos de forma precisa e seletiva. Quando irradiados com luzes esses complexos podem gerar oxigênio singlete, uma espécie reativa altamente citotóxica, que pode induzir apoptose ou necrose nas células-alvo.⁸³ Além disso, a capacidade dos complexos de rutênio de interagir com G-quadruplexes e outras estruturas de DNA também pode ser aproveitada para aumentar a eficácia da TFD, combinando a fotoatividade com a modulação da expressão gênica, ampliando a eficácia terapêutica. A

geração de espécies reativas de oxigênio, após a interação de compostos com o DNA, pode resultar em danos oxidativos significativos em células cancerosas, promovendo a morte celular por diversos mecanismos. Um efeito do estresse oxidativo é a formação de lesões no DNA, podendo causar mutações específicas que podem comprometer a integridade do genoma e contribuir para a sua instabilidade. Entre os danos causados pelas ERO, tem-se a oxidação da guanina, que possui baixo potencial redox. Esse processo produz a 8-oxoguanina (8-oxoG), a qual poderia desestabilizar o empilhamento dos G-tétrades nos G-quadruplexes, por exemplo. Durante a replicação do DNA, a presença da 8-oxoG pode causar erros no pareamento aumentando as mutações, contribuindo para a progressão tumoral. Além disso, a presença de 8-oxoG no DNA do tipo G-quadruplex pode atuar como um modulador epigenético, influenciando a expressão gênica e a regulação da telomerase, influenciando a transcrição de genes associados à proliferação celular.^{84,85}

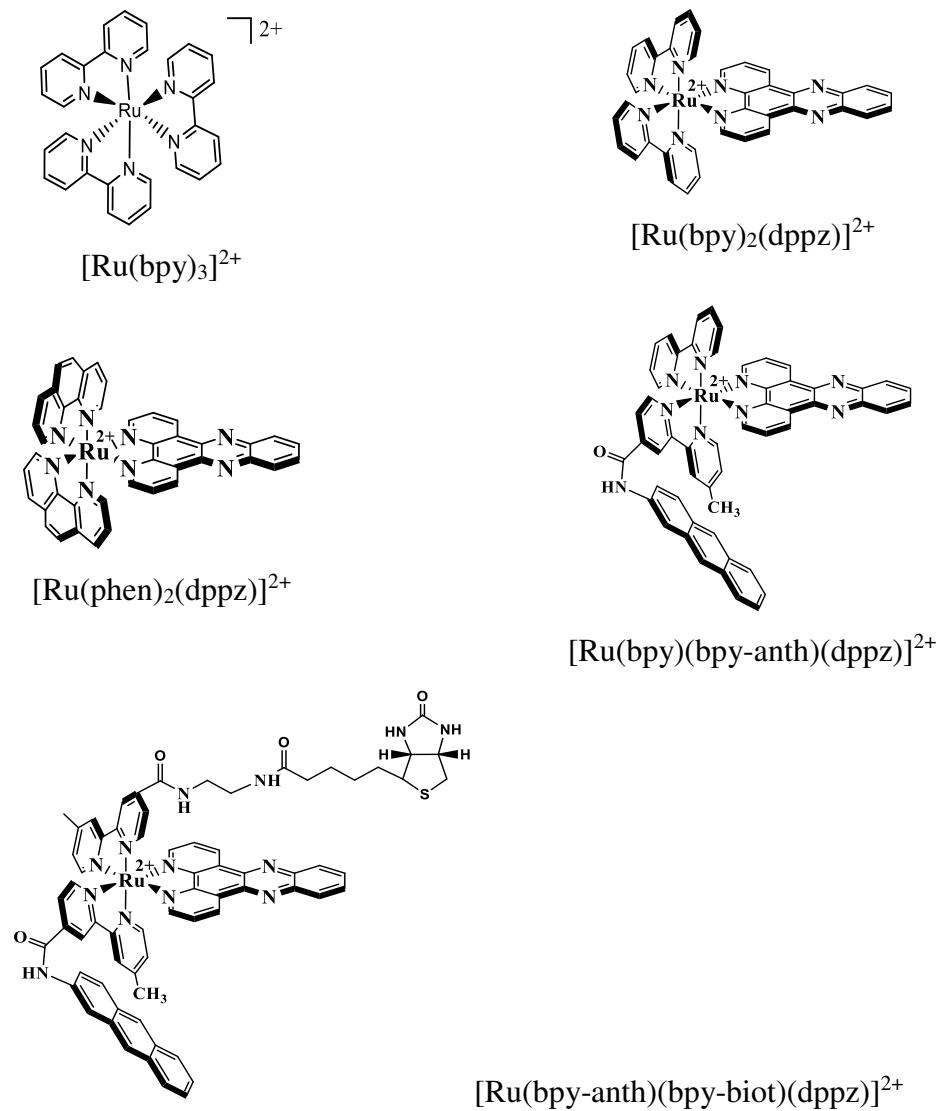
A química fotoredox do $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Figura 6) tem estimulado diversas investigações para o uso deste complexo como fotossensibilizador⁸⁶ através do mecanismo do tipo II, com eficiência de geração de oxigênio singlete (Φ_Δ) de 56% em acetonitrila e 22% em água.⁸⁷ Adicionalmente, suas propriedades espectroscópicas podem ser moduladas pela funcionalização dos ligantes bipiridínicos, podendo incluir grupos retiradores/doadores de elétrons a fim de ajustar propriedades de interesse.

A fotoprodução eficiente do $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ tem sido amplamente explorada, o que motivou o desenvolvimento de derivados para terapia fotodinâmica (TFD) e outros fins biológicos (por exemplo, CALI, *chromophore-assisted light inactivation*, inativação de alvos por luz mediada por cromóforo).⁷² Pesquisas mostraram que complexos de rutênio contendo ligantes com anéis fenazínicos, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ (Figura 6), que surgiram como um potente intercalador de DNA e com potencial terapêutico, mas que ainda assim mostrou baixa fotoprodução de ${}^1\text{O}_2$, sugerindo uma possível explicação para sua baixa atividade biológica.⁷³

No grupo de Bioinorgânica da UFC, Abreu e colaboradores sintetizaram um novo complexo, $[\text{Ru}(\text{bpy-anth})(\text{bpy})(\text{dppz})]^{2+}$ (Figura 6), cujos estudos da dinâmica de relaxação do estado excitado, mostraram que a modificação da bipiridina gerou um complexo bicromóforo, em que foi visto uma alta produção de ${}^1\text{O}_2$, o qual ainda mantinha grande afinidade de ligação ao DNA, proporcionada pelo ligante dppz. Além disso, promissores resultados biológicos frente às bactérias Gram-positivas foram obtidos, apesar de que nenhuma atividade anticâncer foi medida naquele momento.⁸⁸ Diante disso, Oliveira e colaboradores sintetizaram um composto similar, introduzindo uma segunda bipiridina modificada com biotina, $[\text{Ru}(\text{bpy-anth})(\text{bpy}-$

biot)(dppz)]²⁺ (Figura 6), conferindo maior citotoxicidade e seletividade ao complexo, demonstrando a promissora atividade frente às células que possuem receptores de biotina.⁸⁹

Figura 6 – Estrutura química dos complexos de rutênio descritos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma estratégia utilizada para melhorar o desempenho biológico destes complexos como PS para TFD seria aumentar a habilidade do complexo em se ligar ao DNA. Geralmente, para estes complexos, a interação ocorre via atração eletrostática, por sulco de ligação ou intercalação.⁹⁰ Estudos com complexos contendo ligantes longos planares, como o ligante 2-(1-pirenil)-1H-imidazol[4,5-f][1,10]fenantrolina (pip) aumentaram a capacidade de complexos em interagir por intercalação ao DNA.⁹¹ Além disso, ocasionou uma diminuição do estado excitado ^3IL , aumentando a vida útil do complexo devido à estabilização desse estado excitado e

reduzindo a taxa de decaimento não radiativo. O prolongamento do tempo de vida pode aumentar a probabilidade de se gerar mais $^1\text{O}_2$, tornando o composto mais eficiente fotogerador de ERO.

O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ippy})]^{2+}$ (sendo ippy = 2-(1-pirenil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina) se mostrou um agente promissor na TFD contra células cancerosas e bactérias devido a existência de um estado excitado tripleto de longa duração (37,5 μs) em tampão.⁹² McFarland e colaboradores utilizaram essa ideia no desenvolvimento de um dos ligantes que originaram o complexo TLD1433, mencionado anteriormente, que se encontra em ensaios clínicos de fase II. Este complexo apresenta elevada atividade biológica⁷⁷ devido ao seu grande potencial em fotogerar ERO. Dessa forma, pode provocar um distúrbio no equilíbrio redox celular, induzindo a apoptose pela via mitocondrial.⁹³

Cromóforos orgânicos, como o pireno, antraceno, naftaleno, acridina, poderiam ser ancorados a centros metálicos a fim de prolongar seu estado excitado. Curiosamente, observou-se que cromóforos contendo sistema π conjugado possuem potencial efeito na terapia fotodinâmica em células cancerosas, particularmente se associado a complexos metálicos contendo ligantes com estado ^3IL . O uso do pireno nesse caso confere um aumento da meia vida do estado luminescente do complexo, justificando um equilíbrio do estado ^3IL localizado no pireno com o estado $^3\text{MLCT}$.⁹⁴ Já o antraceno, por exemplo, seu estado ^3IL encontra-se energeticamente abaixo do estado $^3\text{MLCT}$, facilitando equilíbrio dos dois estados e elevando o tempo de vida do estado excitado.⁸⁸ Assim, a inclusão de cromóforos modifica a dinâmica de relaxação dos estados excitados desses complexos e certamente afetando suas vias de fotogeração de ERO.

O antraceno pode ser utilizado nas sínteses de novos complexos de rutênio devido às suas capacidades de gerar ERO,^{88,89,95,96} que podem causar danos oxidativos aos componentes celulares, resultando em morte celular. Adicionalmente, existem estudos que relatam o grupamento antraceno, quando associado em alguns complexos metálicos, tem demonstrada capacidade de interação e estabilização do DNA do tipo G-quadruplex.⁸⁸ Assim, essas modificações em combinação podem potencializar a capacidade dos complexos de rutênio de induzir estresse oxidativo, sob condições apropriadas de luz, que combinadas à estabilização do DNA G-quadruplex, resultam em uma dupla abordagem para induzir danos seletivos na célula, reforçando o potencial terapêutico dos metalocompostos. De forma geral, esse planejamento tem como objetivo avaliar a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio dos complexos, além de suas propriedades espectroscópicas, dinâmica de relaxação do estado excitado associado a conferir característica de interação mais seletivas ao DNA G-quadruplex.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Têm-se como objetivo, desenvolver e investigar complexos polipiridínicos de rutênio (II) com substituinte aril (grupo antracenil) covalentemente ligado a um ligante bipiridina, e investigar as propriedades espectroscópicas, fotofísicas e redox. Além de avaliar a capacidade desses compostos em gerar ERO, interagir com DNA e outras estruturas canônicas (ex. G-quadruplex), bem como de apresentarem atividades antibacteriana e citotóxica.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar os complexos $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-anth})]^{2+}$ (**GRPA**) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-anth})]^{2+}$ (**GRBA**), no qual $\text{bpy-anth} = 4'\text{metil-}N\text{-(antracen-2-il)-[2,2'}\text{bipiridina]-4-carboxamida}$;
- Validar a estrutura, pureza e estabilidade dos complexos utilizando técnicas espectrofotométricas (UV-Vis, infravermelho, luminescência), ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H), técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Investigar e determinar a interação dos complexos com DNA empregando técnicas espectroscópicas (absorção e emissão na região do UV-visível), e através de ensaios de fotoclivagem por eletroforese em gel de agarose;
- Investigar a interação do complexo com diversas sequências de DNA (duplex, G-quadruplex e outras) empregando dicroísmo circular.
- Investigar a capacidade de geração de espécies radicalares oxigenadas como $^1\text{O}_2$, OH^\bullet , $\text{O}_2\cdot^-$ no escuro e sob irradiação de luz azul, verde e vermelha;
- Determinar a lipofilicidade dos complexos (LogP e LogD_{7.4});
- Avaliar o desempenho dos compostos, através de ensaios biológicos, determinando o MIC e o MBC, Sinergismo e atividade em biofilmes de bactérias.
- Avaliar a citotoxicidade celular do complexo frente a linhagens de células cancerosas.

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 com bactérias foram realizados em parceria com o Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) (Dr. Prof. Edson Holanda) e os ensaios com células foram realizados no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos – LERCI (UFSCAR) (Dr. Alzir Batista Azevedo). .

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 (Direct Q 3UV, MILLIPORE) e os demais solventes empregados (DMF, Etanol, Acetona) foram de grau HPLC da marca Bioscie.

Os reagentes tricloreto de rutênio triidratado (99%), 2-aminoatraceno (96%), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (99%), 1-hidroxi-benzotriazol (99%), N-metilmorfolina (99,5%), 1,10-fenantrolina (99%), 2,2-bipiridina (99%), todos da Sigma Aldrich foram utilizados sem qualquer purificação prévia. *Calf thymus* DNA (CT DNA) obtido da Sigma-Aldrich foi utilizado nos ensaios de interação com essa biomolécula. 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.

Nos experimentos em que foi necessária atmosfera livre de oxigênio, utilizou-se argônio de procedência White Martins. Este foi tratado para remover traços de oxigênio e água presentes no gás comercial em um sistema constituído de colunas contendo sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador BTS-R-11.9 (Fluka Chemika).

A solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato de sódio pH 7,4 foi preparada pela combinação de sais de fosfato ácido, sendo preparada no dia anterior às medidas, e estocada sob refrigeração. As soluções de glutationa (GSH) e Azul de Nitrotetrazólio (NBT), da Sigma Aldrich, foram preparadas no mesmo dia do experimento utilizando tampão fosfato como solvente. As soluções estoques dos complexos foram preparadas no dia dos experimentos.

3.2 Síntese dos ligantes

3.2.1 Síntese do ligante 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico (bpy-COOH)

O ligante precursor bpy-COOH foi preparado conforme descrito na literatura.^{97,98}

3.2.2 Síntese do 4' metil -N-(antracen-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 μ L (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-hidroxi-benzotriazol, agitando-o por 1 hora em um frasco Schlenck. 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 48 horas em temperatura ambiente e atmosfera inerte. Após esse período, a solução resultante foi precipitada com água, filtrada e lavada com 20 mL de acetona gelada, água e éter. Rendimento: 65%.

3.3 Síntese dos complexos metálicos

3.3.1 Síntese dos complexos precursores [Ru(bpy)₂Cl₂] e [Ru(phen)₂Cl₂]

Os compostos precursores foram preparados conforme descritos na literatura, em que a mistura reacional consistia de 1 mol de RuCl₃.3H₂O, 2 mols de 2, 2'- bipiridina ou 1,10-fenantrolina e 8,0 mols de LiCl em DMF sob agitação e aquecimento por 8 horas, posteriormente precipitado com acetona.⁹⁹

Para [Ru(phen)₂Cl₂] foi realizada uma adaptação, esperou-se a temperatura do solvente atingir o ponto de refluxo e posteriormente foi adicionado a fenantrolina, somente então seguiu-se o procedimento da literatura, mantendo a mistura sob refluxo, no escuro e agitação por 8 horas. Após este período, foi precipitado com acetona, recolhido por filtração, lavado com acetona gelada e seco a vácuo. Rendimento: 73%

3.3.2 Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})](\text{PF}_6)_2$ (GRBA) e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})](\text{PF}_6)_2$ (GRPA)

Em um balão de 50 mL dissolveu-se 100 mg (0,187 mmol) $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ com 78 mg do ligante bpy-ant em uma relação estequiométrica complexo precursor/ligante (1:1) em 30 mL de etanol/água. Manteve-se a reação sob refluxo e agitação por 8 horas. Ao final desse período, a mistura foi rotovaporada a fim de aumentar a concentração dos reagentes. Posteriormente, adicionou-se gotas de solução saturada de NH_4PF_6 em água para precipitação e agitou-se por 30 minutos. Em seguida, deixado sob refrigeração por 24h. O precipitado alaranjado foi recolhido por filtração, lavado com água, éter gelado e seco a vácuo. Rendimento: 65% e 48% para os complexos **GRBA** e **GRPA**, respectivamente. Dados espectrais **GRBA**: RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 2,53 (3H, m4'-CH₃), 7,25-7,28 (1H, d1), 7,34-7,39 (5H, m5' e b5), 7,40-7,43 (2H, m5 e d3), 7,63-7,65 (1H, m6'), 7,76-7,82 (6H, b6, d9 e d6), 7,97-7,98 (1H, d7), 8,03-8,08 (6H, m6, d10 e b4), 8,44 (1H, d8), 8,52-8,55 (7H, d5, d4, m3' e b3, 8,57 (1H, m3). Análise elementar. Calculado: %C 56,58; %H 3,61; %N 10,04. Experimental: %C 56,51; %H 3,57; %N 9,98.¹⁰⁰

3.4 Equipamentos e Técnicas experimentais

3.4.1 Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV-visível

Os espectros eletrônicos na região do visível e ultravioleta, 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. As medidas das absorbâncias foram efetuadas pela leitura direta dos espectros, usando-se como branco o respectivo solvente.

3.4.2 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho dos compostos foram obtidos utilizando um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, marca ABB – Bomem, modelo 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). Os valores das frequências foram obtidos através da leitura direta nos espectros vibracionais, fazendo-se as devidas correções das linhas de base.

3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os cromatogramas dos complexos metálicos, **GRBA** e **GRPA**, foram obtidos em um sistema cromatográfico líquido, Shimadzu, equipado com uma bomba modelo LC-10AD e um detetor de fotodíodos SPD-M20A, utilizando-se coluna C-18 da Waters (5,0 μm , 4,6 mm x 50 mm) contendo pré-coluna, obtidos até 48 h em tampão fosfato pH 7,4 a 25 °C. Além disso, a fotoestabilidade dos compostos metálicos foi também investigada e monitorada durante 270 min após irradiação de luz azul. As amostras de 10 e 20 μL foram injetadas e processadas com um fluxo de 1 mL min^{-1} , utilizando uma mistura de 15% de metanol em água contendo 0,1% de NaTFA (trifluoroacetato de sódio) a pH 3,5 como fase móvel.

3.4.4 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 5.0¹⁰¹ para geração dos inputs e o Gaussian09¹⁰² 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.^{103–105} O conjunto de bases LANL2DZ¹⁰⁶ foi usado para descrição do átomo de rutênio e 6-31G(d)¹⁰⁷ foi utilizado para os demais átomos (C, H, O, N). Foram realizadas simulações envolvendo a presença de solvente acetonitrila com o uso do modelo de solvatação polarizada contínua (PCM).¹⁰⁸ Os espectros eletrônicos teóricos foram simulados através de TD-DFT,¹⁰⁹ 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 Chem3D Pro 4.23 e GaussSum 3.0.

3.4.5 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema eletroquímico potencioscópico/galvanostático BAS Epsilon E2 818 à 2, utilizando uma célula convencional de três eletrodos. As medidas eletroquímicas dos compostos foram realizadas em solução de perclorato de tetrabutilâmônio (PTBA) 0,1 mol L^{-1} em acetonitrila, utilizando eletrodos de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl utilizado como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

Utilizou-se ferroceno como padrão interno, admitindo que o par redox ferroceno ($\text{Fc}^{+/0}$) apresenta $E_{1/2} = 0,410 \text{ V vs Ag/AgCl}$.¹¹⁰

3.4.6 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).

3.4.7 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.

3.4.7.1 Rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$

O cálculo da geração de oxigênio singlete (Φ_Δ) foi determinada aplicando 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como sonda, via fluorescência.¹¹¹ Os espectros foram obtidos nas seguintes condições: $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, varredura = 420 – 550 nm e fendas = 0,3 mm. O experimento foi realizado com 2,5 mL das soluções dos complexos de **GRPA** e **GRBA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em metanol contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DPBF adicionados em uma cubeta de quartzo. A irradiação das amostras foi efetuada com um sistema de monoLED, LEDs de $\lambda_{\text{máx}} = 632 \text{ nm}$ (vermelho), $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ (verde) e $\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$ (azul) em intervalos de 2 minutos, 15 segundos e 5 segundos, respectivamente. Azul de metíleno ($\Phi_\Delta = 0.50$), rosa bengala ($\Phi_\Delta = 0.76$)⁸⁷ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($\Phi_\Delta = 0.87$)¹¹² foram usados como padrões. O valor de Φ_Δ para os complexos foi determinado a partir da equação (1):¹¹¹

$$\frac{ka}{kp} = \frac{\Phi_\Delta(\text{amostra})}{\Phi_\Delta(\text{padrão})} \quad (1)$$

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 utilizado. I e I_0 são as intensidades dos espectros de emissão em vários tempos e zero, respectivamente.

Para a determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete, também foi utilizado a sonda verde de oxigênio singlete (SOSG), monitorada por fluorescência. Os

experimentos foram conduzidos em uma cubeta de fluorescência de quartzo contendo 2,5 mL de metanol ou água ultrapura, aos quais foram adicionados SOSG ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e os compostos **GRBA** ou **GRPA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou fotogeradores padrão de oxigênio singlete, como $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). A cubeta foi irradiada com um LED azul ($\lambda_{\text{max}} = 463 \text{ nm}$) por 5 segundos com um tempo total de 70 segundos. Após a irradiação, a cubeta foi transferida para o fluorímetro, onde a fluorescência do SOSG foi medida ($\lambda_{\text{exc}}=490 \text{ nm}$). Como controle negativo, foi utilizado apenas o SOSG em metanol ou água e irradiada, seus espectros de emissão foram monitorados nas mesmas condições experimentais.

3.4.7.2 Geração de radical hidroxila (OH^{\cdot})

A avaliação da geração de radical hidroxila (OH^{\cdot}) foi realizada empregando-se a sonda aminofenil fluoresceína (APF), que reage com OH^{\cdot} e produz composto fluorescente com banda de emissão com máximo em torno de 515 nm. Neste experimento, uma cubeta de fluorescência contendo **GRPA** ou **GRBA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e APF ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), em 1 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), foi submetida a irradiação ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$) usando LED's Basetech Conrand, (1,7 W) em diferentes tempos (5 segundos) com um total de 70 segundos. Todos as reações foram monitoradas empregando-se um espectrofluorímetro estacionário Quanta-Master QM-40 PTI-Horiba. Controles adicionais usando azida de sódio e D-manitol (50 mmol L^{-1}), agentes supressores de $^1\text{O}_2$ e OH^{\cdot} , respectivamente, foram preparados para validar a contribuição dessas espécies reativas durante a fotoirradiação. Parâmetros usados no instrumento, comprimento de onda de excitação: 463 nm, largura das fendas: 0,5 mm.

3.4.8 Geração de Radical Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Para avaliar a capacidade dos complexos de gerar radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi empregado o corante nitroazul de tetrazólio (NBT) como sonda mediado em associação com L-glutationa reduzida (GSH). Este é um ensaio convencional, no qual o radical superóxido pode reduzir o NBT produzindo o formazan, espécie azul em solução, como um produto com absorção em torno de 560-590 nm. Assim pode-se acompanhar sua formação por espectroscopia de absorção eletrônica, observando a banda em torno de 590 nm.¹¹³ Neste experimento foi utilizado uma cubeta descartável (Atenção: não usar cubeta de vidro ou quartzo devido ao risco expressivo de associação do corante nesse material) contendo 1,5 mL de tampão

fosfato fosfato (PBS, fosfato 10 mmol L⁻¹ em pH 7,4) com NBT (50 µmol L⁻¹), GSH (1,5 mmol L⁻¹) e complexos **GRPA** e **GRBA** (5 µmol L⁻¹). Estas experiências foram realizadas num ambiente aeróbio, no escuro ou sob irradiação de LED azul ($\lambda_{\text{max}} = 463$ nm) (Basetech Conrand, 1,7 W) por 5 minutos com tempo total de acompanhamento de 105 minutos. A superóxido dismutase (concentração final de SOD - 4 U/mL), um supressor de radical superóxido (O₂[•]), foi também adicionada como controle, de modo a validar a produção desta espécie, o que poderá ser notado pela supressão da banda de absorção em ~590 nm.

3.4.9 Interação com DNA

3.4.9.1 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 quantificar a interação do complexo com o DNA. As medidas foram realizadas em concentração constante do complexo (10 µmol L⁻¹) com sucessivas adições de CT DNA em 10 mmol L⁻¹ de 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 2.¹¹⁴ 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. A equação abaixo foi utilizada para o cálculo.

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b (\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (2)$$

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.

3.4.9.2 Titulação de DNA (Monitorado por luminescência)

As medidas foram realizadas em concentração constante do complexo (10 µmol L⁻¹) 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.¹¹⁴

$$\frac{I_a - I_f}{I_b - I_f} = \left[\frac{b - \left(\frac{b^2 - 2K_b^2 [\text{Ru}][\text{DNA}]/s}{2K_b [\text{Ru}]} \right)^{1/2}}{2K_b [\text{Ru}]} \right] \quad (3)$$

Em que $b = 1 + K_b[\text{Ru}] + K_b[\text{DNA}]/2s$ 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.

O tamanho do sítio de ligação é representado por s, [Ru] e [DNA] são as concentrações molares do complexo e DNA, respectivamente.

3.4.9.3 Titulação competitiva do DNA com Brometo de Etídio, Verde de Metila ou Hoechst

As análises do modo de ligação no sulco foram realizadas utilizando os agentes verde de metila (MG) e Hoechst, em que os complexos metálicos foram utilizados como competidores, em tampão Tris-HCl (pH 7,4) 10 mmol L⁻¹ a 25 °C. Estas medições utilizaram DNA do timo de bezerro (CT-DNA) a 10 µmol L⁻¹ juntamente com 5 µmol L⁻¹ de MG ou Hoechst, que foram titulados com o complexo metálico **GRPA** ou **GRBA** e monitorados por espetroscopia de fluorescência.

Adicionalmente, foi realizado um ensaio de competição na presença de brometo de etídio (EtBr, 1,5 µmol L⁻¹) (Atenção: reagente mutagênico), utilizando CT-DNA, ao qual foi adicionada uma quantidade crescente de **GRPA** com o objetivo de deslocar do aduto DNA-EtBr o brometo de etídio. Esta titulação sob competição foi monitorada por espectroscopia de emissão a 600 nm. Houve um controle cuidadoso do volume máximo adicionado na cubeta para evitar qualquer diluição significativa, que foi sempre mantida abaixo de 5% do volume total. Esses dados foram usados e se ajustaram a uma equação de ligação simples usando o software Prism 5 (GraphPad), sendo obtida a constante de dissociação aparente (K_{d_APP}) com uso da equação abaixo:¹¹⁵

$$K_{d_APP} = K_d \cdot \left(1 + \frac{[EtBr]}{K_{d_EtBr}} \right) \quad (4)$$

Para o cálculo de K_d utilizou-se a constante de dissociação para brometo de etídio K_{EB} = 1,0 x 10⁷ mol L⁻¹ e a concentração empregada de [EB] = 1,5 µmol L⁻¹.

3.4.9.4 Eletroforese em gel de agarose

O estudo de fotoclavagem foi realizado empregando a técnica de eletroforese em gel de agarose. As soluções dos complexos **GRBA** e **GRPA** (concentrações 0 – 10 µmol L⁻¹) foram adicionadas à solução contendo o DNA superenovelado plasmidal pBR322 (20 µmol L⁻¹ pares de base) em tampão tris-HCl, pH = 7,4, que 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 ($\lambda_{\text{máx}} = 463$ nm), verde ($\lambda_{\text{máx}} = 520$ nm) e vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 693$ nm) a uma distância em torno de 1 cm do eppendorf de incubação.

3.4.10 Dicroísmo Circular

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em tampão tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 7,4. Para o DNA do timo de bezerro (350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de bases) foi pré-incubado durante 1 h a uma concentração fixa de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com os complexos metálicos **GRBA** e **GRPA** em várias concentrações (2, 5, 7, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Estes espectros foram obtidos na faixa de 200 a 350 nm, empregando-se um equipamento modelo Jasco-815 (Jasco), utilizando uma cuvete de quartzo de 1 cm de caminho ótico, densidade de dados de 1 nm, velocidade de varredura de 100 nm min⁻¹ e 5 acumulações de espectros. Os complexos metálicos **GRBA** e **GRPA** foram também medidos na ausência de DNA na sua concentração mais elevada.

Para os DNAs duplex, *i-motif*, *junctions* e G-quadruplex, todos foram pré-incubados por 1 h na concentração fixa de DNA de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com os compostos em diversas concentrações (0 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os DNA G-quadruplex hTel e 22AG também foram analisados na presença de tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4, contendo ou não KCl 100 mmol L⁻¹ ou NaCl 100 mmol L⁻¹. Esses experimentos foram executados usando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de comprimento de caminho, 100 nm min⁻¹ de velocidade de varredura, 5 acumulações de espectros.

Os oligonucleotídeos empregados nos ensaios foram adquiridos na Integrated DNA Technologies (IDT). Também foram realizados ensaios de desnaturação térmica, no qual as amostras foram aquecidas até 85°C. Foi utilizado uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico para registar os espectros de dicroísmo. Nos estudos de desnaturação térmica foi utilizado uma concentração constante de DNA (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência e na presença dos complexos **GRPA** e **GRBA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os dados foram registrados em uma taxa de aquecimento de 1°C/min numa faixa de temperatura de 5 – 85°C.

Sequência dos oligonucleotídeos (5' - 3') usadas nos ensaios:

hTel: GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG

22AG: AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G

i-motif: CCC TTA ACC CTT ACC TTA CCC T

c-myc: TGG GGT GGG TGG GGT GGG TGG GGA AGG

bcl-2: AGG GGC GGG CGC GGG AGG AAG GGG GCG GGA GCG GGG CTG

VEGF: GGG GCG GGC CGG GGG CGG GG

EGFR: CGG GGA GGC AGG GCG GGA GGA GGA

c-kit: CGG GCG GGC GCG AGG GAG GGG

trombina: GGT TGG TGT GGT TGG

hif-1 α : GCG CGG GGG AGG GGG AGA GGG GGG CGG GAG CGC G

EBR1: GGG CAG GGG GTG ATG GGG AGG AGC CAG GG

ndhA: GGG CCT TGT GGG CCT TGT GGG CCT TGT GGG

mosR: GGG CTA GCT CTA GGG GGC AGG GCT TTG ACG GG

22R_kras: AGG GCG GTG TGG GAA TAG GGA A

GC_match_FW: ATC ACA CCG AAC ACT CC

GC_match_REV: GGA GTG TTC GGT GTG AT

GC_mismatch_REV: GGA GTG TTC CGT GTG AT

cruciform_FWD: TCG CAA CTG CTA TGA CAG TTG CGA

cruciform_RV: TCG CAA CTG TCA TAG CAG TTG CGA

poli-AT: ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT

poli-GC: GCG CGC GCG CGC GCG CGC GC

S1-3WJ: CGGAACGGCACTCG

S2-3WJ: CGAGTGCAGCGTGG

S3-3WJ: CCACGCTCGTTCCG

S1_HJ-4WJ: GCCTAGCATGATACTGCTACCG

S2_HJ-4WJ: CGGTAGCAGTACCGTTGGTGGC

S3_HJ-4WJ: GCCACCAACGGCGTCAACTGCC

S4_HJ-4WJ: GGCAGTTGACGTCATGCTAGGC

3.4.11 Coeficiente de Partição (LogP)

Os valores de coeficiente de partição (log P) para os complexos **GRPA** e **GRBA** foram determinados 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 bêquer e 1 mL de n-octanol é adicionado. Em seguida, a solução é submetida a agitação magnética por 24 horas ao abrigo

da luz. Após esse período, a solução é transferida para tubos de *eppendorf* 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 ($\lambda = 467$ nm).

Para LogD_{7,4} foi realizado o mesmo ensaio, porém a solução aquosa utilizada foi tampão PBS pH 7,4. Os procedimentos foram realizados em temperatura de 25°C e o log foi calculado através da equação abaixo.

$$\log P = \log \frac{[Ru]_{octanol}}{[Ru]_{água}} \quad (5)$$

sendo que [Ru]_{octanol} é a concentração do composto em 1-octanol e [Ru]_{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 complexo. Para a quantificação da concentração em fase aquosa foi realizado curvas de calibração para cada um dos complexos. As medidas foram realizadas em duplicata.

3.4.12 Ensaios Biológicos

3.4.12.1 Microorganismos, Linhagem celular e condições de cultura

As bactérias utilizadas nesse estudo foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 11303 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 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), ressuspensos 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.

3.4.12.2 Atividade antibacteriana

A susceptibilidade das bactérias aos complexos de rutênio citados nesse trabalho foi avaliada pela concentração bactericida mínima (MBC) e a concentração mínima inibitória (MIC) dos complexos. A avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos foi realizada segundo o ensaio de microdiluição seriada em placas de 96 poços. Primeiramente o complexo foi solubilizado (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 $2 \times 10^6 \text{ cfu mL}^{-1}$), 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).

3.4.12.3 Efeito sinérgico

Utilizando o método *checkboard assay*, avaliamos os efeitos dos complexos de rutênio, **GRPA** e **GRBA**, em combinação com antibióticos. Este ensaio utiliza diluições múltiplas com dois antibióticos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das MICs para os microrganismos testados. Para este estudo, foram avaliadas duas combinações diferentes, totalizando quatro combinações, a saber: **GRPA** + ampicilina, e **GRPA** + tetraciclina; **GRBA** + ampicilina e **GRBA** + tetraciclina. Assim, foram utilizados cinco poços de uma microplaca de poliestireno de fundo plano de 96 poços para cada combinação testada, sendo que 25 poços foram utilizados para que as concentrações finais de cada uma das substâncias fossem a MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{8}$ MIC e $\frac{1}{16}$ MIC. Imediatamente após a montagem das placas, estas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e a nova MIC foi medida em combinação. A DO foi medida

a um comprimento de onda de 620 nm num leitor de microplacas (Spectramax). Estes dados foram interpretados através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fraccionada (FICI), obtido através da soma dos valores da Concentração Inibitória Fraccionada (FIC) de cada composto utilizado na combinação, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B \quad (6)$$

$\text{FIC}_A = [\text{MIC do complexo metálico combinado} / \text{MIC do complexo individual}]$;

$\text{FIC}_B = [\text{MIC do antibiótico combinado} / \text{MIC do antibiótico individual}]$.

De acordo com os valores obtidos, foi calculado um Índice de Concentração Inibitória Fraccionada (FICI) para cada combinação, a fim de avaliar o tipo de interação entre os fármacos. Assim, essa interação foi considerada sinérgica ($\text{FICI} \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < \text{FICI} \leq 4$) ou antagônica ($\text{FICI} > 4$).

3.4.12.4 Ensaios sobre a formação do biofilme

Os ensaios sobre os biofilmes foram conduzidos com base nas metodologias descritas na literatura¹¹⁶ com algumas modificações.¹¹⁷ A quantificação de biomassa foi realizado utilizando o corante cristal de violeta (CV), e complementada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) para estimar a viabilidade celular. Para os experimentos de inibição da formação de biofilmes, foram utilizadas placas, com os complexos sendo irradiados por luz LED (450 nm) por um período de 60 minutos.

A quantificação de biomassa foi realizada após 24 horas de incubação. As placas de 96 poços foram lavadas com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, cada poço foi preenchido com 200 µL de metanol 95% por 5 minutos, para promover a desidratação do biofilme. A coloração foi realizada com 200 µL de CV a 1% em cada poço por 5 minutos, sendo o excesso retirado com água destilada. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de ácido acético a 33% para solubilização do CV aderido ao biofilme. A quantificação foi realizada por meio da leitura da densidade óptica a 590 nm (SpectraMax i3) com a finalidade de quantificar a biomassa através da densidade óptica a 590 nm.

Para a contagem de células viáveis nos biofilmes, após a incubação de 24 horas, os poços das placas foram lavados duas vezes com água destilada estéril para remover as células de adesão fraca. Em seguida, cada poço foi preenchido com 200 µL de água destilada estéril e submetido a um banho ultrassônico (Cristófolo/EQM-CF) por 8 minutos, visando a dispersão do biofilme. Uma diluição decimal seriada das suspensões resultantes das dispersões foi

realizada, com plaqueamento em meio TSA e incubação a 37°C por 24h. Os resultados de UFC foram determinados e expressos em Log10 UFC/mL, permitindo avaliar quantitativamente a viabilidade microbiana dos biofilmes formados.

3.4.12.5 Ensaios sobre a formação do biofilme pré-formados

Nos ensaios realizados em biofilmes pré-formados foi utilizado placas de 96 poços, nas quais foram adicionadas 200 µL de uma suspensão celular com concentração final ajustada para 1x 10⁶ UFC/mL, seguida de incubação por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, o meio de cultura foi cuidadosamente removido das placas, sendo em seguida adicionados os complexos de rutênio nas concentrações de 125 a 1,9 µg/mL. Nos poços de controle, foram adicionados 200 µL de meio sem a presença dos complexos.

As placas contendo os biofilmes foram submetidas à irradiação com luz LED de 450 nm por 60 minutos, utilizando uma microplaca específica para LED, e reincubadas por 24 horas, a 37°C.

3.4.12.6 Ensaio de Citotoxicidade

Todas as linhagens de células humanas, MDA-MB-231 (cancro da mama humano triplo-negativo), A549 (cancro do pulmão humano) e MRC-5 (fibroblasto saudável do pulmão humano), foram cultivadas em meio de cultura de células Dulbecco modificado (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). A linhagem celular A2780 (células de cancro do ovário humano) foi cultivada em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). Todas as células foram mantidas numa incubadora com CO₂ (5%) a 37 °C.

3.4.12.7 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular testada com os complexos foi determinada através do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Inicialmente, as células foram tripsinizadas para contagem e ajuste da concentração celular, em seguida semeadas em placas de cultura de 96 poços (1,5 × 10⁴ células/poço) e posteriormente incubadas em estufa (a 37 °C e 5% de CO₂) por 24 h para adesão celular. Após esse período, os compostos foram adicionados aos poços em diferentes concentrações (0,012 a 50 µmol L⁻¹),

contendo uma concentração final de 0,5% de DMSO, e as placas foram mantidas na incubadora novamente por mais 48 horas. O meio de cultura foi então removido das placas e 50 μ L de MTT (1,0 mg mL⁻¹ em PBS) foram adicionados a cada poço, que foi então incubado na estufa por 3 horas.

Para as experiências de irradiação de luz, as placas de 96 poços foram inicialmente semeadas e incubadas durante 24 horas. Os compostos foram adicionados e a placa foi mantida na incubadora durante mais 24 horas (37 °C e 5% de CO₂). O meio de cultura foi substituído por meio fresco isento de vermelho de fenol, e a placa foi irradiada durante 10 min e mantida na incubadora durante mais 24 h ($\lambda_{\text{irrad}} = 460\text{-}465 \text{ nm}$, 18 mW cm⁻², 10,8 J cm⁻²). Após esse período, o meio de cultura foi removido, 50 μ L de MTT (1,0 mg mL⁻¹ em PBS) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por um período de 3 horas.

Em ambos os experimentos, os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de 150 μ L de DMSO e a absorbância foi registrada a 540 nm em um espectrofotômetro/fluorímetro Synergy/H1-Biotek. As células de controlo negativo também foram cultivadas com meio contendo 0,5% de DMSO. Os valores IC₅₀ foram calculados utilizando o software GraphPad Prism 8.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos compostos

4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

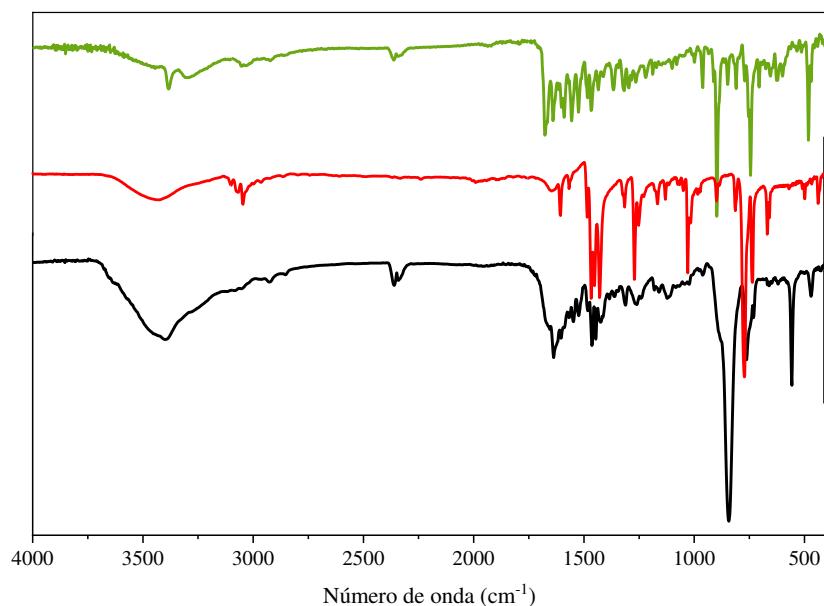
As Figuras 7 e 8 ilustram os espectros vibracionais na região do infravermelho para o ligante bpy-anth, bem como os complexos [Ru(bpy)₂Cl₂], [Ru(phen)₂Cl₂], **GRPA** e **GRBA**, em pastilha de KBr. As atribuições das bandas observadas foram feitas com base na literatura e estão summarizadas na Tabela 1.^{118,119} Vale ressaltar que o complexo GRBA foi previamente preparado e caracterizado em estudos anteriores.¹⁰⁰

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. A ausência da banda em 1700 cm⁻¹, relativo a carbonila do ligante de partida 4-metil-2,2'-bipiridina-4'-ácido carboxílico (Apêndice A), reforça a obtenção do ligante desejado.¹²⁰

Nos complexos precursores, para o $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ é possível observar bandas em 1629, 1585, 1515, 1492 e 1429 cm^{-1} que são referentes aos estiramentos C=C presentes nos anéis bipiridínicos, já para o $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$, bandas em 1598, 1458, 1442 e 1419 cm^{-1} . Em 1224 e 1261 cm^{-1} , bandas referentes ao estiramento C-N presentes nas estruturas. Além disso é visto em 761 e 725 para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ e em 746 e 715 para $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ bandas referentes a deformação do hidrogênio fora do plano dos anéis bipiridinícos e fenantrolinícos, respectivamente.

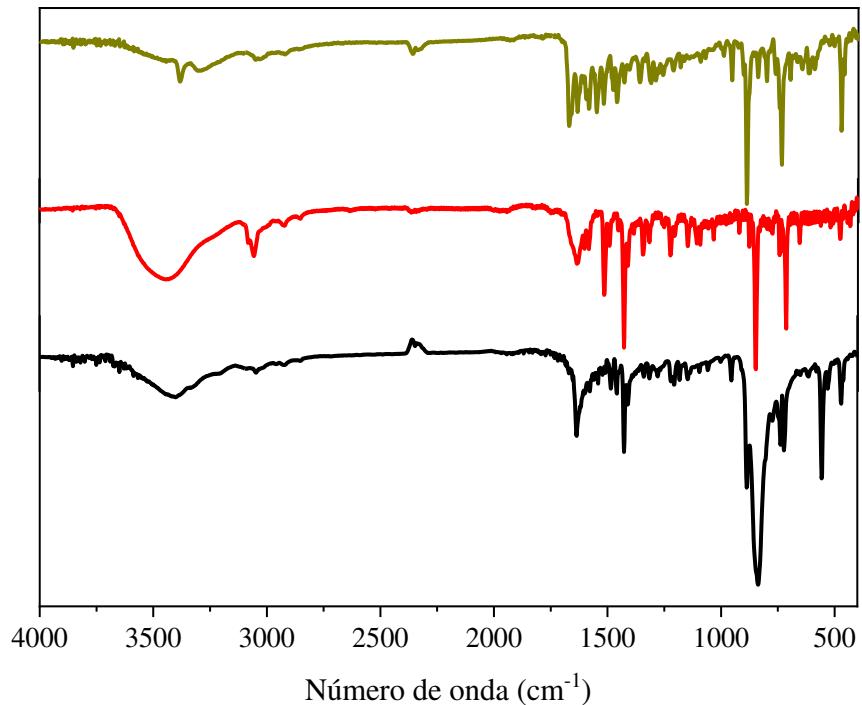
Nos complexos **GRPA** e **GRBA**, observa-se uma banda em 3397 e 3396 cm^{-1} atribuídas ao estiramento N-H de amida presente em ambos complexos. Em 2923 e 2929 cm^{-1} observa-se bandas referentes ao estiramento C-H do carbono sp^3 , respectivamente. Também é evidente os estiramentos C=O de amida N-substituída que apresentam frequências vibracionais em 1635 e 1637 cm^{-1} , respectivamente, e um forte sinal em 837 e 842 cm^{-1} atribuídos a deformação angular do contraíon PF_6^- . Além dessas, uma banda em 557 cm^{-1} , em ambos espectros, está relacionada aos modos vibracionais dos hidrogênios para fora do plano (C-H) pertencentes aos anéis aromáticos do ligante bpy-anth, que foram também observados. A Tabela 1 resume as principais atribuições das frequências vibracionais dos compostos estudados. Para comparação, foi incluído o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})(\text{bpy-anth})]^{2+}$, que contém o mesmo ligante (bpy-anth), permitindo uma análise detalhada das semelhanças e variações espectrais. Essa comparação auxilia na confirmação das atribuições e no entendimento das características vibracionais associadas aos diferentes complexos.

Figura 7 – Espectro vibracional na região do Infravermelho dos compostos: bpy-anth (—),
[Ru(bpy)₂Cl₂] (—) e GRBA (—) em pastilha de KBr.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 – Espectro vibracional na região do Infravermelho dos compostos: bpy-anth (—),
[Ru(phen)₂Cl₂] (—) e GRPA (—) em pastilha de KBr.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Bandas mais relevantes dos ligantes e complexos metálicos sintetizados medidas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho.

$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)				
bpy-anth	[Ru(bpy)(dppz)(bpy-anth)] ²⁺ ⁸⁸	GRBA	GRPA	Atribuição
3255	3413	3396	3397	ν (N-H) (amida)
2932	2921	2929	2923	ν (C-H) da metila
1643	1668	1637	1635	ν (C=O) de amida N-substituída
1587 – 1546	1640-1600	1600 – 1446	1579 – 1460	ν (C=C) bipiridínicos/ aromáticos
1477 – 1430	1462-1419	1450 – 1400	1440 – 1400	ν (C=C) e ν (C=N) de anéis bipiridínicos
1359	-	1311	-	δ (C-H) da metila
1106	-	1265	1240-1205	ν (C-N) de aromáticos
-	840	842	837	δ PF ₆ [□]
763	700-800	761 e 730	738 e 723	δ (C-H) aromáticos
590	-	557	557	δ (C-H) aromáticos do bpy-anth

ν = estiramento simétrico; δ = deformação angular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os espectros eletrônicos dos complexos precursores [Ru(bpy)₂Cl₂] e [Ru(phen)₂Cl₂] (Apêndices B e C) e dos complexos finais **GRPA** e **GRBA** (Figuras 8 e 9) foram obtidos em solução utilizando metanol como solvente.

O espectro eletrônico do complexo de partida [Ru(bpy)₂Cl₂] (Apêndice B) apresenta duas bandas em 361 nm e 522 nm, atribuídas às transições do tipo transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) provenientes dos orbitais dπ (Ru^{II}) para os orbitais pπ* dos ligantes bipiridínicos.⁹⁹ A intensa banda de alta energia em 295 nm e a banda em 246 nm correspondem a transição intraligante pπ* ← pπ dos ligantes bipiridínicos e anéis aromáticos pertencentes ao grupo antracenil.⁸⁸ Para o complexo de partida [Ru(phen)₂Cl₂] (Apêndice C) observa-se duas bandas em 381 nm e 455 nm, atribuídas às transições do tipo MLCT, semelhante ao [Ru(bpy)₂Cl₂], e em 266 nm com um ombro em 289 nm, bandas atribuídas às transições intraligantes dos ligantes fenantrolínicos.

Para o complexo **GRPA** (Figura 9), as bandas em 269 e o ombro em 289 nm foram atribuídas às transições do tipo intraligantes (pπ* ← pπ) dos anéis da fenantrolina e anéis aromáticos do grupo antracenil. Para o complexo **GRBA** as bandas em 245 e 288 nm são

atribuídas as transições intraligantes dos anéis do antraceno e bipiridínicos. Observou-se que a troca dos íons cloreto pelo ligante (4-metil-N-(antracen-2-il)-[2,2'bipiridina] – 4' – carboxamida) (bpy-anth) alterou a energia da banda MLCT para ambos os complexos (**GRPA** e **GRBA**) obtidos, com deslocamento das bandas em 381 e 455 nm para 420 e 446 nm no complexo **GRPA**, e de 361 e 522 nm para 422 e 459 nm no complexo **GRBA**.¹²¹ Esses resultados são esperados, e se explicam devido à natureza π acceptora dos ligantes bipiridínicos e fenatrolínicos nos complexos, que por efeito de retrodoação ($\pi - backbonding$) 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 menor energia.¹²² A Tabela 2 exibe de forma resumida todas as transições e os respectivos coeficientes de absorvidade medidos.

Tabela 2 – Transições eletrônicas na região do UV-vis para os complexos **GRPA** e **GRBA** em metanol.

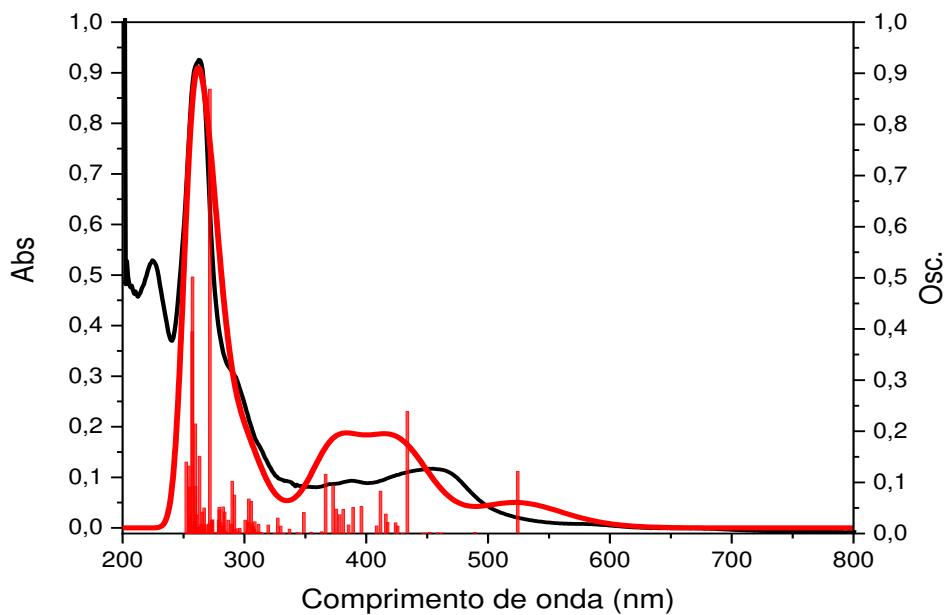
Complexos	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm} (\epsilon / \text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Atribuição
GRBA	245 (29982)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ IL (anth)
	288 (86020)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ IL (bpy)
	422 (17987)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{d}\pi$ MLCT
	459 (19540)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{d}\pi$ MLCT
GRPA	269 (94040)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ IL (phen)
	420 (12010)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ MLCT
	446 (13440)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ MLCT
	516 (6354)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ ILCT
	650 (1011)	$\text{p}\pi^* \leftarrow \text{p}\pi$ ILCT

Fonte: Elaborada pelo autor.

A teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT) foi aplicada juntamente com a espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis a fim de investigar a natureza das transições eletrônicas dos complexos, sendo analisado as contribuições do orbital molecular a fim de auxiliar na interpretação do comportamento espectroscópico dos complexos. A atribuição das bandas dos complexos foi realizada através da comparação entre os espectros eletrônicos experimentais e teóricos, juntamente com seus respectivos orbitais moleculares.

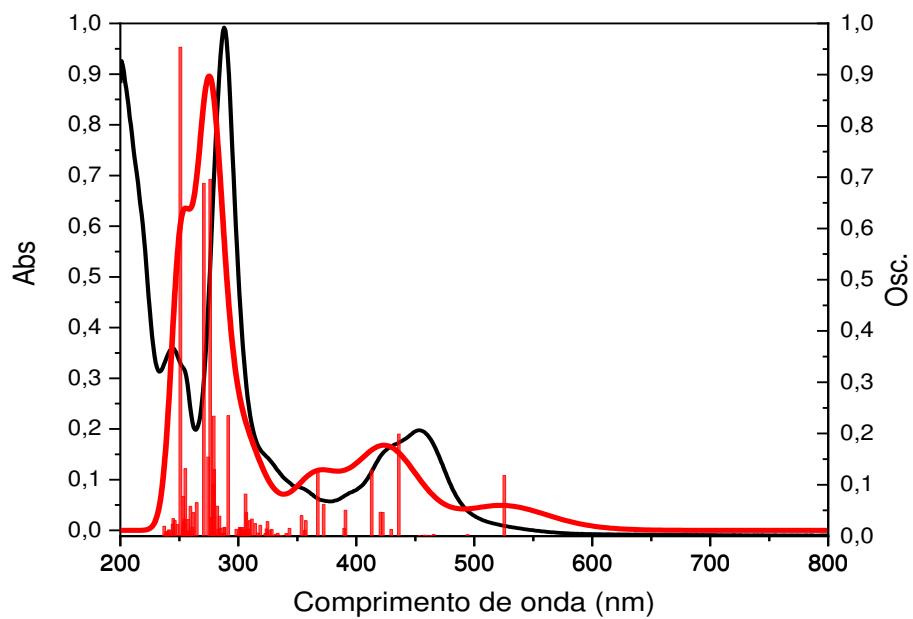
Os resultados de TD-DFT reforçaram que a natureza das bandas de baixa energia entre 400-520 nm são referentes à transição MLCT (transição de carga de metal para ligante). Indicaram também que as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (IL-intraligante) são referentes aos orbitais dos ligantes aromáticos do antracenil e bipiridínicos para o complexo **GRBA**. Para o complexo **GRPA**, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ foram identificadas como do tipo IL (intraligante) e ILCT (intraligante via transferência de carga), associadas aos ligantes fenantrolínicos e anéis aromáticos do antraceno, respectivamente. Os espectros eletrônicos calculados via TD-DFT são apresentados nas figuras 9 e 10, os quais estão em satisfatória concordância com os espectros experimentais de ambos os complexos. Assim, pode-se interpretar com confiabilidade as propriedades espectroscópicas dos complexos em termos de energia e distribuição espacial dos orbitais moleculares.

Figura 9 – Espectros eletrônicos do complexo **GRPA** em metanol, experimental (—) e teórico (—).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Espectros eletrônicos do complexo **GRBA** em metanol, experimental (—) e teórico (—).



Fonte: Eaborada pelo autor.

As transições eletrônicas do tipo MLCT previstas teoricamente (Tabela 3) para ambos os complexos são predominantemente atribuídas a transferência de carga de orbitais centrados no rutênio (HOMO-1, HOMO-2 e HOMO-3) para orbitais dos ligantes bipiridinas e fenantrolinas (LUMO, LUMO+1, LUMO+2, LUMO+3).

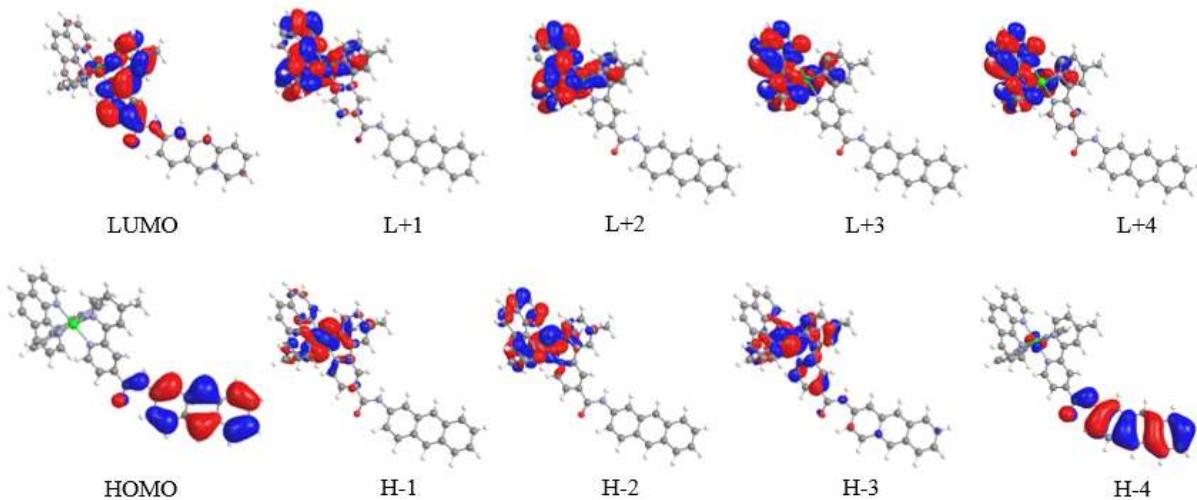
Tabela 3 – Transições calculadas de estado singlete para o complexo **GRPA** e **GRBA**.

		GRPA		
Exp. λ (nm)	Calc. λ (nm)	Maior contribuição	Caráter	
516	525	HOMO→LUMO (98%)	$\pi(\text{bpy-anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	ILCT
446	434	H-3→LUMO (84%)	$d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	MLCT
420	412	H-3→L+2 (38%) H-2→L+1 (30%)	$d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{phen})$ $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{phen})$	MLCT
269	272	H-4→L+6 (13%) HOMO→L+10 (33%)	$\pi(\text{bpy-anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$ $\pi(\text{bpy-anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	IL
		GRBA		
Exp. λ (nm)	Calc. λ (nm)	Maior contribuição	Caráter	
515	524	HOMO→LUMO (98%)	$\pi(\text{bpy-anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	ILCT
459	436	H-3→LUMO (31%), H-2→LUMO (51%), H-2→L+1 (11%)	$d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	MLCT
422	413	H-3→L+1 (43%) H-2→L+2 (34%)	$d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	MLCT
288	291	H-8→LUMO (46%)	$\pi(\text{bpy-anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	IL
245	255	H-9→L+3 (29%) H-8→L+3 (21%)	$\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$ $\pi(\text{bpy-anth}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-anth})$	IL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para compreendermos a respeito da distribuição espacial dos orbitais moleculares de fronteira dos complexos, calculou-se as superfícies de contorno da densidade eletrônica desses orbitais que estão representadas na figura 11 e apêndice D, para **GRPA** e **GRBA**, respectivamente.

Figura 11 – Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo **GRPA** calculados por TD-DFT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

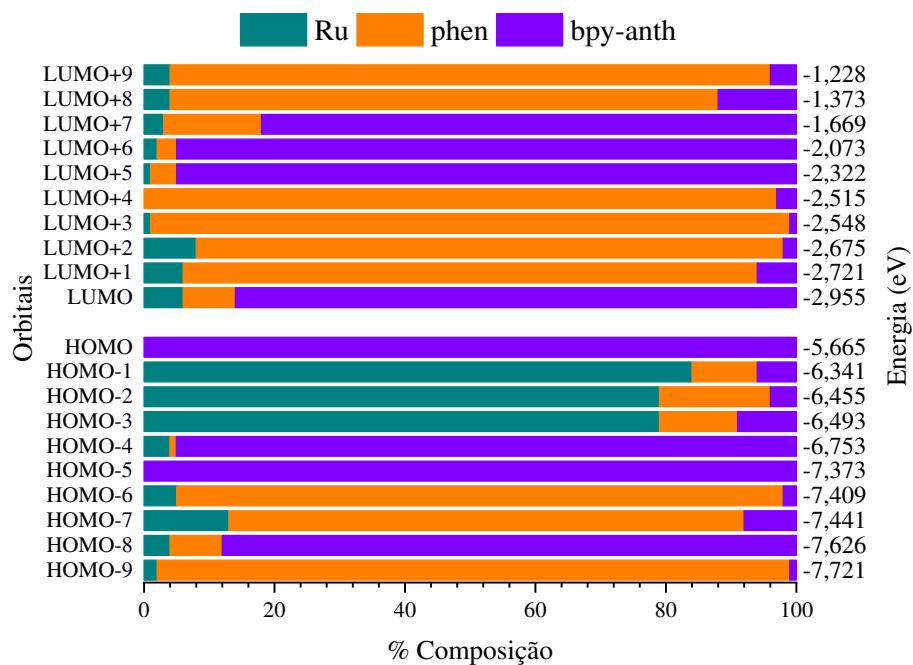
A análise da composição dos orbitais moleculares selecionados indicou uma contribuição majoritária do átomo de Ru para formar os orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO-1, HOMO-2, e HOMO-3), enquanto o orbital HOMO apresentou maior densidade eletrônica no ligante bpy-anth para ambos os complexos (Figura 12 e Apêndice E). Frequentemente, a literatura descreve orbitais HOMO com um caráter estritamente do metal em sistemas polipiridínicos de rutênio.^{123,124} Os orbitais moleculares desocupados de menor energia, LUMO+1 (88%), LUMO+2 (90%), e LUMO+3 (98%) encontram-se predominantemente centrados nos ligantes fenantrolinas para o complexo **GRPA**, e LUMO+1 (85%), LUMO+2 (84%) centrados nos ligantes bipiridinas para o complexo **GRBA**, enquanto HOMO é composto majoritariamente pelo ligante bpy-antth (100%) em ambos os complexos. A participação dos orbitais do antracenil pode justificar o aparecimento das transições do tipo IL e ILCT (Tabela 3) em torno de 520 nm nos espectros teóricos.

De acordo com os cálculos de TD-DFT, a transição de menor energia se deve ao HOMO → LUMO, com a banda de absorção em 524 e 525 nm para **GRPA** e **GRBA**, respectivamente, que foram atribuídas as transições de transferência de carga intraligante (ILCT). Entretanto, o espectro eletrônico experimental apresenta essa banda apenas para o complexo **GRPA**, com valor em torno de 516 nm. A diferença de energia HOMO – LUMO foi calculada em 2,71 eV e 2,56 eV para o **GRPA** e **GRBA**, respectivamente, o que é consistente com os dados calculados a partir do espectro de absorção e emissão de 2,283 e 2,296 eV.

Além disso, a banda MLCT observada em 446 e 420 nm e calculadas em 434 e 412 nm para o complexo **GRPA** são transições que envolvem principalmente os orbitais HOMO-3 (Ru(d π) 79%) para o LUMO (bpy-anth, (π*) 86%), e também com contribuições de HOMO-3 (Ru (d π) 79%) para o LUMO+2 (phen, (π*) 90%).

A banda MLCT observada em 459 e 422 nm e calculadas em 423 e 372 para o complexo **GRBA** são transições que envolvem predominantemente os orbitais HOMO-3 (Ru (d π) 76%) para o LUMO (bpy-anth, (π*) 83%) e contribuições do HOMO-3 (Ru (d π) 76%) para LUMO+1 (bpy, (π*) 85%), essa última se mostra um aspecto diferencial entre os compostos.

Figura 12 – Contribuições dos orbitais moleculares da espécie **GRPA** em função de seus fragmentos: Ru (—), phen (—) e bpy-anth (—).



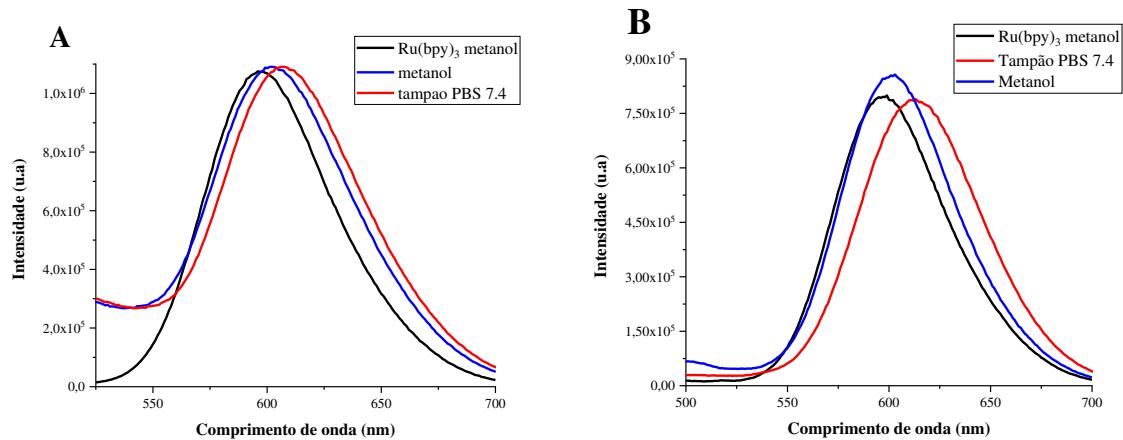
Fonte: Elaborada pelo autor.

O estudo teórico 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.

4.1.3 Luminescência

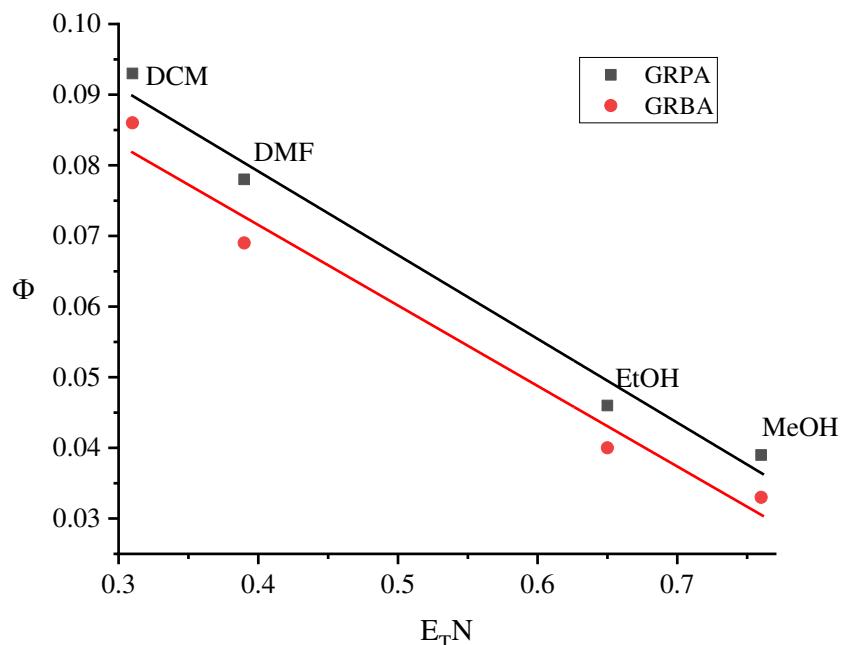
As propriedades luminescentes dos complexos **GRPA**, **GRBA** e do complexo padrão de referência $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ estão apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Os complexos foram excitados nos seus máximos de absorção em 446 nm para **GRPA** e 459 nm para **GRBA**, referentes à banda de transferência de carga metal para o ligante (MLCT), sendo observado uma banda de emissão larga com máximo em 601 nm e 603 nm em metanol e, de 607 nm e 612 nm, em tampão PBS pH 7,4, respectivamente. Os perfis espectrais exibidos são característicos de sistemas polipiridínicos de rutênio e do estado ${}^3\text{MLCT}$ originados do decaimento de estados ${}^1\text{MLCT}$ por conversões intersistema.^{86,125,126} Sabe-se que a luminescência de complexos de rutênio é afetada por diferentes ligantes polipiridínicos e substituições no anel terminal causando efeitos de planaridade e interferência de polaridade.¹²⁷ O máximo de emissão de ambos os complexos são deslocados para o vermelho quando comparados ao $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (597 nm), triplamente degenerado, implicando na estabilização do estado ${}^3\text{MLCT}$ derivatizado com o grupamento amida-antraceno.

Figura 13 – Espectro de emissão para o **GRPA** (A) e **GRBA** (B) em metanol (—), em tampão Fosfato pH 7,4 (—) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (—) em metanol, na concentração de 2×10^{-5} mol L⁻¹ a 25°C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Variação do rendimento quântico de emissão versus os valores de E_{TN} para os solventes utilizados.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na tabela 4 encontram-se os rendimentos quânticos de emissão e os deslocamentos dos máximos de emissão em diferentes solventes. Observa-se uma diminuição no rendimento quântico de emissão assim como um deslocamento da banda de emissão com a mudança da polaridade do meio, indicando que há um efeito de solvatochromismo e um deslocamento batocrômico (aumento do comprimento de onda de emissão) com o aumento da polaridade do solvente, isso devido à estabilização do estado MLCT em solventes polares.¹²⁸ Por outro lado, ocorre um decréscimo no rendimento de emissão em solventes polares próticos, indicando que no estado excitado ocorre formação de ligação de hidrogênio, as quais suprimem a emissão do estado $^3\text{MLCT}$. Uma boa correlação entre os rendimentos quânticos de emissão e o parâmetro empírico de polaridade de Reichardt normalizado (E_{TN}) (Figura 14).¹²⁹ Este parâmetro de polaridade considera as interações específicas entre o solvente e soluto, como ligação de hidrogênio.

Tabela 4 – Rendimento quântico de emissão (ϕ_{em}) e máximo de emissão (ϕ_{max} , nm) para **GRPA** e **GRBA**.

Complexos	DCM	DMF	Metanol	Etanol
GRPA	0,093 (591)	0,078 (635)	0,039 (601)	0,046 (606)
GRBA	0,086 (588)	0,069 (623)	0,033 (603)	0,040 (604)

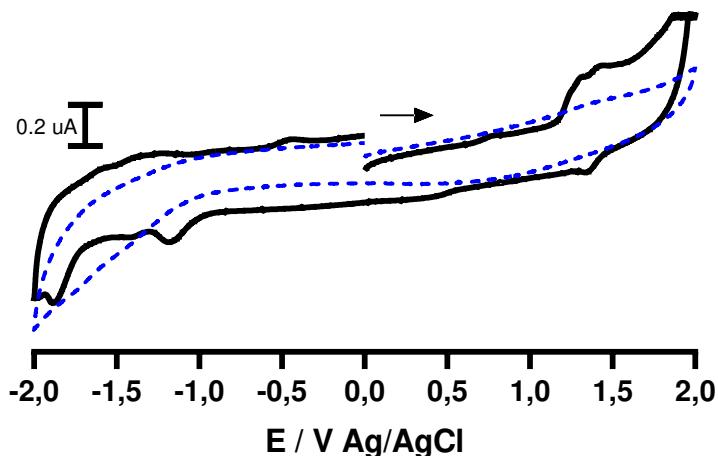
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.4 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica relevante que fornece informações sobre a natureza redox do composto. Os voltamogramas cíclicos dos precursores $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ em 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em acetonitrila e a 100 mV s⁻¹ estão ilustrados nos Apêndices F e G, respectivamente. Observa-se um processo reversível associado ao par redox Ru^{III/II} para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ com $E_{1/2}$ de 0,306 V e 0,468 V vs Ag/AgCl, respectivamente.

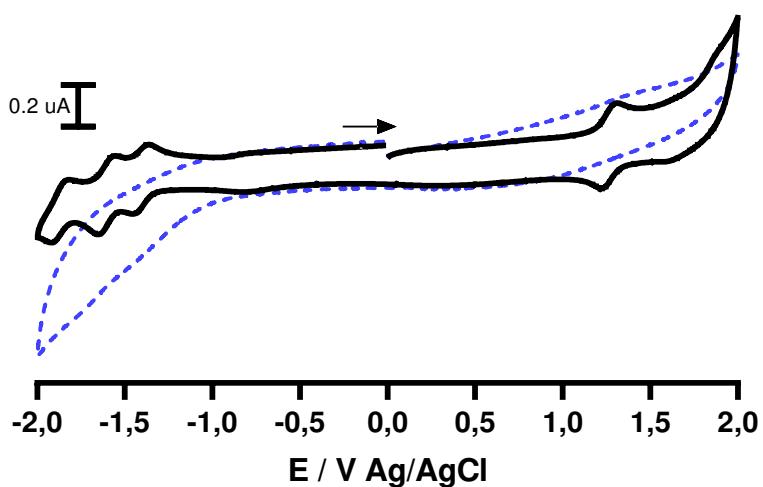
Os potenciais de meia-onda referentes ao par redox Ru^{III/II} do complexo **GRPA** (Figura 15) e **GRBA** (Figura 16) foram +1,28 V e +1,16 V, respectivamente. Percebe-se um deslocamento de potencial para valores mais positivos quando comparados com os precursores, 0,306 e 0,468 V, para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$, respectivamente, 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.¹²⁶ Após a coordenação da bipiridina modificada com o antraceno 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.¹²¹ Foi possível observar um processo de oxidação adicional, de caráter irreversível, para o complexo **GRPA** em +1,21 V. Estudos com sistemas similares demonstraram que para alguns desses sistemas pode ocorrer o aparecimento desse processo referente a oxidação do ligante bpy-anth.^{88,95,130} O estudo de DFT realizado aponta que o orbital HOMO do complexo **GRPA** situa-se sobre a porção antracenil e grupamento amida, em -5,66 eV (Figura 12), assim sendo mais provável a oxidação ocorrer antes do processo referente ao par redox Ru^{III/II}, situados nos orbitais HOMO-1 e HOMO-2.

Figura 15 – Voltamograma cíclico do complexo **GRPA** obtido em 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.

Figura 16 – Voltamograma cíclico do complexo **GRBA** obtido em 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.

Os processos eletroquímicos observados na região negativa de potencial caracterizam a redução dos ligantes bipiridínicos, fenantrolínicos e antraceno, sugerindo, portanto, a coordenação dos ligantes ao rutênio. Os dados obtidos na voltametria cíclica indicam

fortemente a coordenação do ligante bpy-ant ao centro metálico devido ao deslocamento adicional do potencial redox. Relacionando os dados obtidos com os dados de 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-ant. Na tabela 5 tem-se os potenciais referentes aos processos redox do centro metálico e dos ligantes e alguns complexos para fins comparativos.

Tabela 5 – Voltametria cíclica do **GRPA** e **GRBA** 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)		Anth	Redução dos ligantes		
	$E_{1/2}$	E_{ox}		E_{red}		
GRPA	+1,28	+1,21	-1,11	-1,42	-1,88	
GRBA	+1,16	-	-1,44	-1,65	-1,91	
[Ru(dcbpy)(mbpy-ant)]²⁺ ⁹⁵	+1,10	-	-	-	-	-
[Ru(bpy)(bpy-anth)(dppz)]²⁺ ⁸⁸	+1,33	+1,30	-0,93	-1,54	-1,74	

Fonte: Elaborada pelo autor.

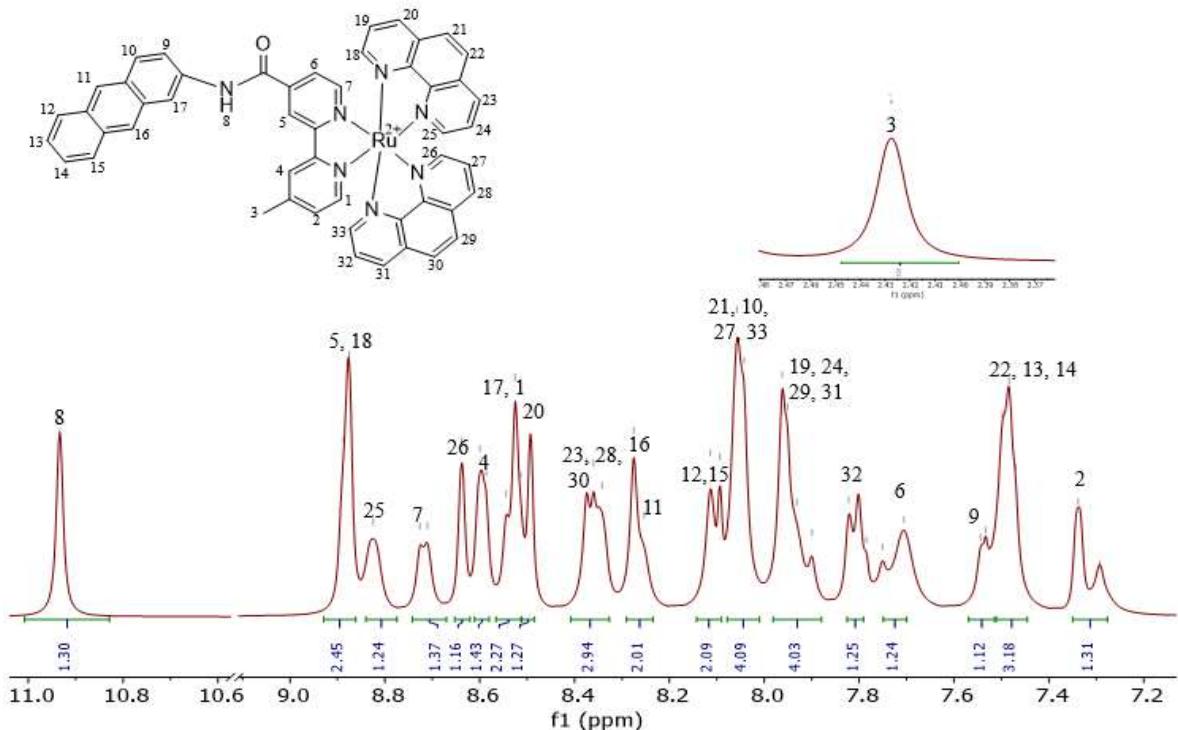
4.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de 1H

O espectro de RMN de 1H para o ligante bpy-ant obtido em DMSO deuterado está ilustrado no Apêndice H e está de acordo com a literatura.^{88,100,131} 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 mais desblindado do composto encontra-se em 10,28 ppm, relativo ao hidrogênio amídico (H8) e o mais protegido encontra-se em 2,47 ppm, do grupo metila (H3).

Os espectros de RMN de 1H para o complexo **GRBA** encontra-se no apêndice I e está de acordo com a literatura.¹³² O complexo inédito **GRPA** está apresentado na Figura 16 as atribuições dos sinais de hidrogênios observados para este complexo foram realizadas com o auxílio do espectro bidimensional COSY de RMN 1H (apêndice J) e dos espetros do ligante livre.^{89,131,133} Comparando-se o espectro de RMN de 1H do ligante livre (apêndice H) nas mesmas condições, observou-se o deslocamento de alguns picos ao longo do espectro do

complexo além de desdobramentos, isso devido à presença de ligantes π aceptores, promovendo uma retrodoação com o centro metálico.

Figura 17 – Espectro de Ressonância Magnética de ^1H para o complexo **GRPA** em DMSO deuterado, obtido na frequência de 300 MHz.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o complexo **GRPA** (Figura 17), com relação à bipiridina funcionalizada com o antraceno, há um sinal de singlet em 10,94 ppm, referente ao hidrogênio amídico (H-8), enquanto que o mais protegido se encontra em 2,43 ppm referente aos hidrogênios do grupo metila (H-3). Os hidrogênios H-18 e H-5 são os mais desblindados das bipiridinas com valores em torno de 8,91 – 8,84 ppm devido à proximidade de grupos eletronegativos N e O. Os sinais em 7,53 ppm (H-9), 8,07 – 8,00 ppm (H-10), 8,25 ppm (H-11), 8,13 – 8,08 ppm (H-12, H-15), 7,51 – 7,42 ppm (H-13, H-14), 8,27 ppm (H-16), 8,54 ppm (H-17) são relativos aos hidrogênios do grupo antracenil.

Para os ligantes fenantrolínicos vários sinais de hidrogênio não equivalentes foram observados devido à ausência de simetria da estrutura, com diferentes ambientes eletrônicos. Os hidrogênios das fenantrolinas foram atribuídos com o auxílio do COSY e possuem valores em torno de 7,99 – 7,86 ppm (H-19, H-24, H-29, H-31), 8,40 ppm (H-20), 8,07 – 8,00 ppm (H-21, H-27, H-33), 7,51-7,42 ppm (H-22), 8,41 – 8,31 ppm (H-23, H-28 e H-30), 8,83 ppm (H-

25), 8,63 ppm (H-26) e 7,80 ppm (H-32). Os H-25 e H-26 possuem valores em torno de 8,83 e 8,63 ppm, respectivamente, sendo desblindados devido à proximidade ao N piridínico.

Podemos concluir que os espectros de RMN de ^1H indicam a coordenação do ligante funcionalizado ao centro metálico. Todas as atribuições dos espectros de RMN ^1H para os compostos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e atribuições para o ligante livre (bpy-anth) e GRPA.

GRPA		Ligante Livre (bpy-anth)	
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H
8,52	1	8,58	1
7,31 (d)	2	7,10	2
2,43 (s)	3	2,47	3
8,59 (s)	4	8,36	4
8,91 – 8,84	5, 18	8,98	5
7,72 (d)	6	7,97	6
8,72 (d)	7	8,87	7
10,94 (s)	8	10,28	8
7,53	9	7,86	9
8,07 – 8,00	10, 21, 27, 33	8,09	10
8,25	11	8,51	11, 16
8,13 – 8,08 (d)	12, 15	8,05	12, 15
7,51 – 7,42	13, 14, 22	7,48	13, 14
8,27	16	8,80	17
8,54	17		
7,99 – 7,86	19, 24, 29, 31		
8,40	20		
8,41 – 8,32	23, 28, 30		
8,83 (d)	25		
8,63 (s)	26		
7,80 (d)	32		

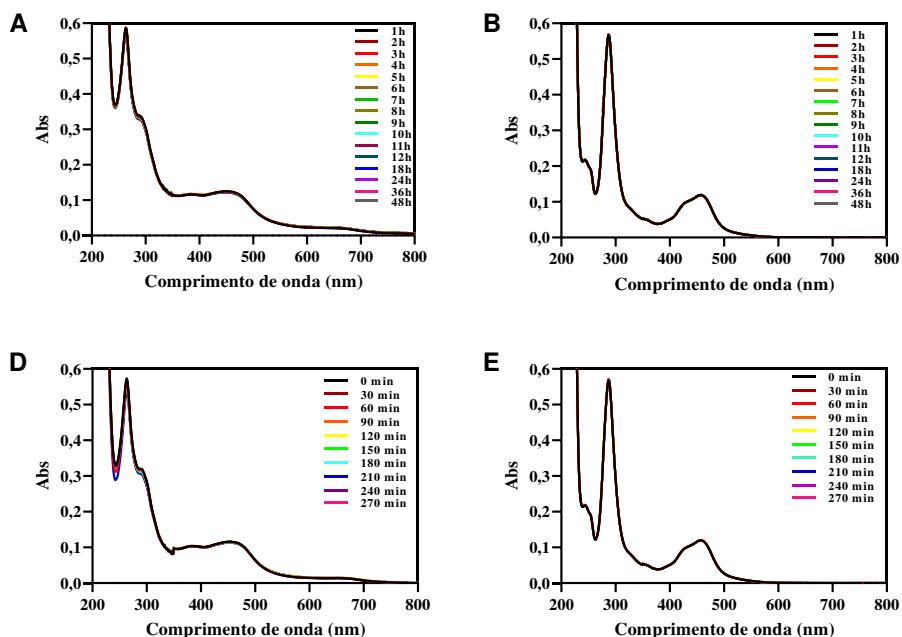
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Estudo de Estabilidade

Os complexos **GRPA** e **GRBA** foram avaliados quanto à sua estabilidade tanto no escuro quanto sob irradiação de luz azul, utilizando espectroscopia de absorção eletrônica e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este estudo é fundamental para entender o comportamento desses complexos em condições que mimetizam situações biológicas e suas potenciais aplicações terapêuticas.

A estabilidade dos complexos **GRPA** e **GRBA** foi monitorada por 48 horas no escuro e por 270 minutos sob irradiação de luz azul utilizando espectroscopia de absorção eletrônica e acompanhado por 1 hora de irradiação analisando por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por espectroscopia de absorção eletrônica foi possível observar que ambos os complexos mantiveram suas características espectrais ao longo desse período, indicando que não houve alterações significativas nas estruturas dos complexos. Os espectros de absorção, conforme a Figura 18, permaneceram constantes, sugerindo alta estabilidade química tanto no escuro quanto sob irradiação.

Figura 18 – Estudo da estabilidade dos complexos monitorado por espetroscopia de absorção eletrônica. Em A e D tem-se os espectros do **GRPA** monitorados por 48h no escuro e durante 270 min irradiados com luz azul, respectivamente. Em B e E mostram os espectros do **GRBA** nas mesmas condições, respectivamente.

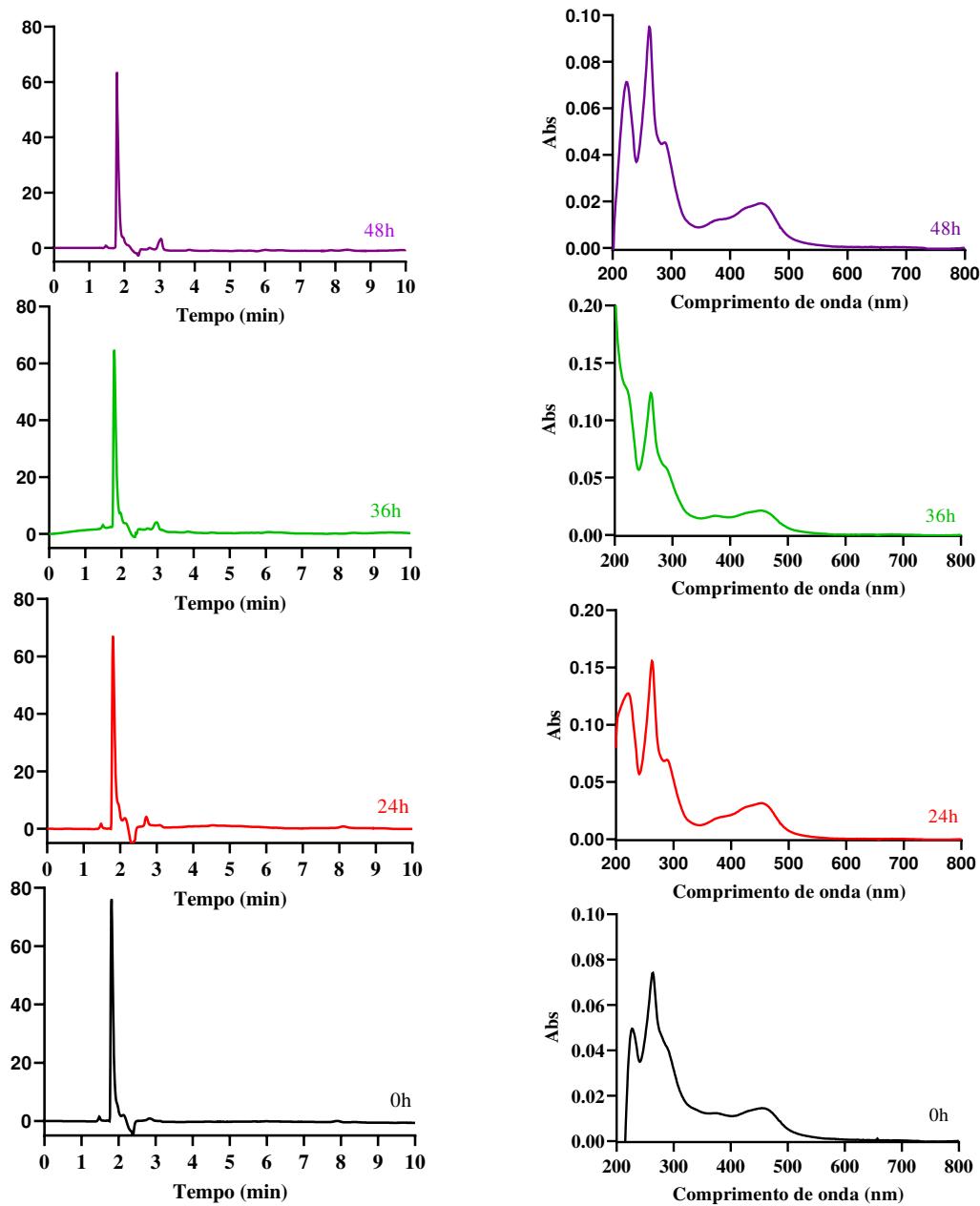


Fonte: Elaborada pelo autor.

O estudo de estabilidade monitorado por HPLC também demonstrou a estabilidade de ambos complexos. O complexo **GRBA** apresentou um tempo de retenção de 3,64 min, enquanto o **GRPA** um tempo de 1,8 min nas condições estabelecidas de trabalho (Figura 19 e Apêndice K). Esses tempos de retenção foram consistentes ao longo das 48 horas de monitoramento, no qual não ocorreu mudanças significativas na intensidade dos picos e nem o aparecimento de picos adicionais. Além disso, quando irradiados, não foram observadas mudanças na intensidade dos picos nem nos tempos de retenção, corroborando com a estabilidade dos complexos sob condições de irradiação de luz.

Os complexos precursores $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-COOH})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-COOH})]^{2+}$ foram utilizados como referências para confirmar a ausência de liberação de ligantes, rompimento de ligação amídica e ou impurezas dos precursores. Os tempos de retenção dos complexos precursores foram de 1,8 min, 1,73 min, 1,82 min e 1,71 min, respectivamente (Apêndices L e M). Esses tempos de retenção distintos permitiram a identificação precisa dos complexos finais e confirmaram sua pureza e estabilidade.

Figura 19 – Estudo de estabilidade do complexo **GRPA** monitorado por HPLC durante 48 horas, com injeções de 20 μ L em uma fase móvel de 15% de acetonitrila e 85% de NaTFA a 0,1% pH 3,5.



Fonte: Elaborada pelo autor.

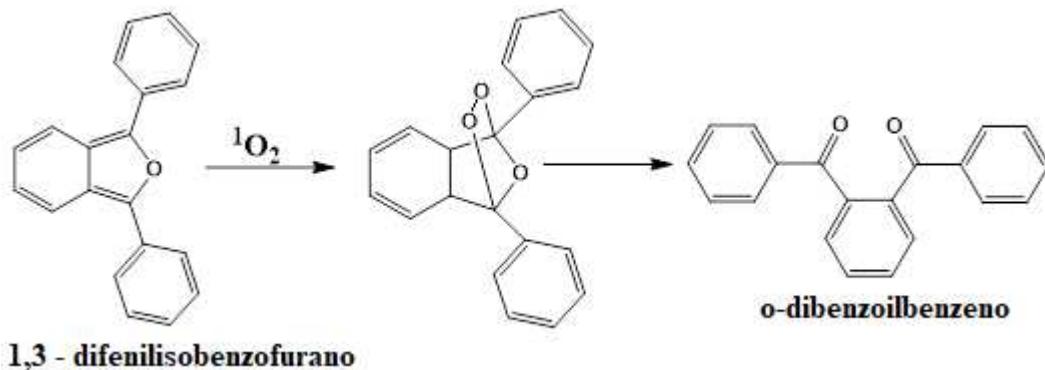
Os estudos de estabilidade indicam que os complexos **GRPA** e **GRBA** são altamente estáveis tanto na ausência quanto na presença de luz, mantendo suas estruturas e propriedades químicas por pelo menos 48 horas (Figura 19). Esses resultados são fundamentais para a

compreensão do comportamento desses complexos em ambientes biológicos, cuja estabilidade é um fator essencial para sua eficácia terapêutica.

4.3 Estudo de geração de oxigênio singlete

O rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$) foi determinado pela reação do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) com a possível geração da espécie ${}^1\text{O}_2$ produzida pelos complexos sob irradiação. A reação foi monitorada por meio da técnica de fluorescência, utilizando o DPBF como sonda para detectar a presença dessa espécie. 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 ${}^1\text{O}_2$. Esse consumo pode ser expresso como uma função do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ).^{111,134} A Figura 20 ilustra a equação química que representa a reação de fotodegradação do DPBF promovida pelo oxigênio singlete.

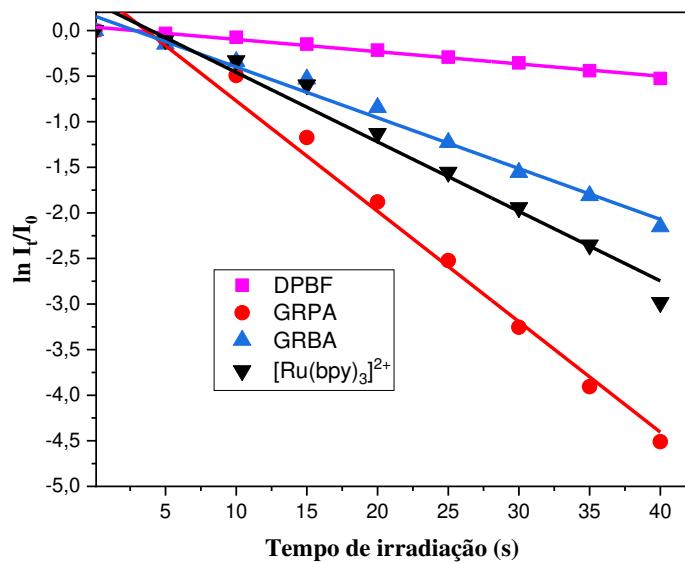
Figura 20 – Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete.



Fonte: Elaborada pelo autor.

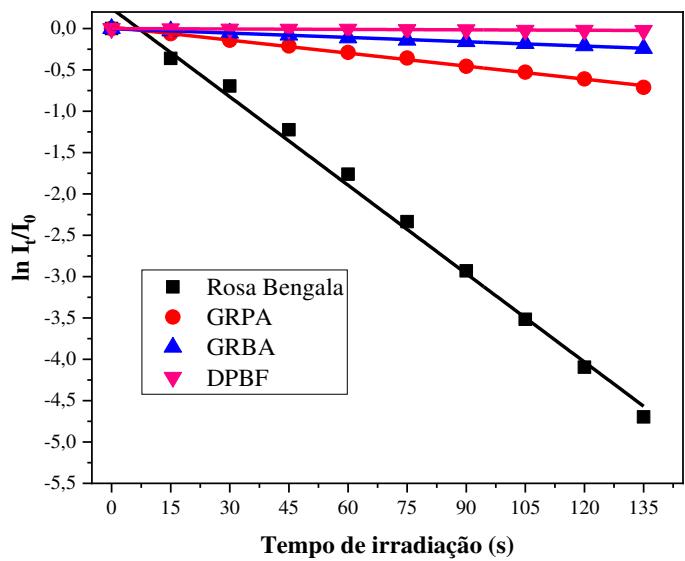
Os espectros de emissão da fotodegradação do DPBF na presença e na ausência dos complexos **GRPA** e **GRBA**, irradiado com LED azul são apresentados no Apêndice N, enquanto os espectros sob irradiação de luz verde e vermelho encontram-se nos apêndices O e P. Os valores de Φ_Δ foram calculados usando os dados da regressão linear das curvas cinéticas apresentadas nas Figuras 21, 22 e 24 juntamente com a Equação 1. Os compostos $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($\Phi_\Delta=0,87$)¹¹², rosa de bengala ($\Phi_\Delta=0,76$) e azul de metíleno ($\Phi_\Delta=0,50$)⁸⁷ foram utilizados como padrões de referência para as medidas de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, sob irradiação com luz azul, verde e vermelha, respectivamente.

Figura 21– Curvas cinéticas do consumo de DPBF ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de irradiação dos complexos ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em metanol (LED azul).



Fonte: Elaborada pelo autor.

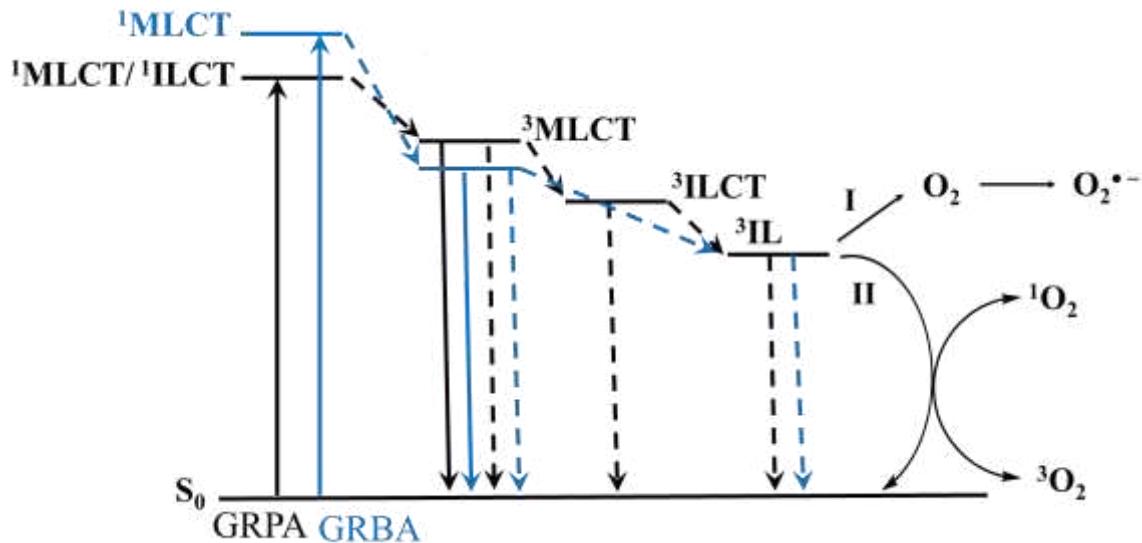
Figura 22 – Curvas cinéticas do consumo de DPBF ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de irradiação dos complexos ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em metanol (LED verde).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Observam-se valores bastante elevados para ambos os complexos na fotogeração de oxigênio singlete (Tabela 7). O estado $^3\text{MLCT}$ dos complexos polipiridínicos de Ru atuam como um eficiente canal de transferência de energia para excitar o $^3\text{O}_2$ devido à proximidade dos níveis energéticos.^{111,130,135} Adicionalmente, os complexos **GRPA** e **GRBA** apresentam o ligante antraceno, o qual apresenta uma energia de ^3IL ($\sim 15380\text{ cm}^{-1}$) menor do que para o $^3\text{MLCT}$ do Rubpy ($\sim 17100\text{ cm}^{-1}$), possibilitando uma eficiente transferência de energia, como ilustrado na figura 23. Assim, o processo de transferência de energia para o oxigênio molecular é ainda mais facilitado. O complexo **GRPA** apresentou melhor desempenho, com valor de $\Phi_{\square} = 0,95$, devido neste caso, ter além do ^3IL , o estado $^3\text{ILCT}$ de menor energia. O fato do ligante fenantrolina ser um melhor \square receptor, alterou as energias das transições eletrônicas, possibilitando no complexo GRPA a existência desta transição, conforme se comprova tanto no espectro de UV-Vis como no voltamograma cíclico (potencial de oxidação do antraceno).¹³⁵⁻

Figura 23 – Diagrama hipotético de energia dos compostos GRBA e GRPA.



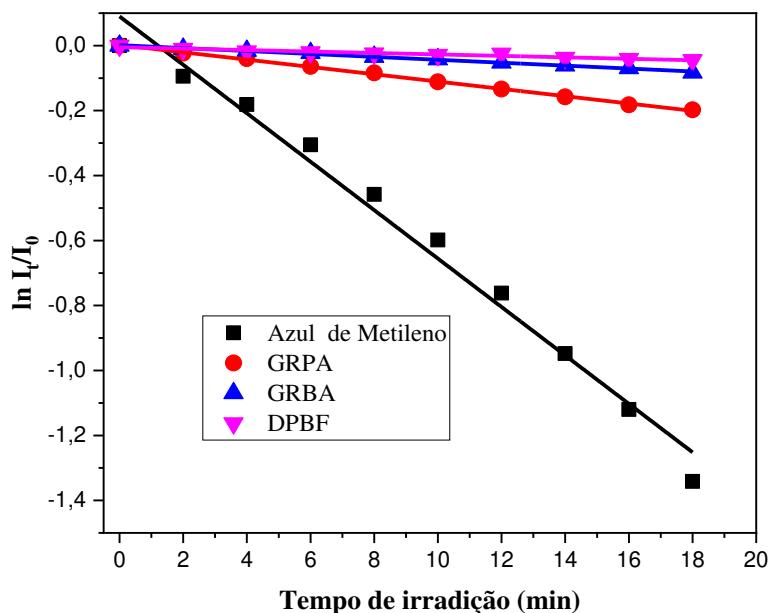
Fonte: elaborada pelo autor.

Quando irradiado com luz verde o **GRPA** apresentou $\Phi_{\Delta}=0,22$, 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 ($\Phi_{\Delta}=0,50$). Observa-se um menor Φ_{\square} para o complexo **GRPA** ($\Phi_{\Delta}=0,11$), o resultado se mostra consistente com o esperado devido a menor energia da luz vermelha, e menor potencial

absorção de luz. Esses valores são bastante satisfatórios considerando que o **GRBA** não apresentou rendimento quântico mensurável nessas condições.

Esses resultados indicam o potencial desses complexos metálicos como sistemas eficientes para a geração de espécies de oxigênio singlete, destacando a importância do grupo antracenil junto com os ligantes fenantrolina, melhorando a fotossensibilidade geral dos complexos de rutênio. Para além disto, outras modificações nos ligantes auxiliares também devem ser cuidadosamente consideradas. Um composto análogo de **GRBA** contendo ligantes dicarboxílicos-2,2'-bipiridinas⁹⁵ apresentou um rendimento quântico mais elevado de oxigênio singlete com luz azul ($\Phi_{\Delta} = 0,76$).⁹⁵ No entanto, estes substituintes carboxílicos alteraram de forma bastante expressiva a solubilidade do complexo metálico, tornando-os mais difíceis de realizar quaisquer investigações adicionais.

Figura 24 – Curva cinética do consumo de DPBF (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de irradiação dos complexos (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em metanol (LED vermelho).



Fonte: Elaborada pelo autor.

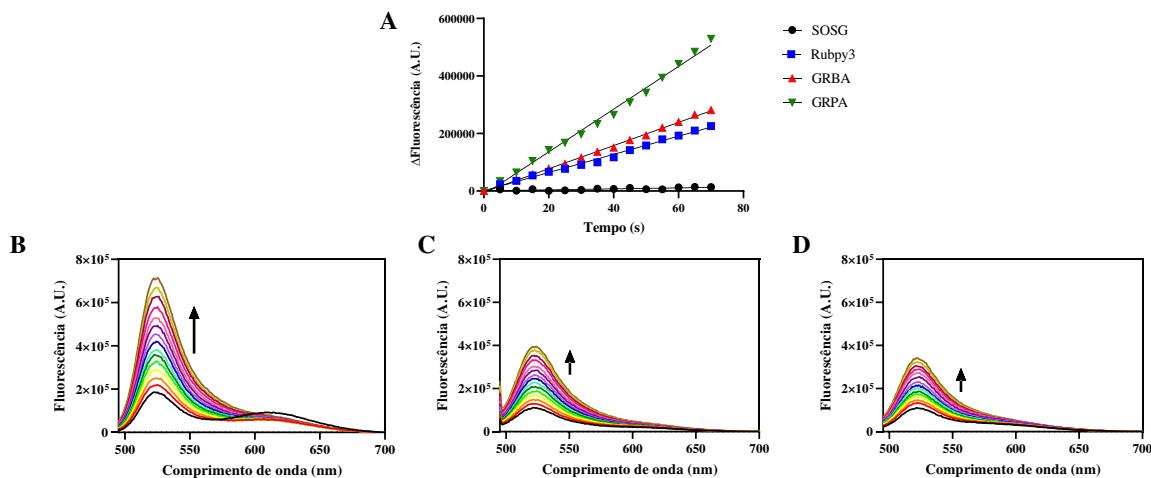
Tabela 7 – Valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_{\square}) sob irradiação de luz azul, verde e vermelha. (Para DPBF, $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm. Para SOSG, $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm).

Composto	* Φ_{Δ} (azul) Metanol	* Φ_{Δ} (verde) Metanol	* Φ_{Δ} (vermelha) Metanol	** Φ_{Δ} (azul) Metanol	** Φ_{Δ} (azul) Água
GRPA	0,95 ($\pm 0,02$)	0,22 ($\pm 0,02$)	0,11 ($\pm 0,03$)	0,94 ($\pm 0,03$)	0,96 ($\pm 0,01$)
GRBA	0,45 ($\pm 0,02$)	0,04 ($\pm 0,01$)	0,032 ($\pm 0,01$)	0,52 ($\pm 0,06$)	0,52 ($\pm 0,02$)
[Ru(bpy)(bpy-anth)(dppz)]²⁺	0,76 ⁸⁸	0,031 ⁸⁹	0,20 ⁸⁹	-	-
[Ru(bpy)₃]²⁺		-	-	0,89	0,41

Fonte: Elaborada pelo autor. * $^1\text{O}_2$ medido pela sonda DPBF. ** $^1\text{O}_2$ medido pela sonda SOSG.

Apesar da utilização comum do DPBF como sonda para detectar oxigênio singlete, existem relatos que apontam para a sua falta de seletividade,¹³⁸ podendo o radical superóxido ser também detectado e haver um falso positivo para oxigênio singlete.¹³⁹ A fim de evitar este eventual problema, foi medido a geração de oxigênio singlete utilizando uma sonda comercial altamente seletiva, conhecida como sensor verde de oxigênio singlete (SOSG).¹⁴⁰ Para além de uma seletividade superior, esta sonda também pode ser utilizada em meio aquoso, permitindo mensurar um rendimento quântico relativo nessas condições. Assim, efetuou-se medições em metanol, para comparar com o DPBF, e também em água ultrapura ($\sim \text{pH } 7,0$). Para este ensaio, foi possível observar a fotoprodução expressivamente forte de oxigênio singlete por **GRPA** em comparação com **GRBA** em água ou metanol (Figura 25). Notavelmente, **GRPA** ($\Phi_{\Delta} = 0,96$) mostrou quase o dobro do rendimento quântico de oxigênio singlete relatado para $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em água ($\Phi_{\Delta} = 0,41$),¹¹² apoiando seu aumento de eficiência mesmo sob condições supressoras.

Figura 25 – Medidas da geração de oxigênio singlete sob irradiação de luz azul usando a sonda SOSG ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) em metanol (sonda $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$). Em A mostra uma mudança linear da fluorescência durante a irradiação com luz azul em metanol para SOSG (preto), **GRPA** (verde), **GRBA** (vermelho) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (azul). Em B, C e D mostram os espectros de emissão para SOSG com **GRPA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), **GRBA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) durante a irradiação com luz azul.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Geração de radical superóxido

Outra espécie reativa de oxigênio importante é o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que pode ser produzido por meio de processos fotoquímicos. Esta espécie reativa foi investigada utilizando uma sonda seletiva como o azul de nitrotetrazólio (NBT).¹⁴¹ Ensaios *in vitro* foram realizados para analisar a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em uma solução contendo NBT, complexos **GRBA** ou **GRPA** e glutationa reduzida (GSH). Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 7,4, a 25°C por 100 minutos. Amostras de controles também foram preparadas, com uma combinação dos complexos metálicos com NBT e outra combinando apenas GSH e NBT, as quais foram irradiadas com luz ou monitoradas no escuro (Figura 26).

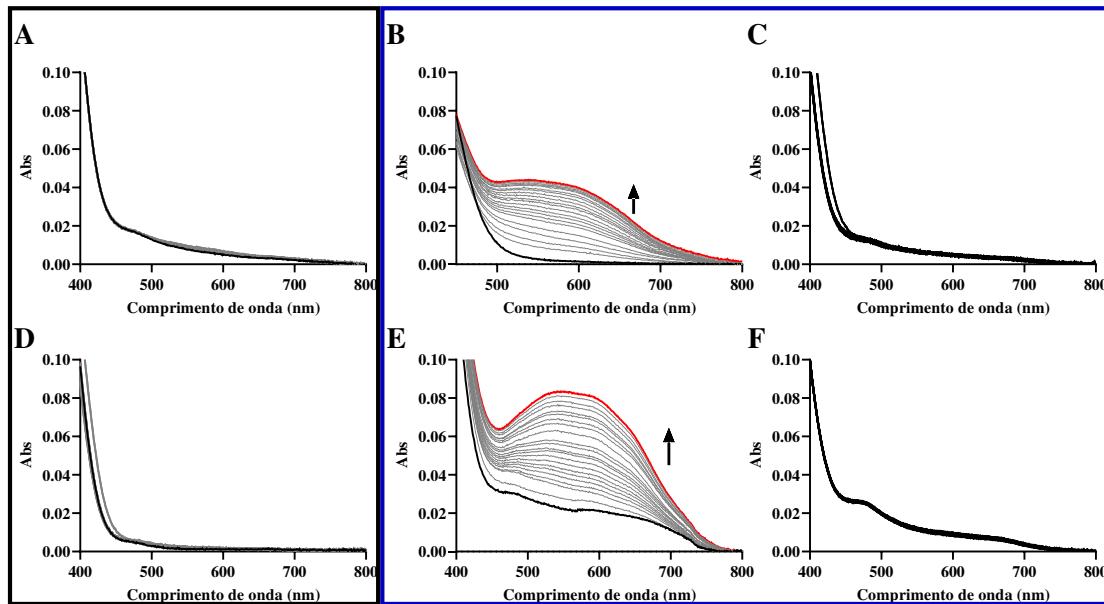
Nos controles não houve mudanças espectroscópicas em todas as amostras investigadas, nem o aparecimento da banda de absorção em torno de 590 nm, mesmo quando os complexos metálicos foram combinados com GSH e NBT no escuro, indicando a ausência de geração de radical superóxido.

No entanto, quando a luz azul foi empregada, juntamente com GSH, há uma mudança significativa no perfil do espectro eletrônico com uma banda larga e intensa observada em torno

de 590 nm (Figuras 26B e 26E). Este perfil é típico da redução do NBT promovida pela reação do superóxido com a formação do produto formazan, o que indica que sob irradiação de luz azul, este radical é produzido. Ao comparar a geração de radicais superóxido promovida por ambos os complexos metálicos, observamos que o **GRBA** produziu esta espécie cerca de 1,8 vezes mais eficientemente que o **GRPA** (Apêndice Q). Além disso, na cubeta, é visto uma mudança de cor da solução, passando de amarelo pálido para uma solução roxo azulada com posterior formação de precipitado, sendo consistente com a formação do formazan com uma banda em 590 nm. Importante mencionar que essa mudança promovida pelo complexo metálico não é vista na ausência de GSH e luz (Apêndice Q). Com isto, é observado que ambos os estímulos são essenciais para garantir a produção de superóxido.

Para validar ainda mais que o superóxido está de fato sendo produzido, adicionou-se a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta enzima pode decompor rapidamente o superóxido em oxigênio e água, atuando como um agente de eliminação eficiente dessa espécie. Ao adicionar esta enzima na mistura de reação que continha todos os componentes (complexos metálicos, NBT e GSH), e submeter à irradiação com luz azul foi observado que não houve mudanças significativas em 590 nm (Figura 26C e 26F), corroborando nossas observações anteriores. Este processo de fotoreação pode requerer GSH para fornecer elétrons para uma produção cíclica de superóxido. Notavelmente, o **GRBA** foi o mais eficiente na fotogeração do radical superóxido por meio de um mecanismo fotoquímico do tipo I. Isso pode ser relevante para aplicações relacionadas à terapia fotodinâmica e outras áreas de investigação, cuja produção controlada deste radical reativo é desejada.

Figura 26 – Detecção de superóxido usando NBT ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), GSH ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e **GRPA** ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), monitorada por 100 minutos no escuro (A), com irradiação de luz azul por 100 minutos (B) e na presença de SOD com irradiação de luz azul (C); e de forma semelhante para **GRBA** ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) no escuro (D), com irradiação de luz azul (E) e na presença de SOD com irradiação de luz azul (F). Todas as reações foram realizadas a 25°C .



Fonte: Elaborada pelo autor.

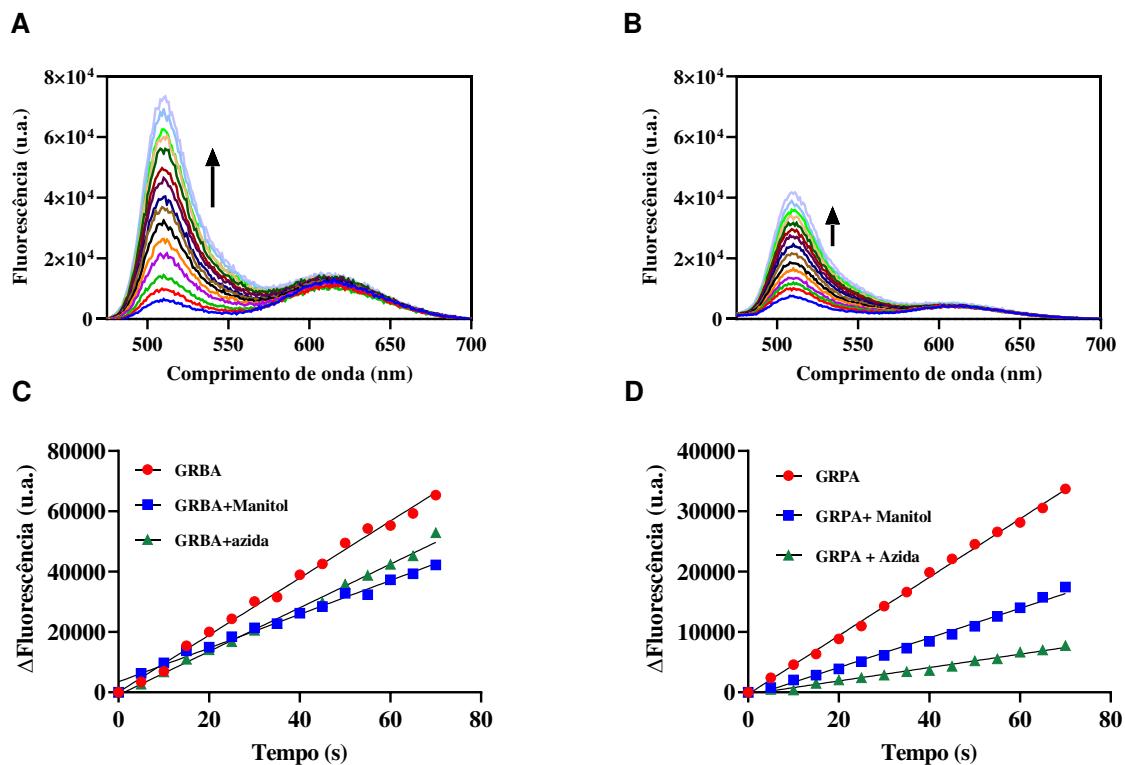
4.5 Geração de radical hidroxila

O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é a espécie reativa mais oxidante reportada devido ao seu potencial redox ($E^\circ(\text{HO}\cdot/\text{H}_2\text{O}) = 2.34\text{V}$).^{142,143} Sua alta reatividade torna-o agente oxidante extremamente eficaz, capaz de induzir danos em uma ampla gama de biomoléculas. Para a detecção de radical hidroxila, utilizou-se a sonda 3'-(p-aminofenil)fluoresceína (APF), conhecida por sua seletividade e sensibilidade ao $\cdot\text{OH}$. No entanto, estudos mostraram que a APF pode reagir também com oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$),^{95,143} assim, foi empregado sequestradores específicos de $\cdot\text{OH}$ (D-manitol) e de ${}^1\text{O}_2$ (azida de sódio) para distinguir as espécies reativas geradas. Os experimentos foram realizados sob irradiação de luz azul em metanol.

Os resultados mostraram que o complexo **GRBA** apresentou uma taxa de fotoprodução de radical hidroxila cerca de duas vezes maior que o **GRPA** (Figura 27). Este resultado é significativo, pois sugere que **GRBA** possui uma maior eficiência fotocatalítica na geração de $\cdot\text{OH}$ sob irradiação de luz azul. Essa eficiência pode estar relacionada às diferenças estruturais

entre os complexos que influenciam a transferência de energia. Além disso, a sensibilidade aumentada do **GRPA** à azida de sódio indica uma maior produção de oxigênio singlete, resultado que corrobora com os experimentos realizados na presença de DPBF e SOSG, indicando a geração de 95% de oxigênio singlete por este complexo.

Figura 27 – Ensaio da produção de radical hidroxila sob irradiação de luz azul usando a sonda APF ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato de 100 mmol L^{-1} , pH 7.4 ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$). Em A e B mostram os espectros de emissão para APF com **GRBA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e **GRPA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e também com a adição de manitol (10 mmol L^{-1}) ou azida de sódio (10 mmol L^{-1}), durante a irradiação de luz azul. Em C e D mostram uma mudança linear de fluorescência durante a irradiação de luz em tampão fosfato para APF com **GRBA** e **GRPA**, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Estudo de interação com DNA

4.6.1 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.¹⁴⁴ As quantidades de DNA foram adicionadas sequencialmente e as mudanças provocadas nos perfis espectrais estão ilustrados nas Figuras 28 e 29.

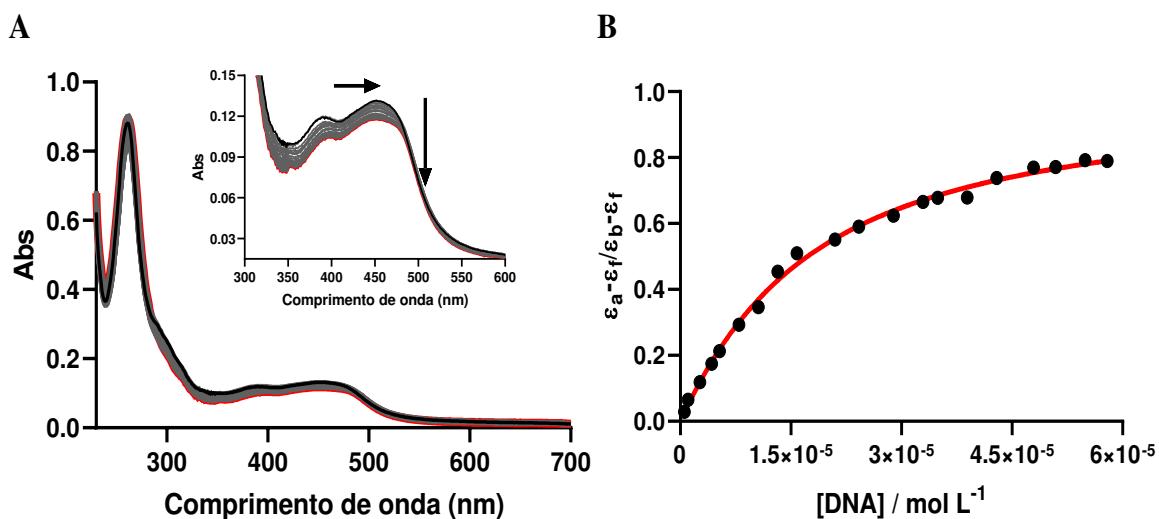
A grandeza dessa interação complexo-DNA, para os complexos **GRBA** e **GRPA**, foi avaliada usando a constante de ligação de DNA (K_b), que pode ser calculada a partir da diminuição da absorbância nas bandas de absorção durante a titulação.

Ao titular CT-DNA em uma solução contendo **GRPA**, observa-se que ocorre um efeito de hipocromismo de 11,3% da banda intraligante e de 18,15% da banda de transferência de carga a 450 nm, além disso há um deslocamento batocrômico de 2 nm nesta banda para o complexo **GRPA** (Figura 28). Esse perfil não garante o modo de interação complexo-DNA, mas a extensão do hipocromismo pode sugerir uma possível interação intercalativa desse complexo.^{145,146}

O hipocromismo e o leve deslocamento batocrômico podem ser explicados através do empilhamento ordenado presente entre os pares de bases do DNA após a intercalação. O orbital π^* do ligante, no caso a fenantrolina, fica livre para interagir com o orbital π das bases do DNA, diminuindo a energia de transição $\pi-\pi^*$. Assim, o orbital π fica parcialmente preenchido por elétrons e consequentemente diminuirá as possibilidades de transições, resultando no hipocromismo das bandas.¹⁴⁷

A fim de obter a constante intrínseca de ligação (K_b) para a interação do **GRPA** com CT-DNA utilizou-se a equação 2 para o tratamento dos dados. Com base nas medidas, foi possível calcular o valor para K_b de $4,51 (\pm 0,2) \times 10^4$ a 25°C , valor ainda moderado, mas consistente com os valores de K_b encontrados na literatura para compostos metálicos similares com mecanismo de interação por intercalação, como $[\text{Ru}(\text{phen})(\text{dicnq})_2]^{2+}$ ($K_b = 3,30 \times 10^4$)¹⁴⁸ e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($K_b = 2,80 \times 10^4$).¹⁴⁹ Esse valor ainda é moderado se comparado a outros compostos metálicos com mecanismo de interação indiscutível por intercalação, por exemplo, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ($K_b = 3,2 \times 10^6$).¹⁵⁰ Na Tabela 8 apresenta-se diferentes complexos citados na literatura com características intercalativas e suas respectivas constantes de ligação.

Figura 28 – Medidas de ligação ao DNA. Os gráficos mostram a titulação de **GRPA** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência de CT-DNA (–) e na presença de quantidades crescentes de CT-DNA monitorada por espectroscopia de absorção eletrônica (A), gráfico de $(\varepsilon_a - \varepsilon_f) / (\varepsilon_b - \varepsilon_f)$ vs [DNA] (B) em Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 a 25 °C.

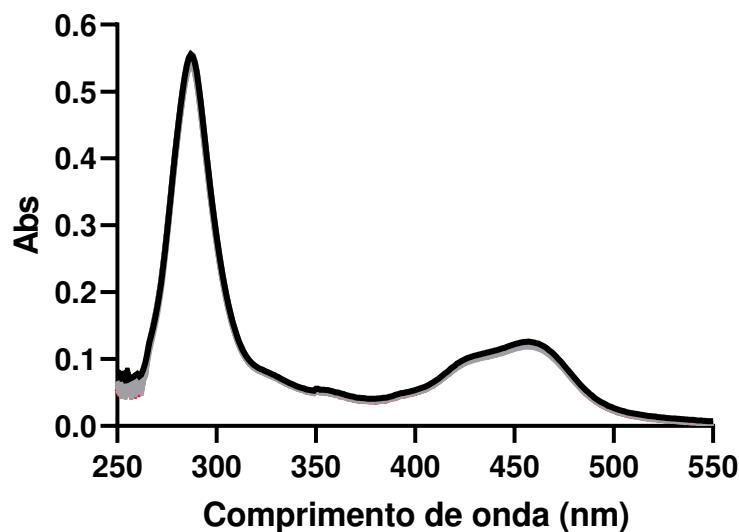


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para **GRBA** não ocorreram mudanças significativas no perfil espectral indicando que, provavelmente, não há interação relevante do complexo metálico com o DNA (Figura 29). Comparando os complexos **GRBA** e **GRPA**, esse comportamento pode ser devido a diferenças estruturais entre os complexos, uma vez que o **GRPA** possui ligantes com maior área de estrutura planar, tendo um efeito expressivo do ligante auxiliar fenantrolínico que possui grande hidrofobicidade, mostrando um valor considerável de K_b e levando à uma expressiva afinidade com o DNA.¹⁵¹

É importante mencionar que um complexo metálico análogo, contendo dois ligantes dicarboxílicos-2,2'-bipiridina em vez de 2,2'-bipiridina como no **GRBA**, mostrou ligação mensurável ao DNA ($K_b = 5 \times 10^4$)⁹⁵ em proximidade ao **GRPA**. Este resultado sugere que a ligação ao DNA pode ser muito sensível até mesmo a pequenas modificações no ligante auxiliar, cujos grupos substituintes, ainda que pequenos, podem influenciar mesmo incorporando cargas negativas.

Figura 29 – Espectro de absorção eletrônica do complexo **GRBA** na ausência de CT-DNA e na presença de quantidades diferentes de CT-DNA em tampão 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 – Constantes de ligação ao DNA (K_b) para diferentes complexos metálicos de rutênio.

Complexos	K_b
GRPA	4,50 ($\pm 0,2$) x 10 ⁴
GRBA	-
[Ru(bpy) ₃] ²⁺ ¹¹⁴	0,7 x 10 ³
[Ru(phen) ₃] ²⁺ ¹¹⁴	3,1 x 10 ³
[Ru(bpy) ₂ (dppz)] ²⁺ ¹⁵²	3,20 x 10 ⁶
[Ru(phen) ₂ (dppz)] ²⁺ ¹⁵³	2,10 x 10 ⁶
[Ru(phen)(dicnq) ₂] ²⁺ ¹⁴⁸	3,30 x 10 ⁴
[Ru(bpy)(bpy-anth)(dppz)] ²⁺ ⁸⁸	6,04 x 10 ⁶

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

A interação dos complexos **GRPA** e **GRBA** com o DNA também foi investigada pela técnica de luminescência. Essa técnica pode ser ainda mais sensível a essas interações, ajudando a validar esse fenômeno. Neste caso, um aumento significativo de intensidade da banda de

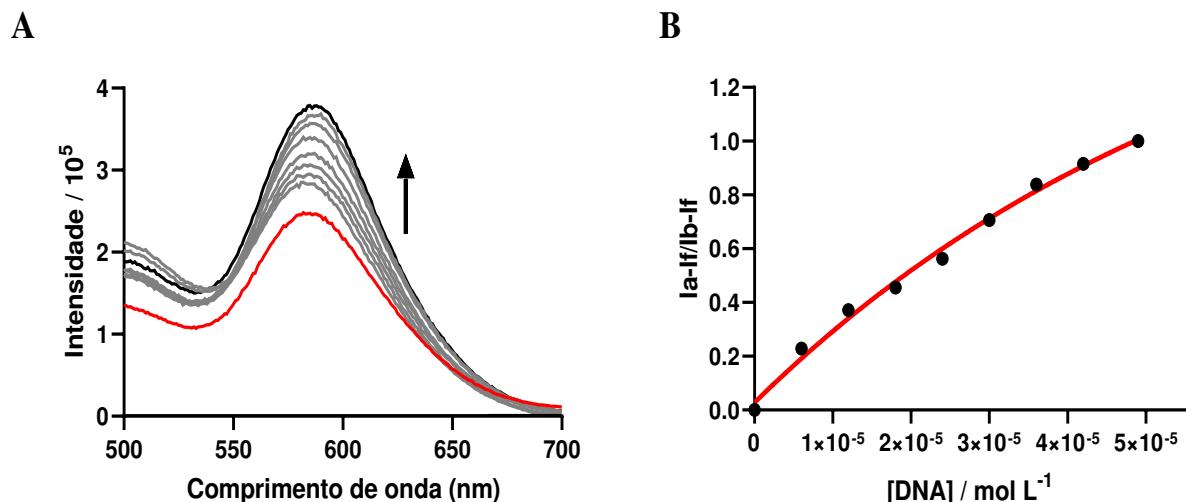
emissão é geralmente observado para modos intercalativos de interação com o DNA enquanto que a diminuição da intensidade é visto para agentes com ligação aos sulcos, envolvendo interações eletrostáticos, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas.¹⁵⁴

Após adição do CT-DNA na solução, observou-se um aumento gradativo da banda de emissão apenas para o complexo **GRPA** (Figura 30). O aumento da intensidade de emissão do complexo com o aumento da concentração de DNA sugere a interação complexo-DNA, o que reduz rotas de desativação e maximiza emissão. 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.^{147,155} Assim, a estrutura do complexo fica também mais rígida e há menor perda de energia por rotas de transferência de energia não radiativa.

O experimento foi repetido com o complexo GRBA (Figura 31). No entanto, assim como nos resultados obtidos por espectroscopia de absorção eletrônica, não houve alteração no perfil espectral do GRBA quando monitorado por espectroscopia de emissão, indicando ausência de interação significativa com o CT-DNA.

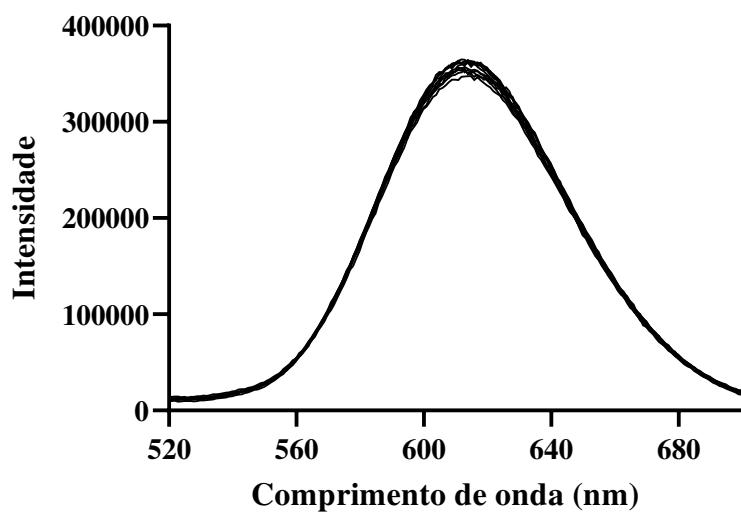
Os dados foram analisados e o valor de K_b foi calculado a partir da equação 3, resultando em um K_b de $1,57 (\pm 0,15) \times 10^4$ (ou $K_d = 64 \pm 6 \mu\text{mol L}^{-1}$). Este valor é comparável com o previamente medido por espectroscopia de absorção eletrônica ($4,51 \times 10^4$), reforçando a característica de interação do complexo metálico com o DNA. Esse comportamento com a interação do DNA tem sido amplamente descrito para outras moléculas intercaladoras semelhantes,^{88,89,95} onde a ligação ao DNA ocorre envolvendo microambientes hidrofóbicos, protegendo o complexo metálico do meio aquoso. Quando o complexo metálico é intercalado, ele é estabilizado pela interação de empilhamento $\pi-\pi$, induzindo mudanças estruturais no DNA. Dessa forma, esse possível modo de interação acaba causando mudanças estruturais no próprio DNA, conferindo estabilidade, rigidez e desenrolamento da estrutura da dupla hélice.¹⁴⁷

Figura 30 – Espectro de emissão do complexo **GRPA** 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.

Figura 31 – Espectro de emissão do complexo **GRBA** na ausência de CT DNA (□) e na presença de quantidades crescentes de CT DNA em tampão Tris-HCl pH 7,5.



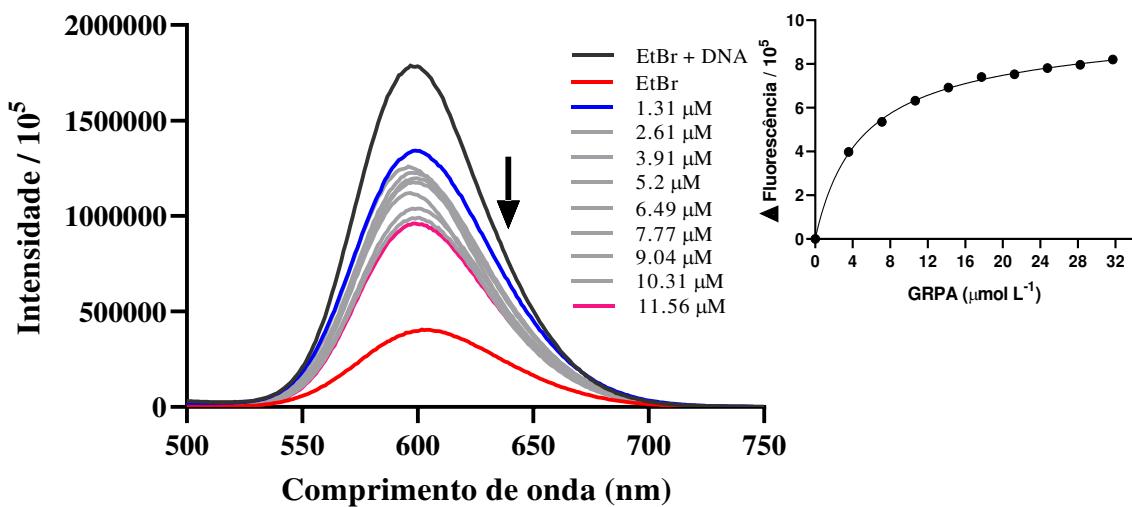
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.3 Competição com Brometo de Etídio

O brometo de etídio (EtBr) (Atenção: reagente mutagênico) é um fluoróforo conhecido por interagir com o DNA por intercalação, estabelecendo-se entre os pares de bases nitrogenadas.¹⁵⁶ O BE exibe baixa fluorescência em solução aquosa, porém na presença de CT-DNA a fluorescência aumenta expressivamente, devido à sua intensa intercalação. Ele tem sido empregado em ensaios de competição frente a outros agentes intercalantes, pois, foi visto que, essa forte fluorescência de BE existente na presença de DNA pode ser reduzida pela adição de um competidor.¹⁵⁷ Essa estratégia fornece algumas evidências do modo de interação intercalativa, bem como a força de ligação do composto em relação ao DNA.¹⁵⁵

A fim de reforçar a natureza intercalante do complexo **GRPA** foi realizado um estudo de competição na presença do brometo de etídio (Figura 32). O deslocamento e intensificação da banda do aduto BE-CT DNA foi monitorado durante titulação com o complexo **GRPA**.

Figura 32 – Espectro de fluorescência de BE (–) ($\lambda_{exc} = 480$ nm) na presença de CT-DNA (–) a crescentes concentrações de complexo metálico **GRPA** (0 - 11,57 μM) em tampão Tris-HCl pH 7,5. $[\text{BE}] = 1,5\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{DNA}] = 10\mu\text{mol L}^{-1}$. Inset: Gráfico $I_0/I \times [\text{complexo}]$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os espectros de fluorescência da Figura 31, observou-se um aumento consistente de intensidade bem como um deslocamento do máximo da banda emissão de 600 nm para 596 nm logo após adição de CT DNA 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 um processo de competição estava ocorrendo entre o complexo **GRPA** e BE na interação com o DNA.¹⁴⁷ Todavia, observa-se que não há uma diminuição total da banda de emissão mesmo após adição de $11,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo metálico para atingir BE totalmente deslocado. Esse comportamento pode ser atribuído à emissão intrínseca do próprio complexo metálico, inclusive melhorado na presença de DNA. Sendo assim, a luminescência do complexo contribui para a emissão total dos espectros.^{88,89,152}

O resultado da titulação espectrofluorimétrica de competição foi posteriormente analisado e estimado a afinidade do DNA, em que a constante de dissociação (K_d) foi de $4,7 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Este valor não está tão próximo daquele medido pela titulação direta de DNA, o que poderia indicar diferentes sítios de interação, sendo o BE um de alta afinidade para o **GRPA**. 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. No geral, esses estudos sustentam que **GRPA** é um agente capaz de interagir com DNA e pode funcionar *in vivo* através da interação com essa biomolécula.

4.6.4 Competição com Verde de metila e Hoechst

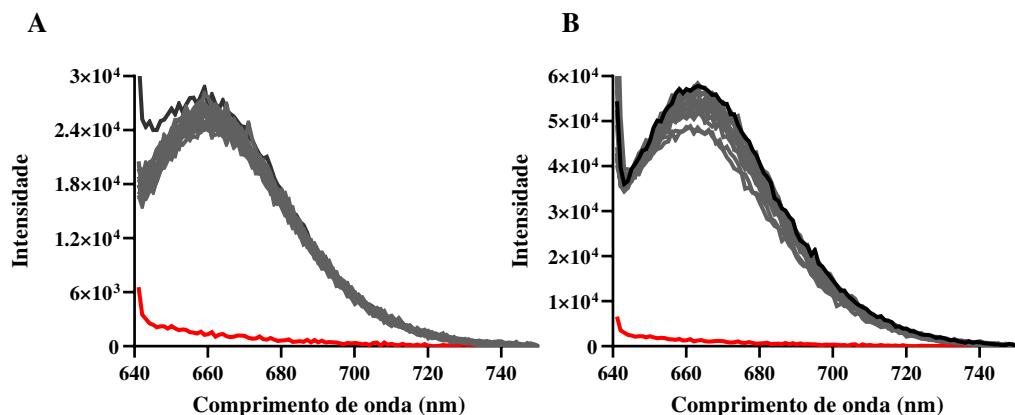
O ensaio de competição entre complexos metálicos e corantes específicos, como o verde de metila e o Hoechst, pelo DNA foi utilizado para explicar as preferências de interação dos complexos com os sulcos do DNA.^{88,158,159} Enquanto o Verde de Metila se liga preferencialmente ao sulco maior, o Hoechst se liga ao sulco menor. Assim, foi realizado um estudo de competição com os complexos **GRPA** e **GRBA**, no qual utilizou-se essas sondas fluorescentes.

Ao utilizar o Verde de Metila, observou-se apenas pequenas alterações após a titulação com ambos os complexos metálicos (Figura 33), sugerindo que não existe preferência significativa pelo sulco maior. Por outro lado, a intensidade de luminescência do Hoechst ligada ao CT-DNA diminuiu consideravelmente após a adição de **GRBA** ou **GRPA** (Figura 34), indicando que ambos os complexos metálicos apresentam uma maior preferência pela interação com o sulco menor do DNA.

Estas titulações forneceram também uma estimativa da força destas interações (Hoechst, $K_d = 0,140 \mu\text{mol L}^{-1}$),⁸⁸ em que K_d de $6,3$ e $9,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram medidos para **GRBA** e **GRPA**,

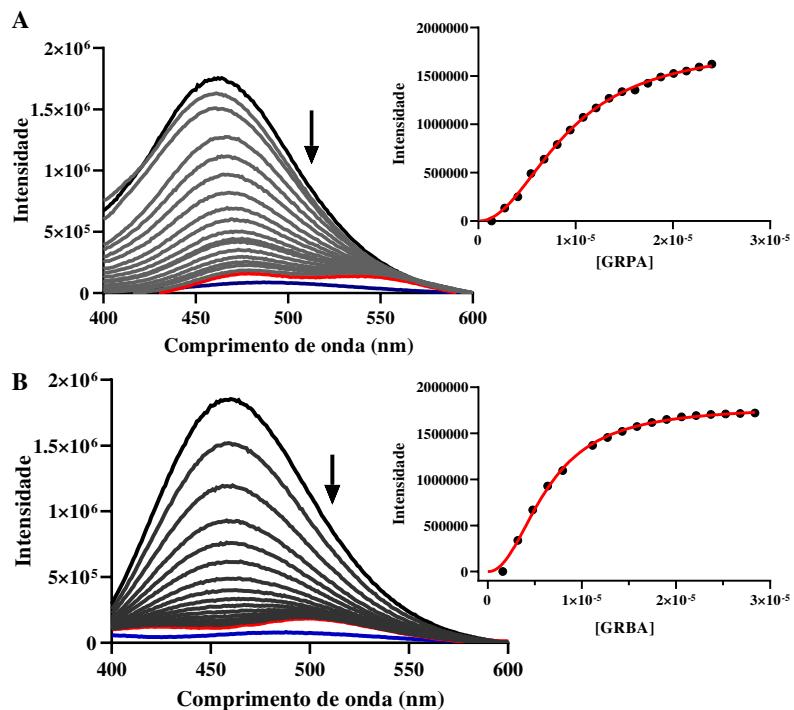
respectivamente. Esses resultados se mostraram bastante interessantes, visto que, no ensaio de interação complexo-DNA analisado por espectroscopia de absorção eletrônica, não foi observado qualquer interação significativa do **GRBA** com o DNA. A não detecção da interação pode ser devido a perturbações eletrônicas na interação ocorrendo um desequilíbrio na distribuição eletrônica do complexo, que ao interagir com o DNA, pode gerar um campo eletrônico desfavorável para a estabilização, o que limita a formação de interações intermoleculares e interações π - π .

Figura 33 – Espectro de emissão do Verde de Metila (—) na presença de CT-DNA (—) em diferentes concentrações de complexo (0-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), **GRPA** (A) e **GRBA** (B). [Methyl Green] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [CT DNA] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}}=340$ nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 34 – Espectro de emissão do Hoechst (—) na presença do CT-DNA (—) em diferentes concentrações dos complexos (0-28 $\mu\text{mol L}^{-1}$), **GRPA** (A) e **GRBA** (B). $[\text{Hoechst}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $[\text{CT DNA}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$.

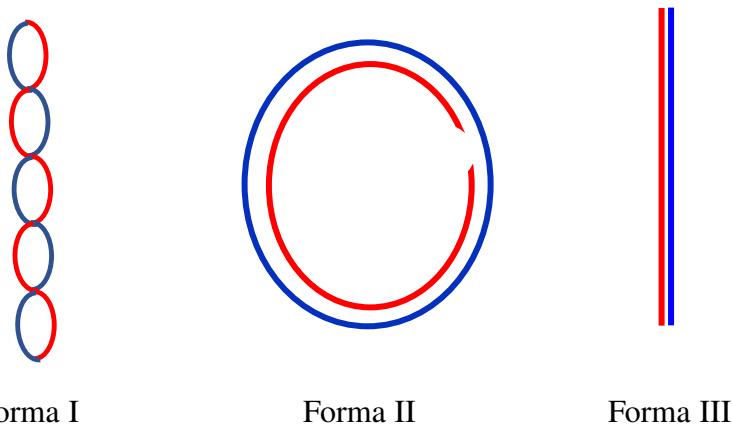


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.5 Ensaios de dano ao DNA por eletroforese em gel de agarose

Os compostos que causam danos ao DNA podem ser importantes para fins terapêuticos. No entanto, mesmo compostos que se ligam fracamente ainda podem causar danos eficientes, dependendo de como esse processo ocorre. Com o objetivo de esclarecer essa questão, investigamos a capacidade do **GRBA** e **GRPA** de clivar o DNA em resposta ao estímulo da luz. Estudos de fotoclidagem, utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose, foram realizados utilizando o DNA pBR322 no escuro e sob irradiação de luz (LED azul, $\lambda_{\text{irrad}} = 463 \text{ nm}$, LED verde, $\lambda_{\text{irrad}} = 520 \text{ nm}$ e LED vermelho, $\lambda_{\text{irrad}} = 693 \text{ nm}$) por 1 hora na presença dos complexos **GRPA** e **GRBA** (0,5 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a fim de verificar a fotodegradação do DNA plasmidial através da ligação complexo-DNA e geração de espécies radicalares. Após este tempo, todas as amostras foram carregadas num gel de agarose e foi aplicado um potencial elétrico para separação, seguido de coloração e imagem. O DNA plasmidial pBR322 pode se apresentar de três formas diferentes: forma I, forma II e forma III (Figura 35).

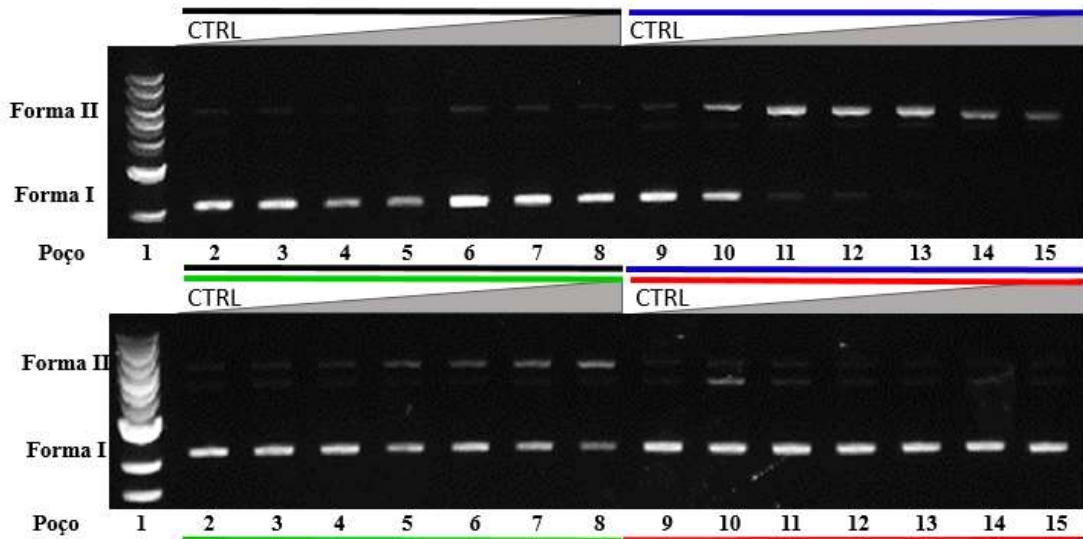
Figura 35 - Representação esquemática das três diferentes formas das moléculas de DNA plasmidial: Forma I (superenovelado), Forma II (circular) e Forma III (linear).



Fonte: Adaptado de METZLER-NOLTE, Nils; SCHATZSCHNEIDER, 2009.¹⁵⁷

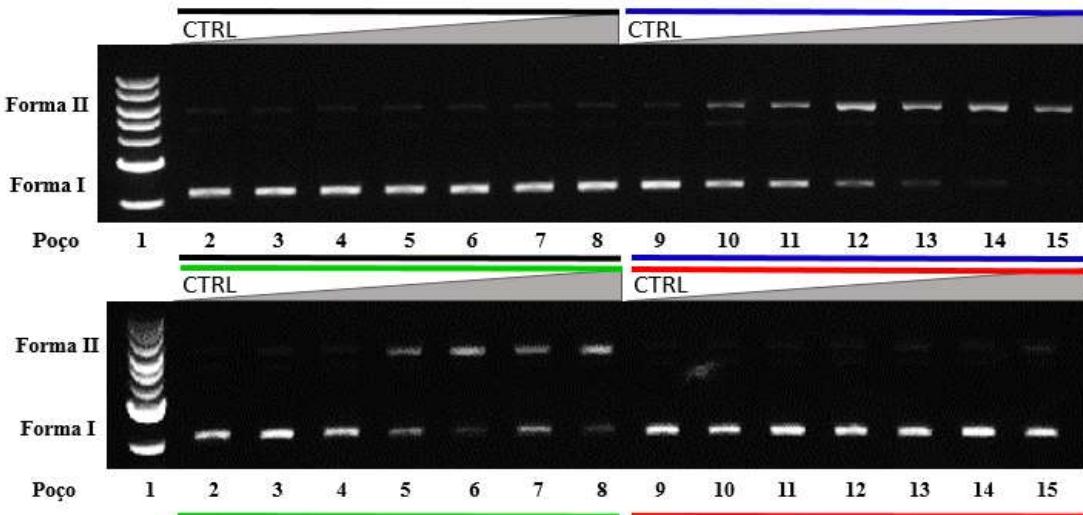
A forma I apresenta-se tensionada sendo chamada de superenovelada, quando sofre quebra em umas das fitas é chamada de circular aberta ou relaxada (forma II), estando clivada em um único ponto, quando ocorre a quebra nas duas fitas simples, chama-se fita linear (forma III).^{157,160} O controle utilizado sem complexo mostra o plasmídeo pBR322 superenovelado não danificado (Figura 36, forma I, poço 2).

Figura 36 – Fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do complexo **GRPA** 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: 0,5; 1; 3; 5; 7 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 37 – Fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRBA** 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: 0,5; 1; 3; 5; 7 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As figuras 36 e 37 mostram as respostas da clivagem do DNA promovida por **GRPA** e **GRBA** no escuro e sob irradiação. Os complexos incubados com DNA no escuro não mostraram evidência de clivagem do DNA. No entanto, sob irradiação de luz azul e verde ambos os complexos mostraram padrão de clivagem. O complexo **GRPA** mostrou fotoclivagem do DNA mais eficiente sob irradiação de luz azul em comparação ao complexo **GRBA**. Em $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ocorre o aparecimento da forma II (forma clivada em fita simples) e em $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ a forma I desaparece completamente com o aparecimento total da forma II. Já no complexo **GRBA**, a migração da forma I para a forma II ocorre lentamente nas concentrações $0,5$; 1 e $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, desaparecendo completamente a forma I em $5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os complexos também mostraram atividade de clivagem do DNA melhorada sob irradiação de luz verde na presença de DNA. É observado uma formação moderada de plasmídeo circular relaxado (forma II) na presença de ambos complexos a $3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Quando irradiado com luz vermelha os complexos não causaram efeito de clivagem, mesmo nas máximas concentrações dos complexos, apesar da moderada produção de oxigênio singlete observada para **GRPA**. Assim, podemos confirmar que o complexo **GRPA** ocasiona uma maior clivagem sob irradiação quando comparado ao **GRBA**, sendo visto esse perfil com o aumento das concentrações. Esses dados suportam a expectativa de que a combinação do ligante bipiridina modificado com antraceno juntamente com o ligante fenantrolínico têm papel importante no dano ao DNA.

Considerando que o máximo da transição MLCT do complexo **GRPA** (Figura 9) seja observada em torno de 450 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 7). Além disso, a fotoativação eficiente do complexo poderia ser explicada pela interação complexo – DNA considerando o valor encontrado da constante de ligação na ordem de 10^4 (Tabela 8).

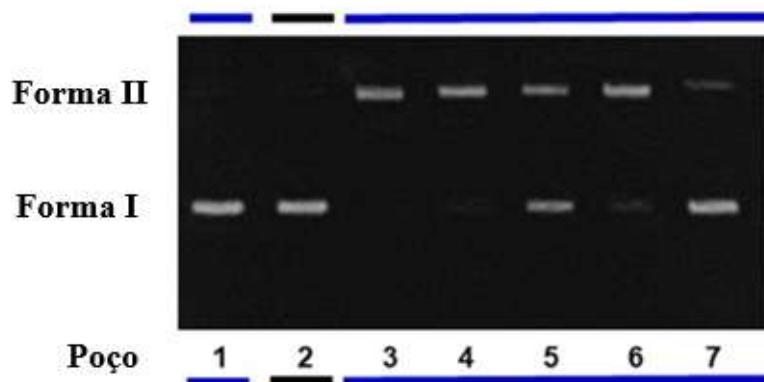
A fim de entender as espécies reativas envolvidas na fotoclivagem do DNA, realizou-se o ensaio de eletroforese em gel de agarose utilizando supressores padrões de ERO: Piruvato (H_2O_2), D-manitol (OH^\cdot), Histidina (${}^1\text{O}_2$) e Tiron (O_2^\cdot) juntamente com os complexos **GRPA** e **GRBA** ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) irradiados com luz azul durante 1h.

Para o **GRBA** (Apêndice R), foi observada uma pequena supressão da clivagem do DNA utilizando piruvato, histidina e D-manitol, que estão associados à inibição de peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radical hidroxila, respectivamente. Algumas dessas espécies também podem surgir de outras, como o peróxido de hidrogênio, que pode ser gerado a partir de superóxido ou também pode gerar espécies hidroxil. A produção de oxigênio singlete para

o **GRBA** foi medida e seu efeito era esperado devido ao seu rendimento de fotoprodução de 45%. No entanto, deve-se mencionar que esses rendimentos de fotoprodução foram medidos em solvente orgânico e apresentam valores bastante semelhantes em meio aquoso.^{107,108} Curiosamente, o Tiron causou uma redução expressiva na clivagem do DNA (Apêndice R, poço 7), indicando que esse dano é possivelmente causado pela geração de radical superóxido.

Para o **GRPA** (Figura 38, poço 6), houve uma diminuição significativa da clivagem do DNA na presença de histidina (supressor de oxigênio singlete). Além disso, uma supressão ainda mais forte do dano ao DNA foi observada quando o Tiron (supressor de superóxido) foi utilizado. Esses resultados indicaram que o **GRPA** causa fotoclivagem do DNA principalmente pela geração de ERO do tipo oxigênio singlete e radical superóxido. É importante notar que a fotogeração de mais de uma espécie reativa não é incomum e ocorre devido às múltiplas rotas de desativação fotoquímica disponíveis.

Figura 38 – Supressão de ERO em um ensaio de fotoclivagem usando DNA pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de **GRPA** (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após 1 h de irradiação com LED azul e com supressores de radicais. Poço 1: apenas DNA pBR322. Poço 2: DNA + complexos no escuro. Poço 3: DNA + complexos com irradiação de luz azul. Outros poços 4 – 7: DNA pBR322 + **GRPA** + supressor: piruvato (5), histidina (6), D-manitol (7) e tiron (8), respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, foi possível observar a capacidade aparentemente semelhante de fotodanificar o DNA para ambos os complexos metálicos, apesar das suas diferenças na geração de ERO e na interação ao DNA. O **GRPA** foi capaz de fotogerar quase o dobro de ${}^1\text{O}_2$, mas apenas cerca de metade de $\text{O}_2^{\cdot-}$ do que o **GRBA**. O tempo de vida destes radicais, o nível de produção, a eficácia relativa para danificar o DNA, juntamente com a sua proximidade do alvo, e a natureza do microambiente (por exemplo, o acesso ao empilhamento de bases na intercalação versus a

extremidade das bases na ligação ao sulco) devem influenciar os danos globais. Esta última questão é um aspecto relevante que envolve a proximidade dos alvos reativos e que pode influenciar os danos globais, especialmente tendo em conta as diferenças no tempo de vida das ERO. A forma como isto pode influenciar estes danos quando se emprega um composto de ligação moderada ao DNA (provavelmente através de intercalação) como o **GRPA** e outro com afinidade não mensurável ao DNA (provavelmente interação via sulco) como o **GRBA** é uma questão importante. No entanto, estes resultados realçaram a importância da irradiação de luz destes complexos metálicos para promover a clivagem do DNA, bem como a influência de diferentes espécies reativas de oxigênio no mecanismo de fotoclivagem.

4.7 Estudos de interação com diversas sequências de DNA por Dicroísmo Circular

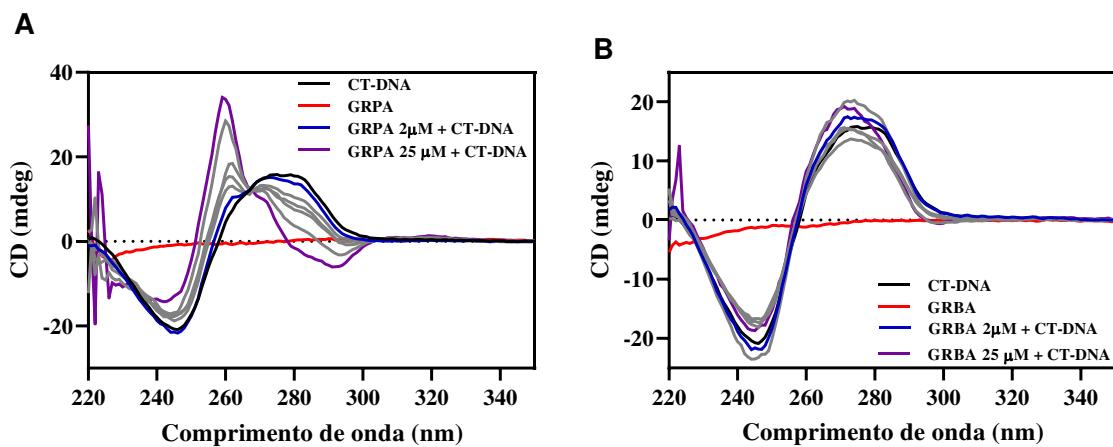
O dicroísmo circular (CD) foi usado a fim de fornecer mais informações sobre a interação dos complexos metálicos com o DNA. Esta técnica nos permite analisar as mudanças na estrutura secundária do DNA, além de padrões de interação de moléculas com diferentes tipos de DNA, bem como possíveis estabilizações e ou mudanças de conformações. O espectro de CD do CT-DNA possui uma banda positiva em 275 nm devido ao empilhamento das bases nitrogenadas e uma banda negativa em 245 nm devido à heliúticidade do DNA, característica da forma B-DNA.^{156,161}

Ao monitorar a adição gradual de **GRPA** ou **GRBA** em uma cubeta contendo CT-DNA, é possível observar suas interações com o DNA em estudo (Figura 39). Para o **GRPA**, ao aumentar suas concentrações, há uma diminuição na intensidade da banda positiva (275 nm) e seu deslocamento para o azul. Essas interações indicam um enfraquecimento do empilhamento das bases do DNA, possivelmente causado pela intercalação do **GRPA** nessas bases. Além disso, a diminuição na intensidade da banda é característica da helicidade do DNA na forma B, sugerindo uma perda parcial da estrutura helicoidal destruindo dessa biomolécula. Esta perda de helicidade pode indicar uma transição conformacional do DNA de forma B para uma forma Z-DNA. Na banda negativa, também há uma diminuição de intensidade, indicando uma perda da forma da hélice destruindo. Este perfil sugere que a interação complexo metálico-DNA induz uma modificação estrutural do DNA.^{162,163}

Em contrapartida, o **GRBA** não mostrou significativas mudanças no espectro de CD do CT-DNA nas bandas positivas e nem nas bandas negativas, mas exibiu mudanças modestas na intensidade dos sinais de CD. Este comportamento está de acordo com tentativas anteriores, sem sucesso, de medir a interação do DNA com este composto metálico. Este comportamento, como visto pelo CD, sugere uma estabilização da forma B-DNA que poderia ser devido a uma

possível interação com o DNA através dos sulcos, sugerida por ensaios anteriores.¹⁶⁴ As interações no sulco podem ser menos perturbadoras para a estrutura helicoidal do DNA.

Figura 39 – Interação dos complexos metálicos com o DNA investigada por dicroísmo circular. Em A mostra os espectros de CD apenas do CT-DNA (linha preta, a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do complexo **GRPA** ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$), e misturas de DNA e complexo metálico nas concentrações de 2, 5, 7, 10, 15, 20 e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha cinza). Em B mostra os espectros de CD do CT-DNA (linha preta) e do complexo metálico **GRBA** ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) e as misturas de DNA e deste complexo metálico, conforme especificado acima. O espectro de CD apenas dos complexos é visto na linha vermelha.



Fonte: Elaborada pelo autor.

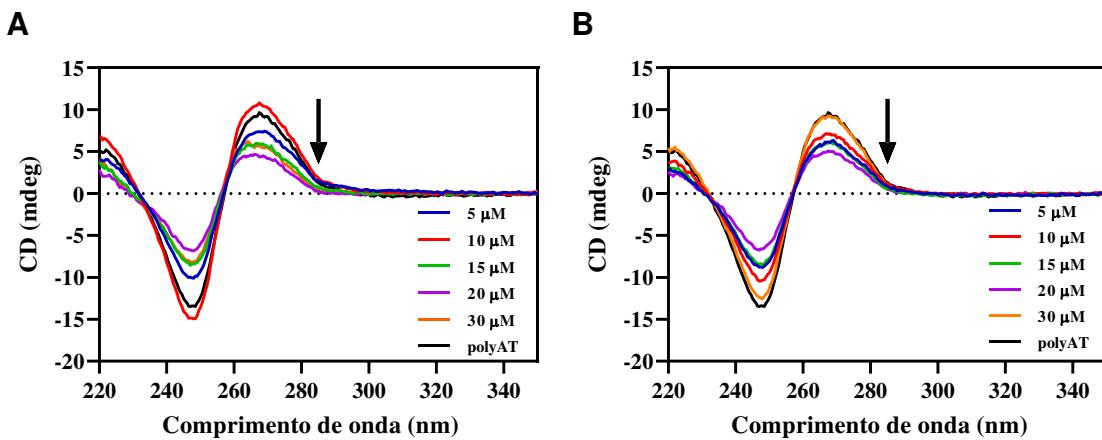
4.7.1 DNA duplex, Junctions e *i-motif*

Estudos posteriores foram feitos por CD empregando-se sequências curtas de DNA (21 – 40 bases em média), tendo sido analisados diferentes tipos de DNA, incluindo dupla fita poli-AT, dupla fita poli-GC, ds-match (DNA duplex), ds-mismatch (DNA duplex contendo uma base não pareada), ds-cruciform (DNA tipo cruciforme), 3WJ (3-way Holliday junction), 4WJ (4-way Holliday junction) e *i-motif*. Esses estudos fornecem informações importantes sobre a interação dos complexos de rutênio com essas estruturas variadas de DNA. Cada uma dessas formas de DNA possui características estruturais e funcionais únicas que influenciam a maneira como interagem com os complexos metálicos e podem ser eventuais alvos biológicos.

O DNA duplex poli-AT, composto por sequências repetitivas de adenina (A) e timina (T), é conhecido por sua conformação flexível e tendência a formar regiões de sulco menor,

onde muitos ligantes interagem preferencialmente. Espectros de dicroísmo circular para o poli-AT apresentam uma banda positiva em torno de 270 nm, e uma banda negativa em 250 nm. Na presença de ambos os complexos, **GRBA** e **GRPA**, ocorreu uma diminuição da intensidade da banda positiva (Figura 40) sugerindo uma interação significativa e indicando que os complexos de rutênio têm uma afinidade particular por sequências ricas em AT, o que pode ser explorado em estratégias de direcionamento molecular.

Figura 40 – Espectro de dicroísmo circular do Poli-AT ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (a) e **GRBA** (b) em diferentes concentrações ($5, 10, 15, 20$ e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, o DNA duplex poli-GC, formado por pares de bases guanina-citosina, apresenta uma estrutura mais rígida e estável devido à maior quantidade de ligações de hidrogênio entre as bases. O espectro de dicroísmo circular do poli-GC exibe uma banda positiva em 280 nm e uma banda negativa em 250 nm (Apêndice S). Nos experimentos realizados com ambos os complexos, não foram observadas mudanças significativas nessas bandas, sugerindo que os complexos não interagem fortemente com essa sequência ou que a interação não altera a estrutura de forma detectável. Este resultado destaca a aparente especificidade dos complexos para sequências ricas em AT.

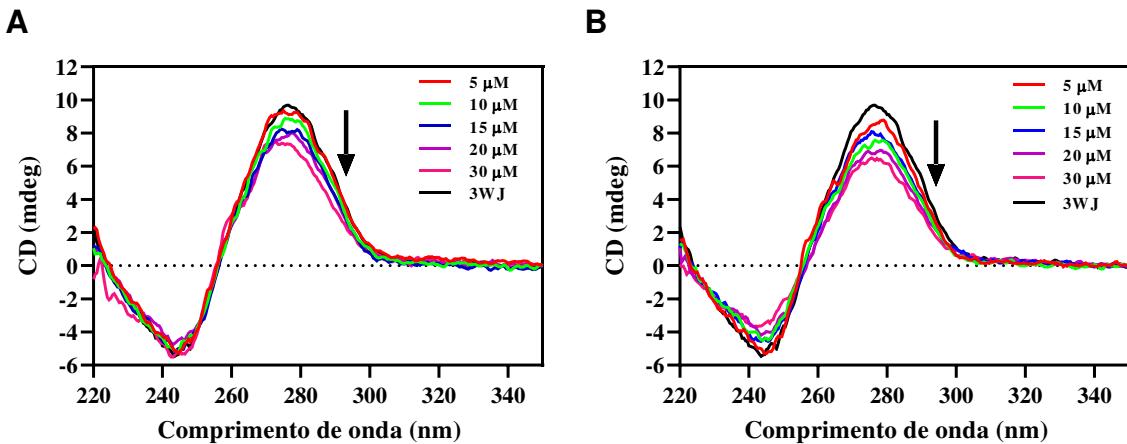
As estruturas de DNA duplex ds-match e ds-mismatch também foram analisadas, Apêndices T e U, respectivamente. O ds-match, sendo um DNA duplex perfeitamente pareado, com sequencia mais aleatória, serve como um controle para avaliar a integridade da dupla hélice em condições normais. Por outro lado, o ds-mismatch, que contém um único par de bases incorretamente emparelhadas, representa uma situação em que a estrutura do DNA é

ligeiramente distorcida, criando regiões específicas de instabilidade. No entanto, tanto para o ds-match quanto para o ds-mismatch, os resultados mostraram que os complexos não induzem alterações significativas nos perfis espectrais. Isso sugere que os complexos não interagem com essas estruturas, ou que as pequenas interações não causam distorções significativas na hélice que possam ser detectadas por dicroísmo circular. Além disso, o DNA cruciforme (ds-cruciform), formado a partir de sequências invertidas, palindrômicas, que se dobram para criar uma estrutura em cruz, também não apresentou mudanças espectrais, sugerindo que os complexos têm baixa afinidade por esta estrutura específica (Apêndice V).

Os DNA's de junção de Holliday como o 3WJ (Three-Way Junction) e o 4WJ (Four-Way Junction) foram estudados e têm particular importância nos processos biológicos, como replicação, recombinação, inserção e reparo do DNA.¹⁶⁵ A 3WJ consiste em três hélices de DNA que se unem em um ponto, enquanto a 4WJ envolve quatro hélices se encontrando em um ponto, formando uma estrutura mais complexa e volumosa. Essas junções são regiões que representam pontos de alta instabilidade no DNA, que podem ser explorados por ligantes como complexos metálicos para interferir em processos celulares fundamentais, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de agentes anticâncer.

A diminuição da intensidade da banda positiva observada nos experimentos (Figura 41) indica que os complexos podem estar interagindo com regiões que não estão pareadas ou desestabilizando a estrutura na junção, o que poderia interferir no processo de replicação. Em contrapartida, o 4WJ, que é uma estrutura mais estável e comumente associada à recombinação genética, não apresentou mudanças espectrais significativas (Apêndice W). Isso sugere que, apesar de sua complexidade, o 4WJ é menos suscetível à interação com os complexos testados, possivelmente devido à sua maior estabilidade ou ao menor acesso dos complexos aos locais de junção.

Figura 41 – Espectro de dicroísmo circular do 3WJ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (a) e **GRBA** (b) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7.2 DNA *i-motif*

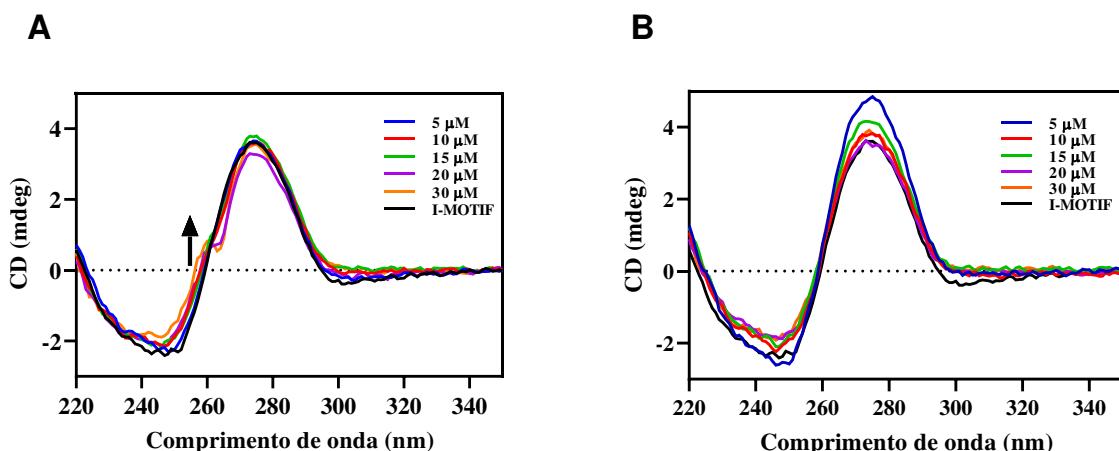
O *i-motif* é uma estrutura secundária formada por sequências ricas em citosina, caracterizada por uma estrutura em que as citosinas se emparelham por meio de ligações de hidrogênio C-H⁺, tanto em condições de pH ácido como em meio fisiológico.^{166,167} Essa conformação própria tem sido amplamente estudada por seu potencial na regulação genética e estabilidade do genoma, especialmente em regiões teloméricas e promotores de genes.^{168,169}

Estudos recentes exploram a interação de complexos de rutênio com DNA *i-motif* e G-quadruplex, demonstrando seu potencial para estabilização e aplicações terapêuticas. O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, cujas formas enantioméricas Λ e Δ interagem com *i-motifs*, sendo que a luminescência do enantiômero Λ aumenta mais na presença desses DNAs. A estabilização térmica do *i-motif* foi observada, especialmente em sequências com *loops* longos de timina, sugerindo que essas estruturas são alvos atraentes para o design de fármacos.¹⁷⁰ Outro exemplo envolve o complexo $[\text{Ru}(\text{bqp})_2]^{2+}$, cujo isômero *cis* se mostrou promissor na identificação do *i-motif*, especialmente em ambientes ricos em citosina, sugerindo seu potencial como uma sonda óptica seletiva para detecção de *i-motif* em meio a outras formas de DNA.¹⁷¹

Assim, os estudos realizados com o DNA *i-motif* revelaram comportamentos distintos dos complexos **GRBA** e **GRPA**. O *i-motif* é caracterizado por uma banda positiva em torno de 270 nm e uma banda negativa em torno de 250 nm no espectro de dicroísmo circular.

Em pH 7,4, os resultados indicaram que o complexo **GRBA** não provocou mudanças significativas no espectro de dicroísmo circular, sugerindo que não ocorreu interação ou possivelmente uma interação fraca com o *i-motif* (Figura 42). Isso pode estar relacionado à especificidade estrutural do **GRBA**, que pode não se ajustar adequadamente à conformação do *i-motif* ou à sua dependência de pH, mantendo a estrutura do DNA inalterada mesmo em altas concentrações. Porém, na presença do complexo **GRPA**, foi observado o aparecimento de um ombro em torno de 260 nm na maior concentração estudada ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$). O surgimento desse ombro sugere uma possível interação do **GRPA** com o *i-motif*, que pode estar provocando uma alteração na conformação do DNA ou na estabilidade da estrutura.

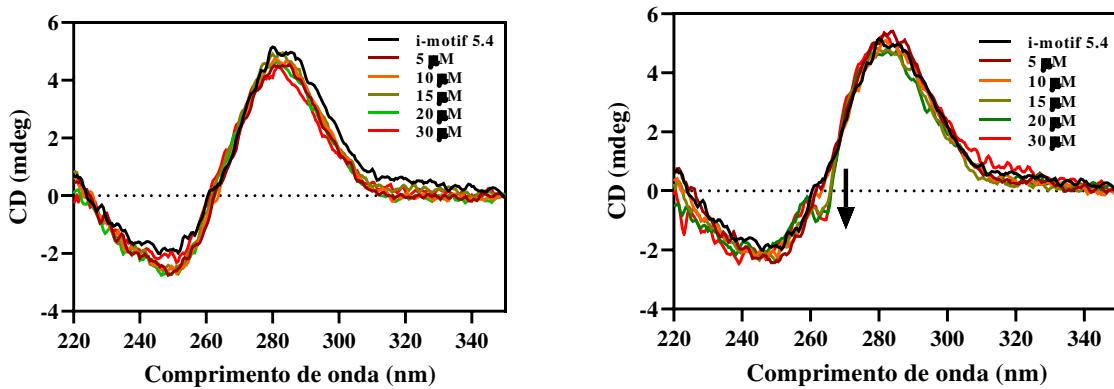
Figura 42 – Espectro de dicroísmo circular do *i-motif* ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (A) e **GRBA** (B) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ensaios também foram realizados em pH 5,4, condição que estabilizaria melhor o DNA *i-motif* (Figura 43). Com o complexo **GRPA**, um ombro apareceu em uma concentração menor, $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicando que o complexo tem uma afinidade melhorada por esta estrutura em condições ácidas. Isto destaca a sensibilidade da interação entre o complexo **GRPA** e o *i-motif* ao pH, sugerindo que o complexo pode ser mais eficaz em estabilizar ou interagir com o *i-motif* em ambientes mais ácidos.

Figura 43 – Espectro de dicroísmo circular do *i-motif* ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRBA** (A) e **GRPA** (B) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) após 1h de incubação em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 5.4



Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar de pequenas alterações no perfil espectral, percebe-se que esses ensaios são fundamentais, pois a estabilização do *i-motif* pode influenciar diretamente processos como a replicação e transcrição gênica, além de fornecer novas oportunidades terapêuticas. O desenvolvimento de compostos metálicos que se ligam e estabilizam essas estruturas pode oferecer avanços significativos no desenvolvimento e modulação de novas abordagens de tratamento direcionado.

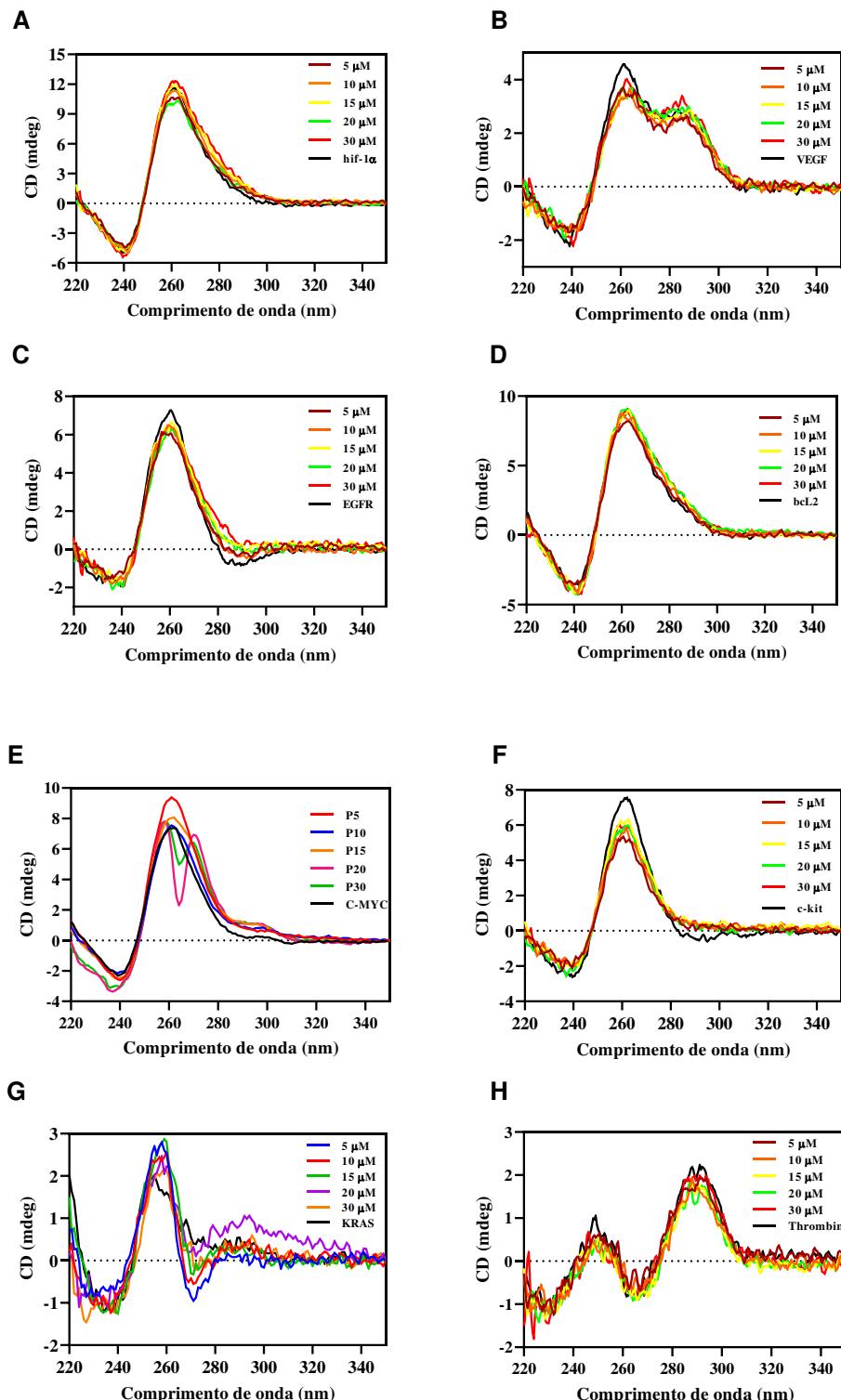
4.7.3 DNA G-Quadruplex na ausência de cátions.

Os DNA do tipo G-quadruplex são estruturas secundárias não canônicas formadas em regiões ricas em guaninas do DNA encontradas em organismos vivos, sendo fundamentais em processos biológicos, como regulação da transcrição gênica, replicação telomérica e manutenção da estabilidade genômica. Essas estruturas estão presentes em regiões-chave do genoma humano, incluindo promotores de genes oncogênicos e telômeros, sendo associadas a doenças como câncer e outras patologias. Esse tipo de DNA pode assumir diferentes topologias, nos quais as mais comuns são paralela, antiparalela e híbrida, dependentes da sequência das regiões dos *loops* e importantes na função biológica.

Neste estudo, foram investigadas 14 sequências de DNA do tipo G-quadruplex, a maioria das quais está relacionada a diferentes tipos de câncer e outras patologias. Dentre essas estão: **hif-1α** (envolvida na resposta celular à hipóxia, regulando a transcrição do fator HIF-1α, crucial para o crescimento tumoral e angiogênese em tumores sólidos), **vegf** (gene do fator de

crescimento endotelial vascular é outro alvo importante, associado à angiogênese e câncer),¹⁷² **bcl-2** (regula a apoptose, sendo frequentemente superexpresso em vários tipos de câncer: pulmão, ovário, mama, próstata, contribuindo para a resistência aos tratamentos)²⁸, **c-myc** (envolvido na proliferação celular descontrolada e em muitos tipos de câncer como próstata, colorretal e mama)¹⁷³, **c-kit** (leucemia mieloide aguda e proliferação celular)¹⁷⁴, **trombina** (regulação da expressão de proteína trombina envolvida nos processos de coagulação sanguínea)¹⁷⁵, **EGFR** (câncer de pulmão)¹⁷⁶, **kras** (câncer colorretal e pancreático),¹⁷⁷ **mosR** (associada à Tuberculose envolvida na regulação transcricional)¹⁷⁸, **ndhA** (associado à Tuberculose – regulador de expressão de proteína envolvida na geração de ATP)¹⁷⁹, **EBR1** (Doença de Chagas)¹⁸⁰, **c-myc** (regulação do ciclo celular, apoptose e transformação celular),^{181,182} **hTel** (associado ao câncer e leishmaniose)^{180,183} e **22AG** (associado aos diversos cânceres)³⁶. Convém mencionar que em todos esses estudos, uma prévia incubação dessas sequências por 1h foi realizada, a fim de minimizar quaisquer efeitos cinéticos.

Figura 44 – Espectros de Dicroísmo Circular do **GRPA** (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA G-quadruplex hif-1 α (A), vegf (B), EGFR (C), bcl2 (D), c-myc (E), c-kit (F), kras (G), trombina (H) (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH 7,4.



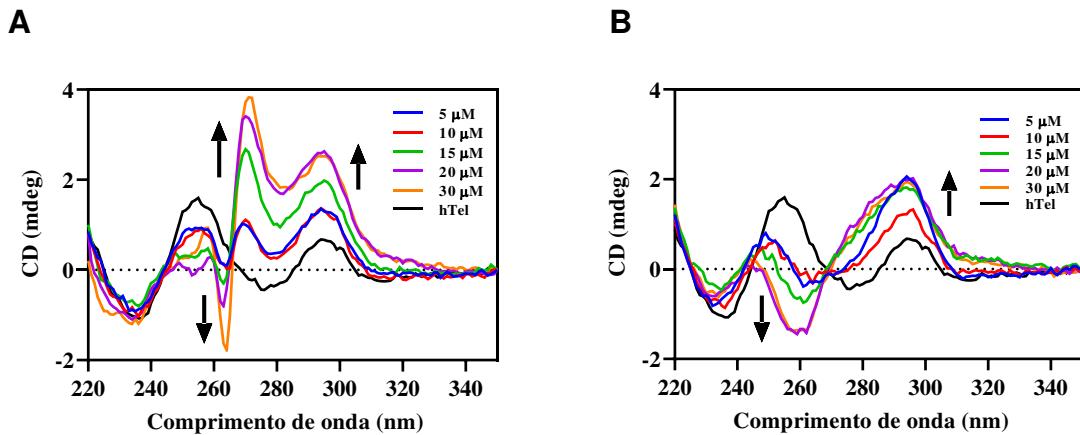
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 44 e no Apêndice X, são apresentados os espectros dos G-quadruplexes analisados na presença dos complexos **GRPA** e **GRBA**. Observou-se que, de modo geral, não houve alterações significativas nos espectros com o aumento da concentração dos complexos. No entanto, no caso do G-quadruplex c-myc (Figura 44E) (banda positiva em torno de 260 nm) na presença do **GRPA**, foi visto uma alteração no perfil espectral a partir da concentração de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sugerindo uma possível mudança conformacional. Esse comportamento requer investigações mais detalhadas em estudos futuros. Para o G-quadruplex kras, que possui banda positiva em 260 nm e negativa em 240 nm adquirindo conformação paralela, tanto na presença do **GRPA** quanto do **GRBA**, foi observada uma variação no espectro em torno de 290 nm na mesma concentração de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, também indicando uma possível mudança conformacional. Entretanto, em ambos os casos, não foi verificado um aumento expressivo na intensidade das bandas, o que sugere que, apesar das mudanças conformacionais, não há indícios de estabilização do DNA.

Na Figura 45A, é possível observar os espectros de CD do DNA G-quadruplex hTel na ausência (linha preta) e presença do complexo **GRPA**, no qual foi observado o surgimento de uma banda positiva em torno de 270 nm, o aumento da banda em 290 nm e uma banda negativa em torno de 260 nm. Esses resultados indicam a indução da formação de uma conformação híbrida na presença do complexo **GRPA**.

Para o complexo **GRBA** (Figura 45B), também foram observadas mudanças significativas nos espectros de CD do hTel. A banda em 254 nm desapareceu gradualmente com o aumento da concentração do complexo e levou ao aparecimento de uma banda negativa, principal em torno de 260 nm, enquanto a banda centrada em 294 nm aumentou significativamente e deslocou-se para 296 nm. Isto indica que o complexo **GRBA** pode induzir o hTel a formar uma estrutura de DNA antiparalela na ausência do cátion monovalente. Estes espectros de CD induzidos pelos complexos foram consistentes com as características específicas relatadas das estruturas híbridas e antiparalelas de DNA G-quadruplex relatados na literatura.

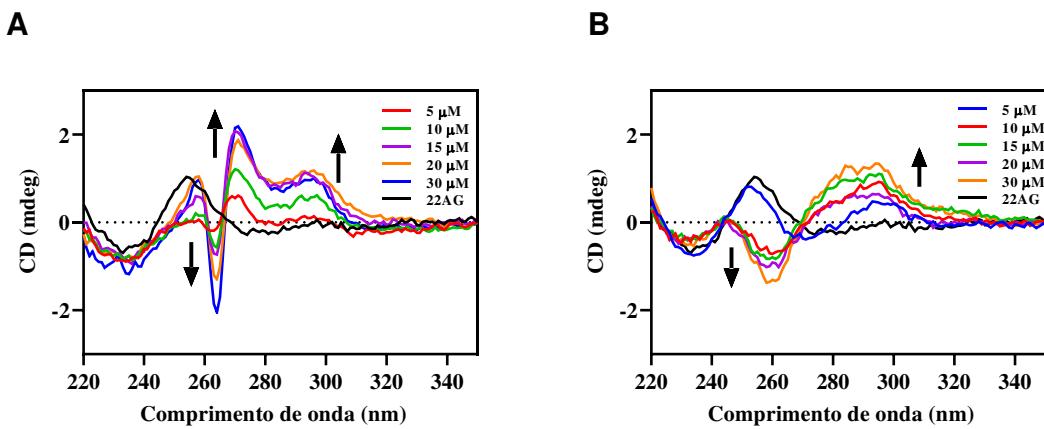
Figura 45 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA G-quadruplex hTel ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do complexo **GRPA** (A) e **GRBA** (B) ($0 – 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH 7,4 .



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 46 estão os espectros de CD para o DNA 22AG em tampão Tris-HCl pH 7,4 na ausência (linha preta) e presença dos complexos. O DNA 22AG exibe uma banda positiva em 254 nm e uma banda negativa em 235 nm, características típicas de conformação paralela. Na presença do complexo **GRBA** (Figura 46B), foi observado o surgimento de uma banda em 295 nm. Além disso, a banda inicial do DNA em 254 nm foi suprimida, e levou ao surgimento de uma banda negativa em torno de 260 nm, indicando uma transição conformacional para uma estrutura antiparalela. Para o complexo **GRPA**, observou-se o aparecimento de duas novas bandas positivas, uma em 295 nm e outra em 270 nm, além de uma banda negativa em torno de 265 nm (Figura 46A). Essas características são indicativas da formação de uma conformação híbrida do DNA G-quadruplex. A presença dessas bandas adicionais sugere que o complexo **GRPA** não apenas induz a formação de uma conformação híbrida, mas também estabiliza essa estrutura.

Figura 46 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA 22AG ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) com o complexo **GRPA** (A) e **GRBA** (B) ($0 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4).

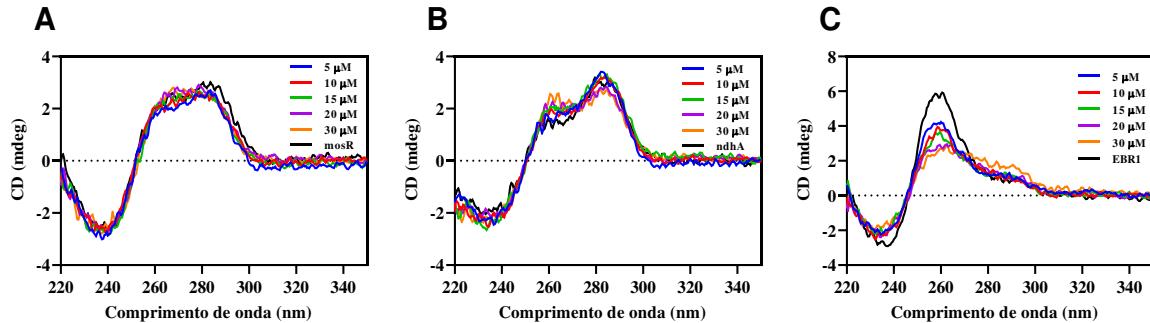


Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses resultados destacam a capacidade diferenciada dos complexos **GRBA** e **GRPA** de modular a conformação do DNA G-quadruplex 22AG e hTel. Enquanto o **GRBA** favorece a transição para uma estrutura antiparalela, o **GRPA** promove e estabiliza a conformação híbrida, evidenciando o papel desses complexos na regulação das conformações de G-quadruplexes podendo ter implicações importantes em estudos futuros relacionados à regulação genética e ao desenvolvimento de terapias anticâncer direcionadas.

As sequências mosR, ndhA e EBR1, relacionadas à Tuberculose e Doença de Chagas, apresentaram alterações no perfil espectral, porém menos pronunciada (Figura 47A e 47B). Na presença do complexo **GRPA**, as sequências mosR e ndhA exibiram um leve aumento nas bandas positivas, sugerindo uma possível estabilização da estrutura. Por outro lado, para a sequência de DNA EBR1, apresentou uma diminuição da banda positiva em torno de 260 nm, juntamente com o surgimento de uma nova banda em torno de 290 nm, o que é indicativo de mudança conformacional (Figura 47 C). Na presença do complexo **GRBA**, o DNA EBR1 não apresentou alterações significativas. No entanto, para as sequências mosR e ndhA, observou-se uma leve diminuição na banda em torno de 260 nm e um aumento na banda em torno de 290 nm (Apêndice Y). Essas mudanças sugerem uma transição de uma conformação híbrida para uma conformação antiparalela, além de um aumento na intensidade dessa banda, indicando estabilização estrutural.

Figura 47 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA mosR (A), ndhA (B) e ERB1 (C) (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do complexo **GRPA** (0 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os complexos estudados, **GRBA** e **GRPA**, não alteraram significativamente os espectros de dicroísmo circular (CD) das demais sequências de DNA G-quadruplex analisadas. Esse comportamento indica que os complexos **GRBA** e **GRPA** possuem uma alta seletividade e especificidade para as sequências de DNA G-quadruplex 22AG e hTel, uma vez que apenas essas duas apresentaram mudanças conformacionais detectáveis em seus espectros de CD na presença dos complexos. A capacidade dos complexos de discriminar entre diferentes sequências de G-quadruplex reforça seu potencial como agentes direcionadores para estruturas específicas.

4.7.4 DNA G-Quadruplex hTel e 22AG na presença dos cátions K^+ e Na^+

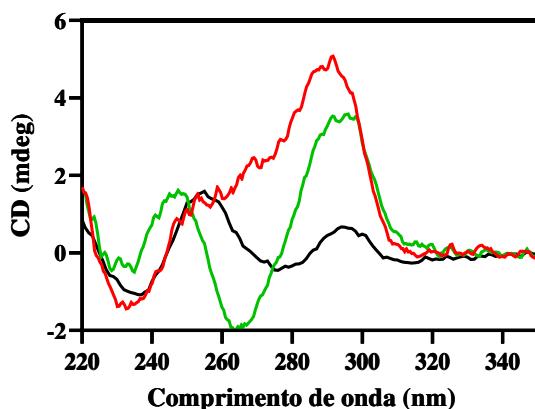
A estabilização de estruturas G-quadruplex em DNA por cátions é conhecida, especialmente com os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os cátions interagem no centro ou entre os G-tétrades que formam o G-quadruplex aumentando a estabilidade estrutural e influenciando as conformações assumidas pelo DNA.

O íon K^+ , por exemplo, é mais eficaz em estabilizar estruturas híbridas de G-quadruplex, sendo descrito no DNA G-quadruplex 22AG e hTel. Devido ao seu raio, ele se localiza entre o G-tétrades proporcionando o empilhamento e consequente estabilização da estrutura. Diferentemente, o íon Na^+ favorece a conformação antiparalela, também vista para as sequências em estudo. Com um raio menor, sua interação ocorre no centro dos G-tétrades. A escolha de K^+ e Na^+ para esses experimentos visa explorar como cada cátion pode afetar a estrutura conformacional dos G-quadruplexes hTel e 22AG, além de sua capacidade de

estabilizar essas estruturas em condições que simulam ambientes celulares, além da ação adicional de estabilização e mudança conformacional na presença dos complexos **GRPA** e **GRBA**.

O DNA hTel, em tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4) na ausência de cátions, apresenta dois sinais característicos no espectro de dicroísmo circular: uma banda positiva em 295 nm e outra em 250 nm (Figura 48, linha preta). A adição de K⁺ resulta em uma mistura de conformações paralela e antiparalela, evidenciada por alterações espectrais assumindo uma conformação mista (Figura 48, linha vermelha), enquanto na presença de Na⁺ induz a formação de uma conformação antiparalela, caracterizada por uma banda positiva em 290 nm e uma banda negativa em torno de 260 nm (Figura 48, linha verde). Assim, é possível entender que os cátions estabilizam e alteram a conformação do DNA.

Figura 48 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4) na ausência dos cátions (linha preta) e na presença de K⁺ (linha vermelha) e Na⁺ (linha verde).



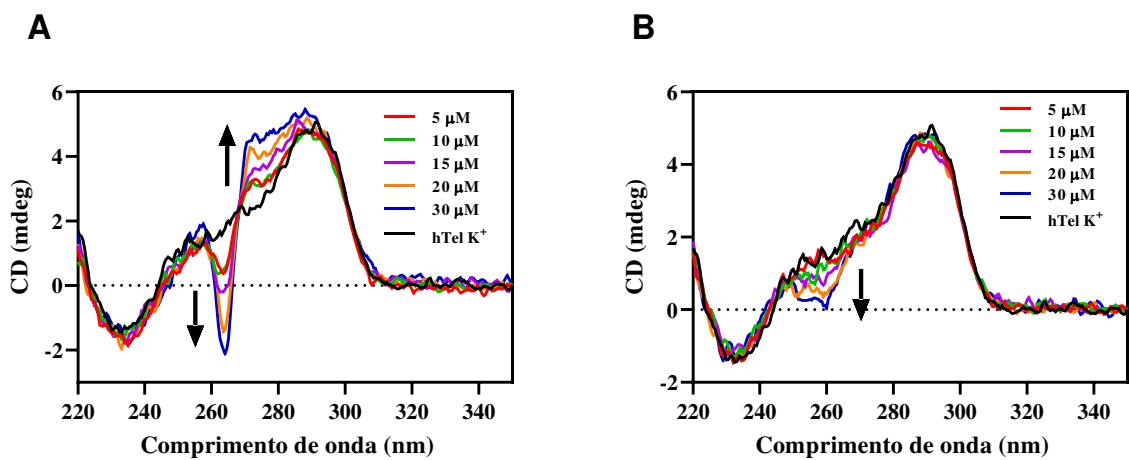
Fonte: Elaborada pelo autor.

Analizando a interação do complexo **GRPA** com o DNA hTel na presença de K⁺, observou-se um aumento da banda em 290 nm, acompanhado pelo surgimento de uma banda positiva em 270 nm e uma banda negativa em 265 nm, no qual são indicativos da presença de uma conformação híbrida do DNA (Figura 49A), sugerindo que a interação com o complexo promove uma modulação na estrutura do G-quadruplex, favorecendo a conformação híbrida. Por outro lado, na presença do complexo **GRBA** observou-se o surgimento de uma banda em

260 nm com o aumento da concentração do complexo indicativo de formação da conformação antiparalela (Figura 49B).

O DNA hTel na presença do cátion Na^+ assume uma conformação antiparalela e na presença dos complexos não foi observado alterações significativas no perfil espectral (Apêndice Z) indicativas de mudança de conformação ou estabilização da estrutura secundária.

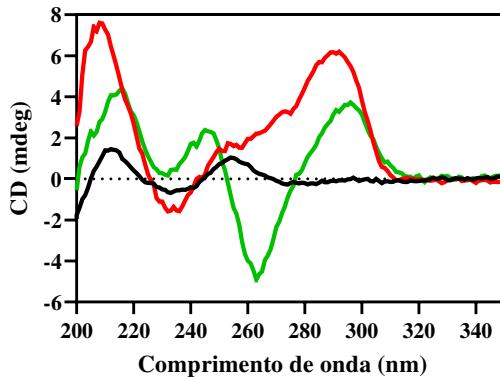
Figura 49 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA hTel ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (A) e **GRBA** (B) ($0 – 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4), KCl 100 mmol L^{-1} , EDTA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O DNA 22AG, na ausência dos cátions, apresenta uma banda positiva em 255 nm e uma banda negativa em torno de 235 nm indicativas de conformação paralela (Figura 50, Linha preta). Quando o cátion K^+ é adicionado, ocorre uma mudança de conformação evidenciada pelo surgimento de uma banda positiva em 290 nm (Figura 50, Linha vermelha), o que sugere a formação de conformação mista (paralela e antiparalela). Entretanto, na presença do cátion Na^+ , o DNA 22AG apresenta, majoritariamente, a conformação antiparalela, indicada pelo surgimento de uma banda positiva em 290 nm e de uma banda negativa em 260 nm (Figura 50, Linha verde). Assim, podemos observar que há a influência específica dos cátions K^+ e Na^+ na modulação das conformações do G-quadruplex, destacando a capacidade desses íons de estabilizar diferentes formas estruturais do DNA.

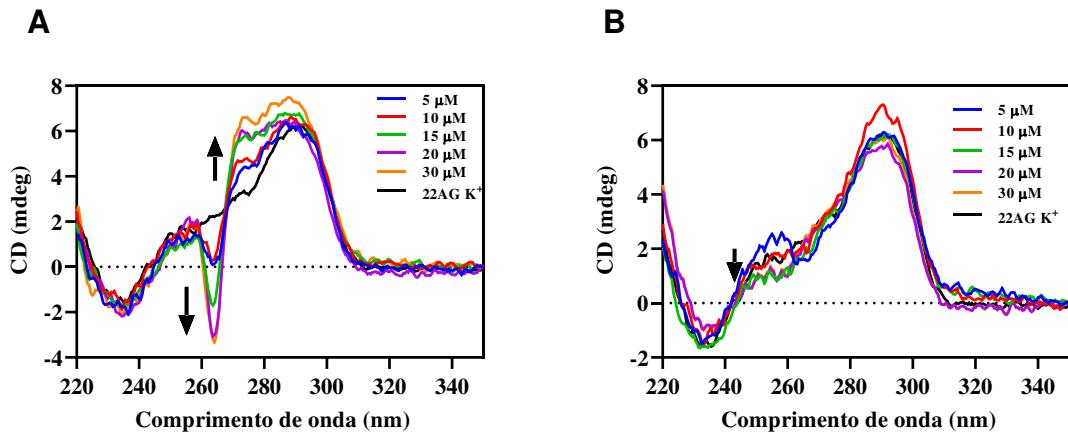
Figura 50 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA 22AG ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L $^{-1}$ (pH 7,4) na ausência dos cátions (linha preta) e na presença de K $^{+}$ (linha vermelha) e Na $^{+}$ (linha verde).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na presença do cátion K $^{+}$, o DNA 22AG, ao interagir com o complexo **GRPA**, exibe o surgimento de uma banda positiva em torno de 270 nm e um aumento gradativo na intensidade da banda positiva em 290 nm. Além disso, observa-se o aparecimento de uma banda positiva em 260 nm, indicativa da formação de uma conformação híbrida do G-quadruplex (Figura 51A). Por outro lado, na presença do complexo **GRBA** observou-se o surgimento de uma banda negativa, não tão pronunciada, em torno de 260 nm, acompanhada por um leve aumento da banda em 290 nm (Figura 51B). Esses resultados sugerem que o complexo **GRBA** induz uma transição conformacional do DNA para uma estrutura antiparalela.

Figura 51 – Espectros de Dicroísmo Circular do DNA 22AG ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos **GRPA** (A) e **GRBA** (B) ($0 – 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4), KCl 100 mmol L^{-1} , EDTA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando o DNA 22AG está na presença do cátion Na^+ e de ambos os complexos (**GRPA** e **GRBA**), não são observadas alterações significativas no perfil espectral (Apêndice AA) indicando que não há uma interação forte ou suficiente para promover estabilização ou mudança conformacional do DNA.

Dessa forma conclui-se que tanto o DNA hTel quanto o 22AG, já estabilizados devido a presença do cátion K^+ , ainda podem ter suas conformações significativamente alteradas pela ação dos complexos estudados. O complexo **GRPA** demonstrou evidente capacidade de induzir e estabilizar a conformação híbrida do G-quadruplex, enquanto o complexo **GRBA** mostrou preferência de induzir a formação da conformação antiparalela. Assim, os resultados destacam a forte interação dos complexos com o DNA, mesmo em estruturas previamente estabilizadas, evidenciando o potencial desses compostos em modular conformações de G-quadruplex.

Em contrapartida, ao monitorar as sequências de DNA *mosR*, *EBR1* e *ndhA* na presença de K^+ , não foram observadas alterações no perfil espectral com o aumento da concentração dos complexos (Apêndice AB). Esse comportamento sugere que esses DNA's já se encontram em uma conformação estável e os complexos não conseguem perturbar significativamente, indicando que os complexos não possuem afinidade suficiente para induzir maior estabilidade ou promover mudanças conformacionais nesses G-quadruplexes.

O G-quadruplex estabilizado por cátions como K^+ ou Na^+ pode sofrer alterações adicionais em sua conformação na presença de ligantes, como complexos metálicos, intercalantes ou outras moléculas pequenas. Isso ocorre possivelmente devido aos ligantes

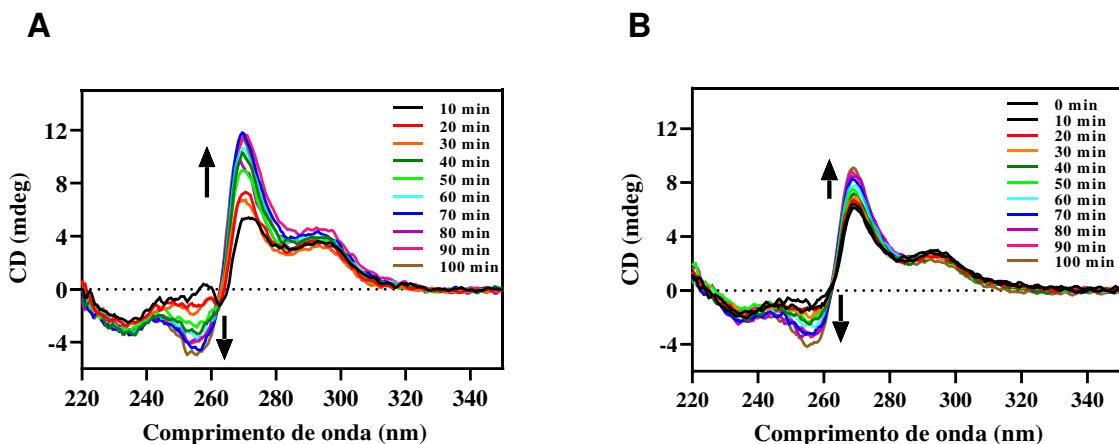
interagirem em regiões externas dos G-quadruplexes ou mesmo deslocar parcialmente os cátions, induzindo novos arranjos conformacionais ou estabilizando conformações existentes.

4.7.5 Efeito da irradiação de luz azul nos hTel e 22AG

Foram realizados experimentos de irradiação com luz azul em soluções contendo os DNA's 22AG e hTel na presença dos complexos **GRPA** e **GRBA**, utilizando tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4. As irradiações foram realizadas em intervalos de 10 minutos, sendo registrado os espectros de CD num tempo total de 100 minutos.

Para o complexo **GRPA** em ambos os DNA's ocorreu aumento gradativo da intensidade da banda positiva em 270 nm e um aumento da banda negativa em 260 nm, à medida que prosseguia a irradiação (Figura 52). Esses efeitos foram mais pronunciados no DNA hTel, indicando que a irradiação melhora a interação com o DNA, estabilizando-o.

Figura 52 – Espectros de Dicroísmo Circular do complexo **GRPA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA hTel (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) em tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4). Tempo de irradiação= 10 minutos. led azul.

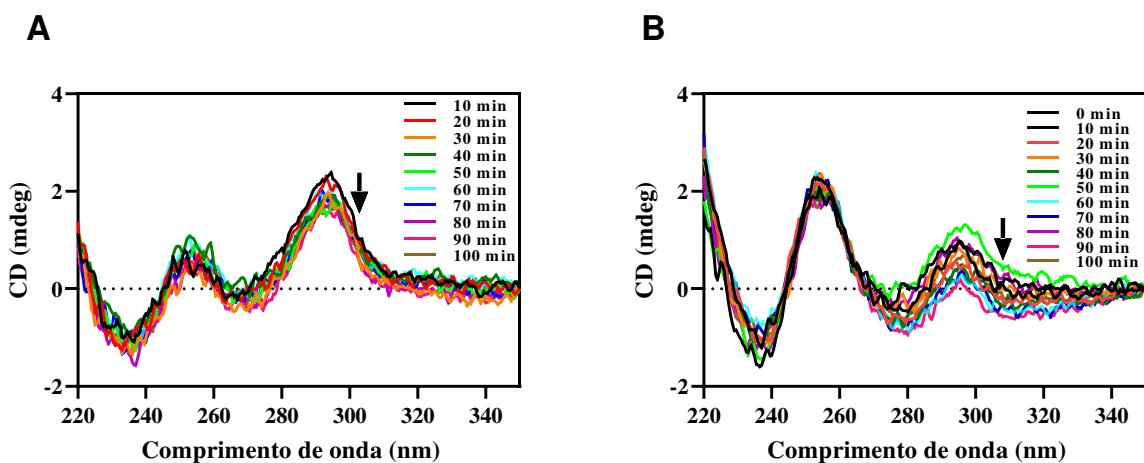


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o complexo **GRBA**, foi observada uma diminuição na intensidade da banda positiva em 290 nm durante o período de irradiação, com a diminuição mais acentuada no DNA 22AG em comparação ao DNA hTel (Figura 53). Essa mudança espectral indica uma possível desestabilização da conformação do G-quadruplex, provavelmente levando à transição para uma conformação menos organizada ou para o desenovelamento parcial da estrutura. Esses

resultados sugerem que os complexos **GRPA** e **GRBA** possuem diferentes mecanismos de interação com as estruturas G-quadruplex sob irradiação, sendo o **GRPA** mais eficaz na estabilização de conformações específicas, enquanto o **GRBA** tende a promover uma desestabilização conformacional.

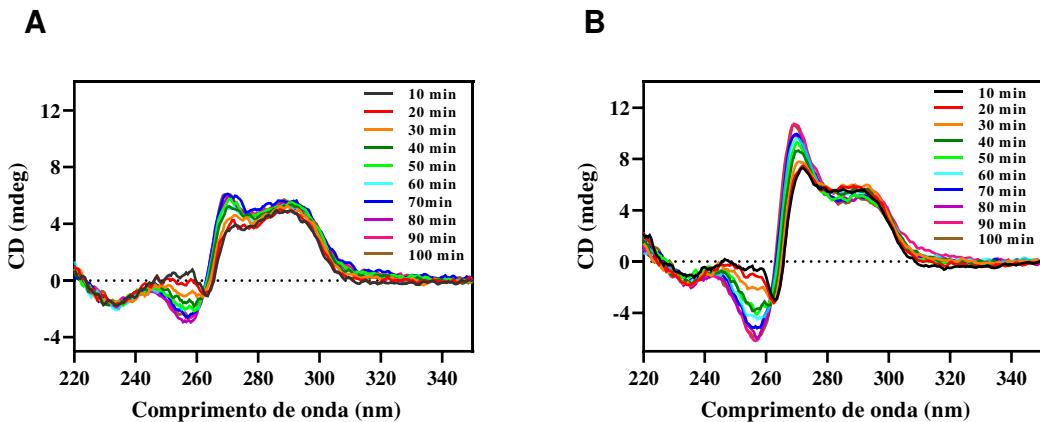
Figura 53 – Espectros de dicroísmo circular do complexo **GRBA** ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA hTel ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e DNA 22AG ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (B) em tampão Tris-HCl 10 mmol L $^{-1}$ (pH 7,4). Tempo de irradiação= 10 minutos. Led azul.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O complexo **GRPA** na presença de hTel ou 22AG na presença de K $^{+}$ apresentou o mesmo comportamento, observou-se o aumento gradativo em função do tempo de irradiação da intensidade da banda positiva em 270 nm e o aumento da banda negativa em 260 nm indicando estabilização dessa conformação híbrida. Porém o aumento não foi tão pronunciado quando comparado aos sistemas sem o cátion K $^{+}$ (Figura 54). Esses resultados sugerem que a exposição à luz pode promover alterações no DNA que resultam em uma maior ordenação do G-quadruplex. Ao comparar os resultados obtidos na presença e na ausência do cátion K $^{+}$, observou-se que o aumento na intensidade das bandas, induzido pela irradiação com luz, foi menos pronunciado na presença do cátion. A presença do cátion estabiliza o G-quadruplex antes mesmo da irradiação, o que pode limitar o impacto adicional que a luz poderia ter no aumento da intensidade das bandas espectrais.

Figura 54 – Espectros de Dicroísmo Circular do complexo **GRPA** ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do DNA hTel ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e DNA 22AG ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (B) em tampão Tris-HCl 10 mmol L $^{-1}$ (pH 7,4), KCl 100 mmol L $^{-1}$ e EDTA 0,1mmol L $^{-1}$. Tempo de irradiação = 10 minutos. led azul.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o complexo **GRBA** na presença de K^+ , ambos os DNA's não tiveram mudanças significativas no perfil espectral (Apêndice AC). Esses dados sugerem que o compexo, sob essas condições, não gera alterações conformacionais após irradiação de luz, indicando que não há efeito adicional da luz para estabilizar ou desestabilizar o DNA, visto que ele se encontra em uma conformação estável na presença do cátion.

Na presença do cátion Na^+ , ambos complexos com o DNA 22AG ou hTel não tiveram mudanças significativas no perfil espectral com a irradiação de luz (Apêndice AD). Assim, esses resultados indicam que a interação entre o complexo e o DNA permanece estável e que o complexo não induz a formação de espécies reativas, capazes de causar danos ou alterações conformacionais no DNA.

Portanto, esses ensaios indicam que os complexos **GRPA** e **GRBA** exibem comportamentos distintos em relação à estabilização ou desestabilização das estruturas de DNA G-quadruplex sob irradiação de luz azul. O complexo **GRPA** demonstrou ser mais eficaz na estabilização de conformações híbridas de G-quadruplex, conforme evidenciado pelo aumento da intensidade das bandas positivas em 270 nm e negativas em 260 nm. No entanto, na presença de íons K^+ é visto que o cátion já estabiliza a estrutura G-quadruplex antes da exposição à luz, limitando esse efeito adicional. Por outro lado, o complexo **GRBA** promoveu desestabilização conformacional, com uma acentuada diminuição da intensidade das bandas no DNA 22AG. A ausência de efeitos sob irradiação de luz na presença de K^+ para o **GRBA** e a falta de mudanças

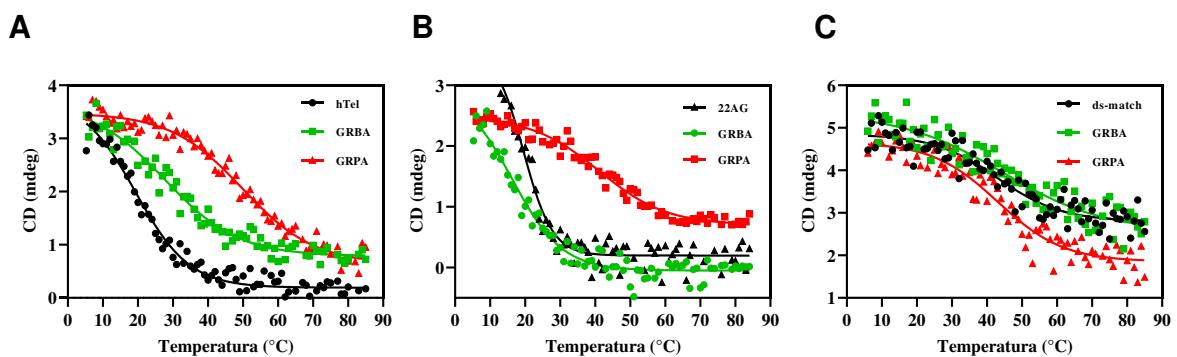
espectrais na presença de Na^+ para ambos os complexos sugerem que a influência da irradiação é modulada pelos cátions presentes.

4.7.6 Estudo de Estabilidade Térmica das Estruturas de DNA

A análise da estabilidade térmica ou desnaturação térmica de estruturas de DNA sob interação com compostos diversos é uma abordagem importante para entender a influência dessas moléculas na estabilização de estruturas secundárias, como o DNA duplex e G-quadruplex. A técnica de dicroísmo circular (CD) é utilizada para monitorar a desnaturação térmica de moléculas de DNA, permitindo a determinação da temperatura de fusão (T_m), que indica o ponto em que ocorre o desenovelamento da estrutura do DNA. Para G-quadruplexes, como o 22AG e hTel, a estabilização térmica promovida por ligantes pode ser monitorada com base no deslocamento de T_m (ΔT_m), fornecendo informações sobre a afinidade e a especificidade da interação entre composto-DNA.

Valores positivos de ΔT_m são indicativos de estabilização da estrutura, o que pode ser relevante em estratégias terapêuticas que visam estabilizar G-quadruplexes em regiões promotoras de genes oncogênicos.

Figura 55 – Medidas de fusão de hTel (A), 22AG (B) e ds-match (C) na ausência (linha preta) e na presença dos complexos **GRPA** (linha vermelha) e **GRBA** (linha verde).



Fonte: Elaborada pelo autor

A estabilidade de interação complexo-DNA foi analisada utilizando dicroísmo circular, no qual foi utilizado o DNA convencional duplex e os G-quadruplex 22AG e hTel. Na Figura 55, é observado um estudo de desnaturação térmica por CD dos compostos com os DNA's, no qual as curvas foram obtidas em um comprimento de onda fixo de 295 nm. Nesse estudo é

possível obter os valores de T_m e ΔT_m observando a temperatura de transição do DNA estruturado para o DNA desenovelado. Na tabela 9 tem-se a temperatura de fusão (T_m) em °C e a variação de temperatura (ΔT_m) para 22AG e hTel na presença dos complexos **GRPA** e **GRBA**.

Tabela 9 – Valores de T_m e ΔT_m dos complexos **GRPA**, **GRBA** e DNA.

	22AG (T_m)	hTel (T_m)	ds-match (T_m)	hTel (ΔT_m)	22AG (ΔT_m)	DNA duplex (ΔT_m)
+GRPA	$41 \pm 0,8$	$49,8 \pm 0,8$	$43,1 \pm 2,5$	30,4	21,5	0,2
+GRBA	$16 \pm 1,1$	$27,6 \pm 1,5$	$44,5 \pm 2,8$	8,2	- 3,4	1,6
DNA somente	$19,5 \pm 1,2$	$19,4 \pm 2,1$	$42,9 \pm 3,6$	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na presença dos compostos foi observado um aumento significativo na estabilidade térmica para os G-quadruplex 22AG e hTel (Tabela 9). Para o complexo **GRPA** há um aumento acima de 20°C (ΔT_m) na estabilidade, indicando maior interação com ambos os G-quadruplexes. Quando comparado os valores de ΔT_m do DNA duplex com G-quadruplex, percebe-se que ambos complexos têm seletividade para G-quadruplex com valores mais elevados sugerindo interações bastante fortes. Esses dados indicam a forte capacidade de ambos os complexos formarem interações estáveis com os G-quadruplexes, o que leva à formação de complexos ligados com estabilidades térmicas elevadas quando comparadas aos G-quadruplexes nativos.

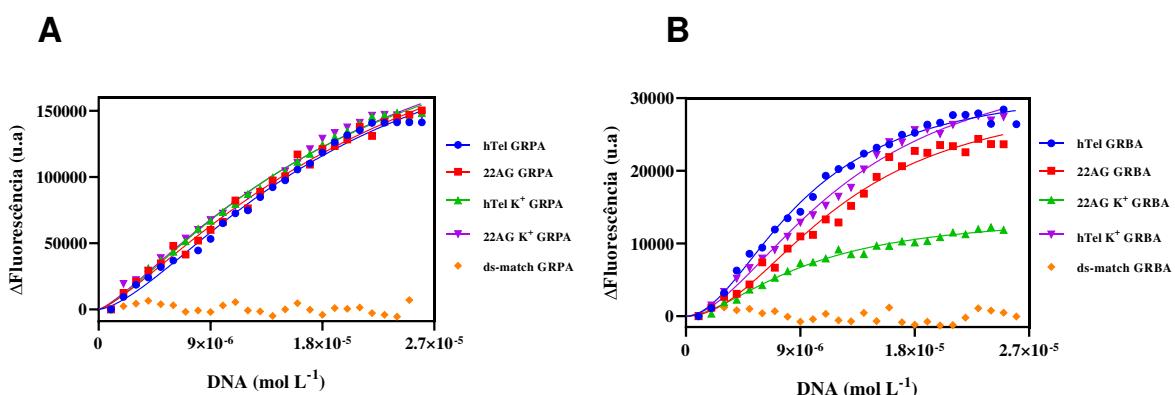
4.8 Espectroscopia de Emissão (Complexos-DNA)

Os perfis de fluorescência dos complexos **GRBA** e **GRPA** foram investigados com sequencias de DNA do tipo G-quadruplex (22AG e hTel) e DNA duplex (ds-match), na ausência e presença do cátion K^+ , destacando a seletividade e a intensidade da resposta fluorescente dos complexos em relação ao DNA. As variações de emissão com adições sucessivas de DNA duplex, 22AG e hTel são apresentadas na Figura 55.

Os resultados obtidos a partir dos perfis de fluorescência fornecem informações importantes sobre a afinidade e seletividade desses complexos para diferentes estruturas de

DNA. As titulações monitoradas por espectroscopia de emissão, com adições sucessivas de DNA, mantendo uma concentração fixa dos complexos metálicos ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), indicaram diferenças significativas na interação desses complexos com as sequencias de DNA.

Figura 56 – Curva de emissão dos complexos **GRPA** (A) e **GRBA** (B) ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de DNA duplex (ds-match) e G-quadruplex (22AG e hTel), até a saturação, em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} na ausência e presença de K^+ (100 mmol L^{-1} KCl).

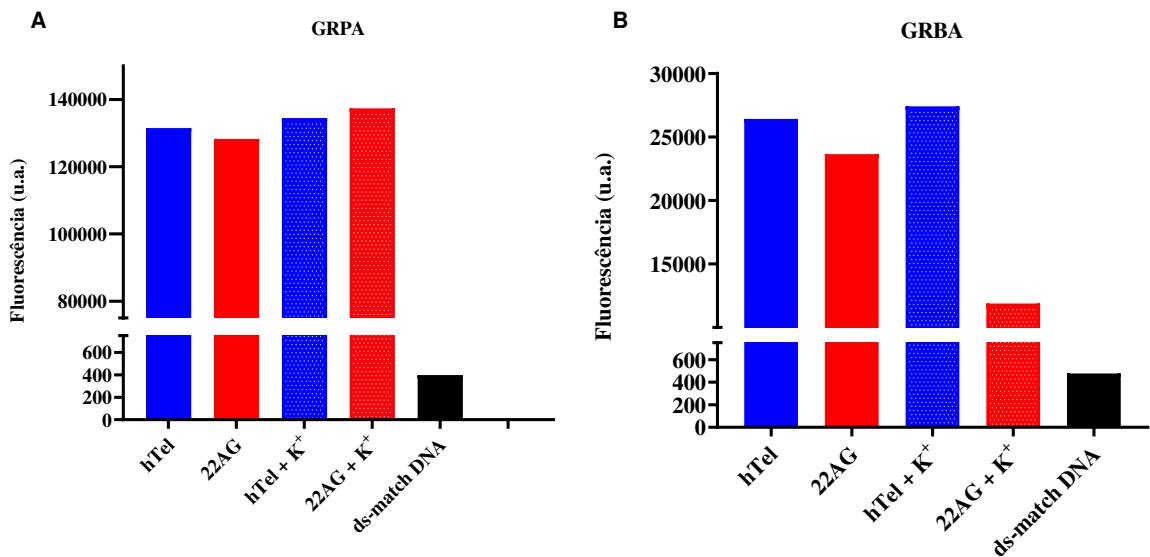


Fonte: Elaborada pelo autor.

Em geral, observou-se um aumento significativo de luminescência na presença de sequencias de DNA do tipo G-quadruplex, indicando uma interação mais forte em comparação ao DNA duplex para ambos os complexos. O aumento da luminescência é pouco afetado para os G-quadruplexes na presença de K^+ (Figuras 56 e 57), exceto no caso do GRBA com htel. Uma vez que o cátion pode induzir uma conformação mais estável e bem definida do DNA, não se observar alterações adicionais mesmo com esse cátion deve indicar que os complexos metálicos induzem alterações conformacionais sem a necessidade do íon.

O **GRBA** (Figura 56) também apresentou uma resposta luminescente na presença dos G-quadruplexes, hTel e 22AG, o que não foi observado com o DNA duplex. Embora a intensidade da resposta seja inferior à do **GRPA**, o que sugere uma afinidade ligeiramente inferior. A presença de K^+ pouco afeta a resposta, mantendo ainda o complexo seletivo às estruturas G-quadruplex. Dessa forma, tem-se um excelente efeito de seletividade e respostas por luminescência, sugerindo inclusive que tais compostos poderiam ser explorados como sondas seletivas, diante da ausência de resposta na presença de fitas curtas de DNA duplex (sinal de linha de base).

Figura 57 – Gráfico de barras de emissão do complexo **GRPA** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) e **GRBA** (B) com DNA duplex (ds-match) e G-quadruplex (22AG e hTel) em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} na ausência e presença do cátion K^+ (100 mmol L^{-1} KCl).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 10 – Medidas de afinidade para os complexos **GRPA** e **GRBA** com os DNA do tipo G-quadruplexes (hTel e 22AG) na ausência e presença do cátion K^+ .

K_d ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
	hTel	22AG	hTel K ⁺
GRPA	19	24	19
GRBA	9	12	9
		22AG K ⁺	
		22	
		13	

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir das curvas de emissão, foi possível calcular os valores da constante de dissociação (K_d), reforçando a seletividade e afinidade dos complexos pelo DNA (Tabela 10). As constantes de dissociação obtidas para as interações complexos-G-quadruplex indicam uma afinidade significativa, com valores na faixa de micromolar. Para o DNA duplex, não foi possível calcular a constante devido à ausência de mudanças espectrais significativas após a titulação, indicando elevada seletividade dos complexos por estruturas G-quadruplex. Essa seletividade é crucial para o desenvolvimento de terapias direcionadas a regiões genômicas contendo G-quadruplexes, em que essas estruturas estão presentes nos promotores de oncogenes e nos telômeros.

Os valores de K_d para o complexo **GRPA** indicam uma afinidade moderada para ambas as sequências, com $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $24 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os G-quadruplexes hTel e 22AG, respectivamente. Na presença de íons K^+ , esses valores de K_d pouco mudaram, sendo de $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $22 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Essas medidas de afinidade reforçam que a interação dos complexos metálicos é suficiente havendo ou não K^+ , não havendo qualquer facilitação e ou melhoria de interação havendo esse íon monovalente. Adicionalmente, esse resultado pode indicar também que não há competição do K^+ durante a interação dos complexos metálicos com o G-quadruplex, possivelmente por não interagirem nos mesmos sítios. Isso pode ser deduzido do fato de que uma vez os complexos se associando ao G-quadruplex não haveria necessidade do íon.

Por outro lado, o complexo **GRBA** apresentou valores de K_d mais baixos, indicando maior afinidade em comparação ao **GRPA**. Os valores medidos foram de $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ para hTel e 22AG, respectivamente. Na presença de íons K^+ , esses valores de K_d não tiveram alteração similarmente ao descrito para GRPA, reforçando que esse íon não influenciaria a interação dos complexos. Essa diferença de afinidade entre **GRPA** e **GRBA** possivelmente deve estar relacionada às diferenças estruturais e eletrônicas entre os dois complexos, considerando que haja maior volume molecular no caso do **GRPA**.

4.9 Lipofilicidade

A lipofilicidade tem sido quantificada como o logaritmo do coeficiente de partição de uma molécula entre uma fase orgânica (octanol) e aquosa (água ou solução tamponada), podendo ser determinada para vários compostos.

O P (de partição) é uma medida da distribuição relativa de uma molécula por fases lipídicas e aquosas na ausência de ionização. Se um composto ioniza, então a partição observada entre água e octanol é dependente do pH. O coeficiente de distribuição D (expresso como logD) é a lipofilicidade efetiva de um composto em um determinado pH, sendo então uma função da contribuição do LogP e grau de ionização.

A lipofilicidade é um dos parâmetros fundamentais que influencia nos processos biológicos ligados a ingestão de fármaco, como interações com o alvo, adsorção, passagem pelas membranas, metabolismo, distribuição e toxicidade de compostos.¹⁸⁴ Moléculas lipofílicas possuem logP e logD positivos, enquanto moléculas hidrofílicas possuem valores negativos. Esses valores são importantes no estudo das interações dos compostos, no caso, de complexos de Ru(II) com células, pois tem grande influência na distribuição dos complexos

dentro das células, a mesma varia de acordo com a hidrofobicidade dos ligantes.¹⁸⁵ 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).^{186,187}

A metodologia empregada foi do “shake-flask” e a quantificação dos complexos foi realizada através de espectroscopia eletrônica na região do UV-vis utilizando a equação 5. A concentração do composto na fase orgânica foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a final na fase aquosa.¹⁸⁸ Para a quantificação dos complexos na fase aquosa, foi traçada uma curva de calibração (Absorbância x [complexo]).

A Tabela 11 apresenta a diferença de log P e log D_{7.4} dos complexos **GRPA** e **GRBA**. Percebe-se que a medida em que há mudança do ligante bipiridina para fenantrolina, o logP se altera de valores negativos para valores positivos, ilustrando uma evidente redução do perfil de hidrossolubilidade, e demonstrando que o aumento da área de superfície aromática dos ligantes polipiridínicos resulta em aumento da lipofilicidade e consequente um possível aumento da absorção celular. Os valores de lipofilicidade estão geralmente associados a atividade biológica, indicando que para alcançar uma boa permeabilidade, o logP deve ser moderado possuindo um valor entre 0 e 3,¹⁸⁹ assim há um bom balanço entre solubilidade e permeabilidade, sendo capaz de expressar condições farmacodinâmicas e farmacocinéticas ideais.

A avaliação da captação celular de medicamentos tornou-se uma questão essencial durante o desenvolvimento de fármacos. Há casos interessantes da ausência de atividade biológica associada à baixa captação celular.^{190,191}

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 hidrofilicidade, buscando maior tempo de permanência no corpo, ainda que não excessivo.

O complexo **GRPA** apresentou valores de coeficiente maior (log P = 0,310 e LogD_{7.4} = 0,260) do que o **GRBA** (log P = -0,018 e LogD_{7.4} = 0,048), apresentando preferência pela fase lipídica (maior afinidade com octanol) e provavelmente permeará pelas membranas biológicas espontaneamente. Esses valores ainda são muito melhores do que os obtidos para [Ru(phen)₃]²⁺, [Ru(bpy)₃]²⁺, [Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺ e [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺. Para alcançar uma melhor permeabilidade, é preciso ter um valor moderado (0-3) de partição, assim pode-se notar que este complexo provavelmente apresentará uma promissora taxa de permeabilidade nas biomembranas hidrofóbicas.¹⁸⁹

Tabela 11 – Valores de coeficientes de partição (log P) para os compostos.

Composto	Log P	Log D _{7,4}
GRPA	+0,310 (±0,005)	+0,260 (±0,003)
GRBA	-0,018 (±0,004)	-0,048 (±0,004)
[Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺ ¹⁸⁹	-2,50	-
[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ ¹⁸⁹	-1,48	-
[Ru(phen)₃]²⁺ ¹⁸⁹	-0,33	-
[Ru(bpy)₃]²⁺ ¹⁸⁹	-0,41	-
[Ru(bpy)(bpy-anth)(dppz)]²⁺⁸⁸	+0,808	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.10 Ensaios biológicos

4.10.1 Ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC) em bactérias Gram positivas e negativas.

A fim de investigar se os complexos sintetizados apresentariam potencial atividade biológica frente a alguns 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 com tempo de incubação de 1h, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 11. As medidas foram realizadas em parceria com o Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS (UFC) (Dr. Prof. Edson Holanda).

Os resultados mostraram que os complexos investigados, **GRPA** ou **GRBA**, não foram capazes de apresentar atividade antibacteriana frente às cepas Gram-negativas empregadas, mesmo com irradiação de luz azul por 1h, podendo ser devido à presença de uma estrutura mais complexa da parede celular diminuindo a permeabilidade desses compostos na membrana bacteriana. Por outro lado, as cepas bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), apresentaram ação bacteriostática e bactericida com ambos complexos.

Para as bactérias Gram-positivas, as cepas quando tratadas com os complexos no escuro não apresentaram respostas, porém, através de estímulo luminoso os complexos se mostraram

ativos. Esse comportamento é desejado, cujo objetivo em fototerapia é conferir atividade somente com irradiação de luz, o que demonstra grande potencial para esses complexos.

Os valores de MIC e MBC para **GRPA** e **GRBA** variaram entre 1,9 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$, no qual **GRBA** apresentou um resultado melhorado para a cepa *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 12). Observou-se um aumento expressivo na atividade antimicrobiana com irradiação de luz, com aumento de até 131 vezes para a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 para ambos os complexos e para a cepa *S. aureus* ATCC 700698 quando tratada com **GRPA**. Esses resultados reforçam a expressiva fotosseletividade que esses compostos mostraram contra bactérias Gram-positivas. Outros experimentos, como citotoxicidade em células de mamíferos e ensaios com fungos serão avaliados para observar e comparar melhor a atividade desses complexos. Vale ressaltar que a *S. aureus* ATCC 700698 é uma cepa resistente à meticilina, isolada do escarro de um paciente com câncer de pulmão e pneumonia, e a *S. epidermidis* ATCC 35984 foi isolada de um caso de sepse associada a cateter.

O crescimento global de infecções por microrganismos multirresistentes representa uma crise de saúde pública impulsionada, de modo geral, pelo uso indiscriminado de antibióticos. Estratégias de ativação de antibióticos por luz, podem minimizar este problema ao limitar a ativação do fármaco a áreas específicas sob irradiação controlada. Dessa forma, compostos ativados por luz, quando descartados de forma inadequada, não induziriam resistência bacteriana. Esse tipo de tratamento também poderia ser empregado para a descontaminação de dispositivos médicos (como cateteres), frequentemente expostos à contaminação por bactérias nosocomiais, como a *S. epidermidis* ATCC 35984. Assim, os resultados indicam o alto potencial desses complexos como agentes antimicrobianos, especialmente em aplicações fototerapêuticas.

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas [valores em $\mu\text{g/mL}$ e em ($\mu\text{mol L}^{-1}$)].

		<i>Bactéria Gram-positiva</i>				
Complexos	LED Azul Irradiação		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 700698	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984
GRPA	ON	MIC ^{a,*}	3,9 (3,4)	1,9 (1,6)	1,9 (1,6)	3,9 (3,4)
		MBC ^b	3,9 (3,4)	1,9 (1,6)	1,9 (1,6)	3,9 (3,4)
	OFF	MIC	62,5 (54,7)	250 (219)	ND	ND
		MBC	125 (109,5)	ND	ND	ND
GRBA	ON	MIC	1,9 (1,7)	1,9 (1,7)	1,9 (1,7)	3,9 (3,5)
		MBC	1,9 (1,7)	1,9 (1,7)	1,9 (1,7)	3,9 (3,5)
	OFF	MIC	15,6 (14,3)	62,5 (57,2)	ND	ND
		MBC	31,2 (28,5)	125 (114,3)	ND	ND

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

Fonte: elaborada pelo autor.

4.10.2 Sinergismo

O efeito sinérgico, ou sinergismo, refere-se a uma interação entre dois ou mais agentes que resulta em um efeito combinado maior do que os efeitos individuais de cada agente. Para tratamentos antimicrobianos, o sinergismo ocorre quando a combinação de dois compostos, como um antibiótico e um complexo metálico, gera uma atividade antimicrobiana mais potente do que aquela observada quando cada composto é usado isoladamente. Este fenômeno é particularmente relevante no combate à resistência bacteriana, pois pode aumentar a eficácia dos tratamentos, reduzir as doses necessárias dos agentes terapêuticos e, consequentemente, diminuir os efeitos colaterais. O sinergismo é quantitativamente avaliado por meio do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), em que um valor de $\text{FICI} \leq 0,5$ indica um efeito sinérgico entre os compostos testados.¹⁹²

Assim, foram realizados experimentos com os complexos de rutênio **GRPA** e **GRBA**, em combinação com antibióticos como ampicilina e tetraciclina, os quais mostraram resultados

promissores em relação ao sinergismo contra cepas bacterianas Gram-positivas resistentes. Os dados apresentados nas Tabelas 13 e 14 indicam que ambos os complexos metálicos, quando combinados com os antibióticos, reduziram significativamente a Concentração Inibitória Mínima (MIC) necessária para inibir o crescimento bacteriano, especialmente nas cepas de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*.

Os valores de FICI (Índice de Concentração Inibitória Fracionada) apontam que o **GRPA**, quando combinado com ampicilina, demonstrou um efeito sinérgico substancial, particularmente contra *S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35984, cujos valores de FICI foram de 0,125 e 0,124, respectivamente. Esses resultados indicam uma redução significativa na MIC dos antibióticos, sugerindo que o **GRPA** pode potencializar a ação antimicrobiana de ampicilina, até mesmo em cepas resistentes. Da mesma forma, observou-se um sinergismo notável com a tetraciclina contra *S. epidermidis* ATCC 12228, com um FICI de 0,311, reforçando a ideia de que o **GRPA** pode ser uma ferramenta importante no combate à resistência bacteriana.

Em relação ao complexo **GRBA**, a Tabela 14 também destaca um comportamento sinérgico, principalmente quando combinado com ampicilina, cuja cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou um FICI de 0,125, semelhante ao observado com o **GRPA**. Isso sugere que o **GRBA** compartilha uma eficácia comparável em melhorar a atividade dos antibióticos contra bactérias resistentes. No entanto, os resultados são mais variados com a tetraciclina, sendo que o efeito sinérgico foi observado apenas em *S. epidermidis* ATCC 12228 (FICI de 0,313), enquanto outras cepas apresentaram um comportamento indiferente.

Tabela 13 – Efeito do GRPA associado com os antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) em *S. aureus* e *S. epidermidis*.

CEPA BACTÉRIA	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIOTICO				EFEITO COMBINADO
	GRPA			AMP				
	MIC [#] µg/mL (µmol L ⁻¹) (individual)	MIC ^{\$} µg/mL (combinado)	FFIC _A	MIC µg/mL (µmol L ⁻¹) (individual)	MIC µg/mL (combinado)	FIC _B	FICI	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9 (3,41)	0,24	0,0615	0,39 (1,11)	0,024	0,0615	0,123	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9 (1,66)	0,12	0,0631	50 (143,10)	25	0,5	0,563	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9 (1,66)	0,12	0,0631	1,56 (4,46)	0,097	0,0622	0,125	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9 (3,41)	0,24	0,0615	1.000 (2.862)	62,5	0,0625	0,124	Sinergismo
	GRPA			TETRA				
	MIC µg/mL (µmol L ⁻¹) (individual)	MIC µg/mL (combinado)	FFIC _A	MIC µg/mL (µmol L ⁻¹) (individual)	MIC µg/mL (combinado)	FFIC _B	FFICI	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9 (3,41)	0,24	0,0615	0,39 (0,87)	0,024	0,0615	0,123	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9 (1,66)	0,12	0,0631	100 (225)	50	0,5	0,563	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9 (1,66)	0,12	0,0631	0,39 (0,87)	0,097	0,248	0,311	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9 (3,41)	0,48	0,123	0,19 (1,75)	0,024	0,126	0,25	Sinergismo

Concentração inibitória mínima individual (MIC), \$ Concentração inibitória mínima combinada (MIC), valores da concentração inibitória fraccionada (FIC) e do índice de combinação inibitória fraccionada (FICI). FICI ≤ 0,5 significa efeito sinérgico, FICI > 0,5 ≤ 4,0 significa efeito indiferente, FICI > 4,0 significa efeito antagónico.

Tabela 14 - Efeito do GRBA associado com os antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) em *S. aureus* e *S. epidermidis*.

CEPA BACTÉRIA	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIOTICO				EFEITO COMBINADO	
	GRBA			AMP					
	MIC [#] $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (individual)	MIC ^{\$} $\mu\text{g/mL}$ (combinado)	FFIC _A	MIC $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (individual)	MIC $\mu\text{g/mL}$ (combinado)	FFIC _B	FFICI		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9 (3,57)	0,975	0,25	0,39 (1,11)	0,097	0,25	0,5	Sinergismo	
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9 (1,74)	0,95	0,5	50 (143,10)	25	0,5	1	Indiferente	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9 (1,74)	0,12	0,0631	1,56 (4,46)	0,097	0,0621	0,125	Sinergismo	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9 (3,57)	0,24	0,0615	1.000 (2.862)	62,5	0,0625	0,124	Sinergismo	
GRBA			FFICI	TETRA					
	MIC $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (individual)	MIC $\mu\text{g/mL}$ (combinado)		MIC $\mu\text{g/mL}$ (individual)	MIC $\mu\text{g/mL}$ (combinado)	FFIC _B	FFICI		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9 (3,57)	0,24		0,39 (0,87)	0,195	0,5	Indiferente		
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9 (1,74)	0,12	0,0631	100 (225)	50	0,5	Indiferente		
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9 (1,74)	0,12	0,0631	0,39 (0,87)	0,097	0,25	0,313	Sinergismo	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9 (3,57)	0,24	0,0615	0,19 (0,43)	0,097	0,5	0,561	Indiferente	

Concentração inibitória mínima individual (MIC), \$ Concentração inibitória mínima combinada (MIC), valores da concentração inibitória fraccionada (FIC) e do índice de combinação inibitória fraccionada (FICI). FICI $\leq 0,5$ significa efeito sinérgico, FICI $> 0,5 \leq 4,0$ significa efeito indiferente, FICI $> 4,0$ significa efeito antagónico.

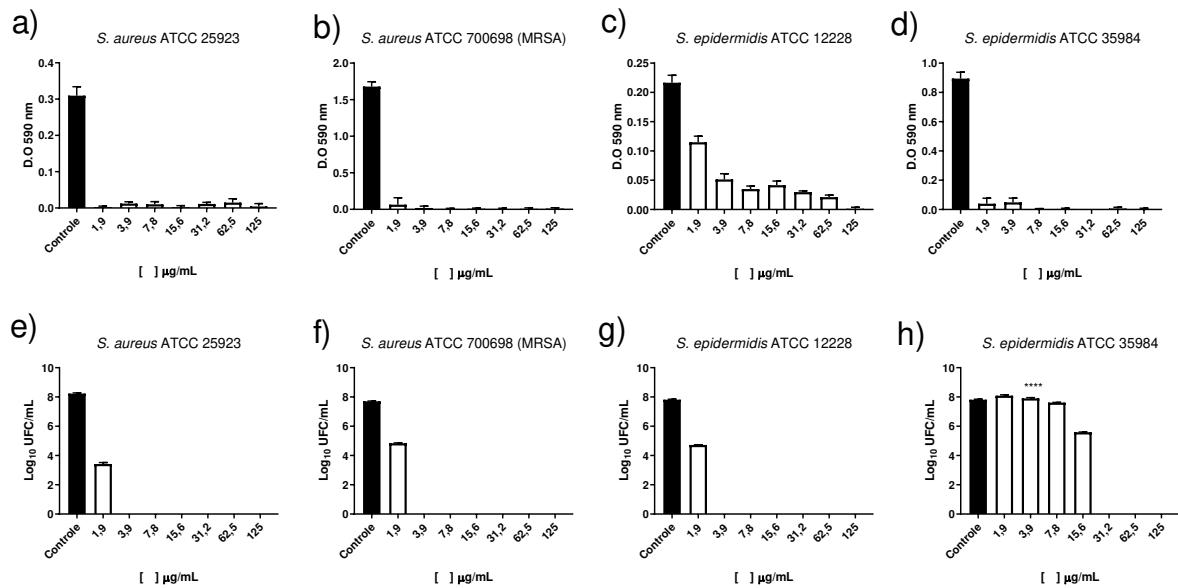
Esses resultados evidenciam um comportamento diferencial para o **GRBA** e **GRPA** em superar a resistência antimicrobiana, demonstrando a eficácia do uso combinado com antibióticos tradicionais. A capacidade dos complexos **GRPA** e **GRBA** de reduzir a Concentração Minima Inibitoria (MIC) e mostrar sinergismo com antibióticos destaca sua relevância como possíveis agentes no tratamento de infecções com bactérias resistentes. O efeito sinérgico foi significativo quando o **GRPA** foi combinado com ampicilina e tetraciclina, e também quando o **GRBA** foi combinado com ampicilina.

4.10.3 Biofilme

A quantificação da biomassa e o ensaio dos biofilmes pré-formados foram avaliadas com base nos experimentos com os complexos **GRPA** e **GRBA**, utilizando métodos de coloração com cristal violeta (CV) e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) utilizando várias cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Esses ensaios são fundamentais para entender como os complexos interagem com biofilmes, comunidades microbianas organizadas e aderidas em superfícies. Essa organização proporciona uma barreira física que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos, apresentando grande resistência a tratamentos antimicrobianos convencionais, principalmente em infecções hospitalares e dispositivos médicos (cateteres).

O ensaio de cristal violeta (CV) é utilizado para medir a quantidade de biomassa do biofilme, representando a densidade celular e a matriz extracelular presente nas bactérias aderidas. A contagem de unidade formadoras de colônias (UFC) é um método que quantifica as células viáveis presentes no biofilme, mostrando se o tratamento antimicrobiano foi eficaz em reduzir a viabilidade bacteriana.

Figura 58 – Efeito do complexo **GRPA** sobre biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



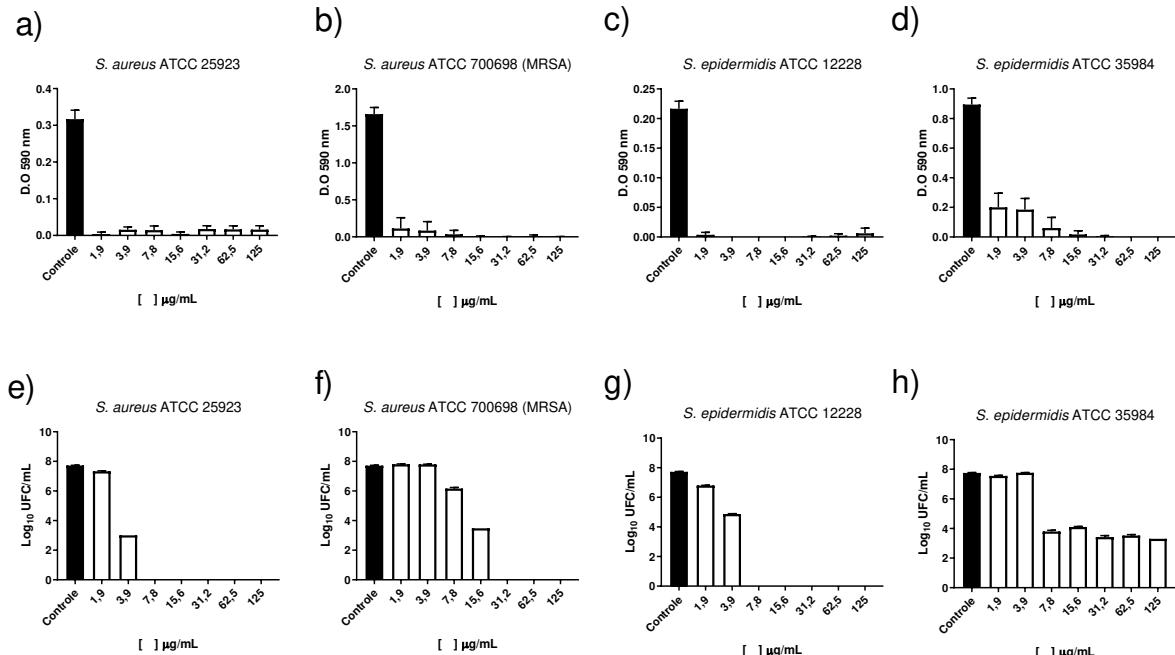
Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h). Barras brancas representam bactérias tratadas com GRPA, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

****p<0,001 em relação ao controle.

O complexo **GRPA** mostrou uma inibição significativa da formação de biomassa nas cepas testadas (Figura 58). A cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 foi a menos suscetível, ainda assim com uma redução de cerca de 80% da biomassa. Por outro lado, as cepas *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. aureus* ATCC 700698 apresentaram inibição quase completa, com uma média de 98,9% de redução da biomassa. Outras cepas variaram entre 95% e 99% de inibição, destacando a eficácia do complexo em destruir a estrutura dos biofilmes bacterianos, sendo a diferença na suscetibilidade das cepas um ponto importante a ser considerado no desenvolvimento de novos tratamentos antibacterianos.

Em relação à contagem de UFCs, o **GRPA** foi eficaz na redução significativa da viabilidade de várias cepas. A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou uma redução modesta de 2 logs na concentração de 15,6 µg/mL (13,7 µmol L⁻¹), mas uma redução de até 8 logs foi observada nas concentrações mais altas de 125 (109,5 µmol L⁻¹) a 31,6 µg/mL (27,7 µmol L⁻¹). Para outras cepas, a redução foi consistente em torno de 8 logs, o que demonstra o potencial letal do **GRPA** quando ativado por luz.

Figura 59 – Efeito do complexo **GRBA** sobre biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h). Barras brancas representam bactérias tratadas com GRBA, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

****p<0,001 em relação ao controle.

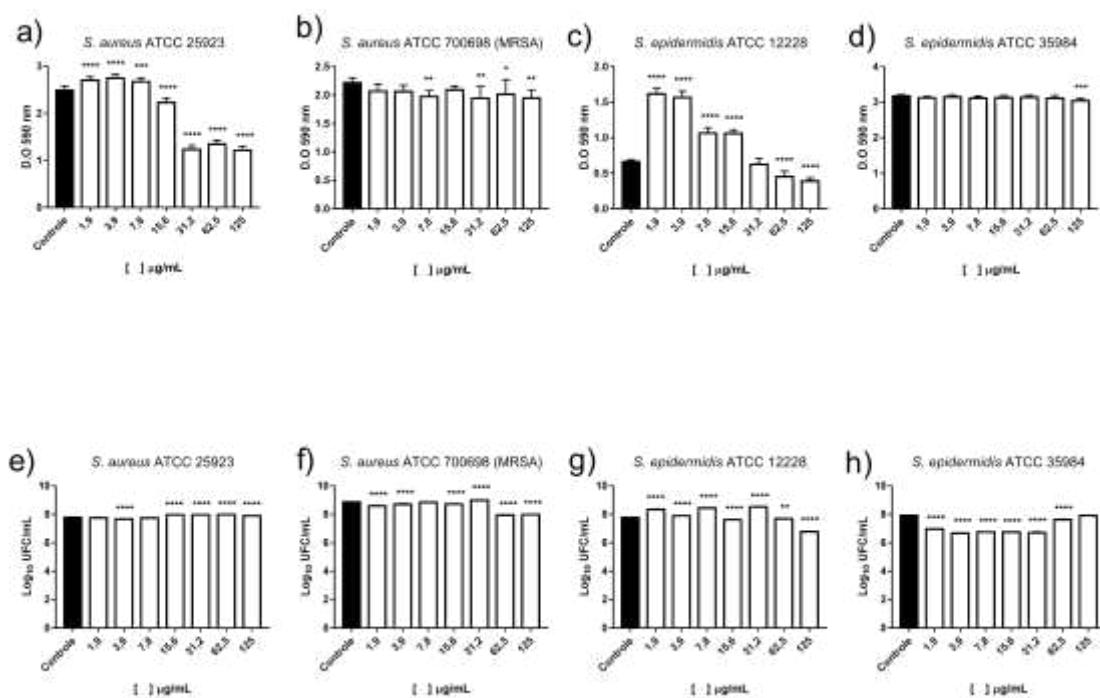
O complexo **GRBA** também demonstrou forte atividade antimicrobiana, inibindo significativamente a formação de biomassa em todas as cepas testadas (Figura 59). A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, no entanto, foi mais resistente, com inibição de 77%, enquanto a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou a maior inibição, com uma eliminação total da formação de biomassa nas concentrações de 15,6 (14,3 µmol L⁻¹) a 3,9 µg/mL (3,6 µmol L⁻¹). A cepa *S. aureus* ATCC 700698 também teve a eliminação de 100% nas concentrações mais altas. Assim, evidenciando a potência do **GRBA** na prevenção da formação de biofilmes em um espectro de concentrações.

O complexo **GRBA** mostrou efeitos significativos na redução do número de UFCs nas cepas testadas. A *S. aureus* ATCC 700698 foi a mais suscetível, com redução de 8 logs nas concentrações mais altas. Adicionalmente, com a *S. epidermidis* ATCC 12228 observou-se redução significativa nas concentrações de 125 µg/mL (114,3 µmol L⁻¹) a 7,8 µg/mL (7,13 µmol L⁻¹) do complexo. A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, embora mais resistente, ainda apresentou uma redução de 1 a 4 logs no número de UFCs. Esses resultados destacam a

importância de ajustar as concentrações dos complexos para otimizar o efeito antimicrobiano, especialmente em cepas mais resistentes.

Assim, os complexos **GRPA** e **GRBA** demonstraram uma atividade antimicrobiana eficaz na redução da biomassa e na viabilidade dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, microrganismos frequentemente associados a infecções hospitalares e de difícil tratamento devido à resistência antimicrobiana. Os biofilmes são naturalmente mais resistentes a antibióticos devido à proteção oferecida pela matriz extracelular e à densidade celular elevada. A eficácia observada nos ensaios sugere que a fotoirradiação potencializa a atividade dos complexos de rutênio, tornando-os promissores como agentes antimicrobianos em ambientes clínicos onde o tratamento de biofilmes é desafiador.

Figura 60 – Efeito do complexo **GRPA** sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h).

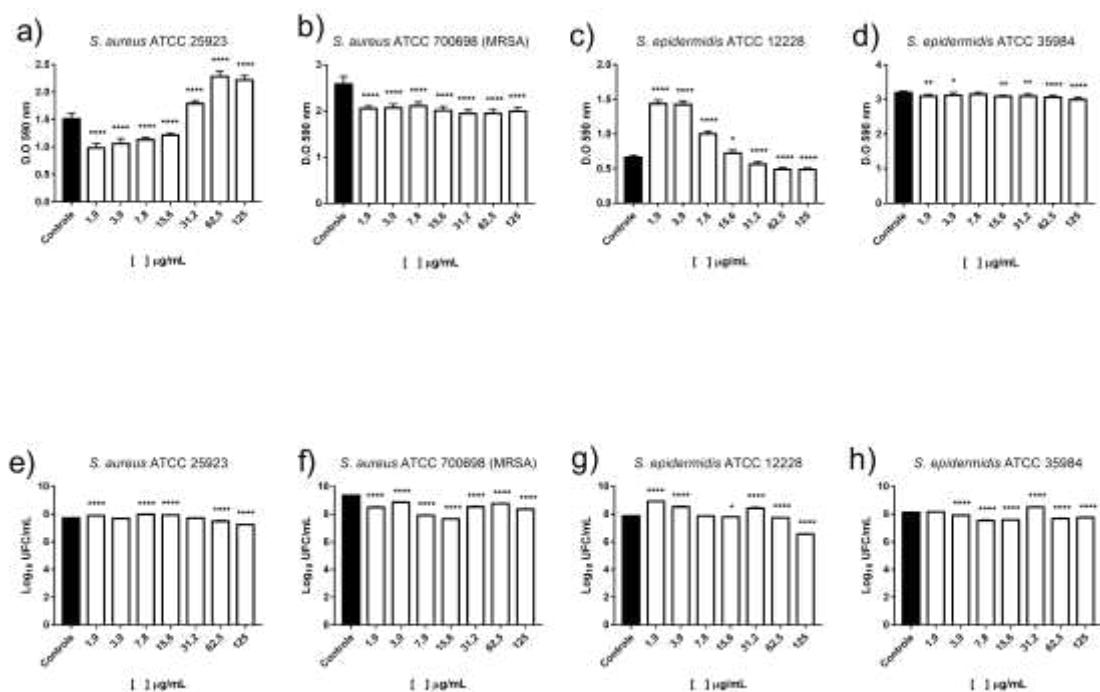
Barras brancas representam bactérias tratadas com **GRPA**, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

****p<0,001 em relação ao controle.

Os biofilmes pré-formados representam um desafio, e os complexos mostraram uma resposta variada. Para o **GRPA**, a redução da biomassa pré-formada variou de 4% (*S. epidermidis* ATCC 35984) a 51% (*S. aureus* ATCC 25923), com uma tendência de menor

eficácia nas concentrações mais altas (Figura 60). No entanto, os resultados indicam que o **GRPA** foi mais eficaz nas outras cepas (*S. aureus* ATCC 25923 - 51%, *S. aureus* ATCC 700698 - 12% e *S. epidermidis* ATCC 12228 - 41%), com redução significativa da biomassa. Quanto à contagem de UFCs, o **GRPA** não foi capaz de reduzir de forma expressiva o número de células viáveis, exceto para a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, que apresentou uma redução inferior a 1 log nas concentrações mais baixas.

Figura 61 – Efeito do complexo **GRBA** sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h).

Barras brancas representam bactérias tratadas com GRBA, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

****p<0,001 em relação ao controle.

O **GRBA**, mostrou-se mais eficaz na cepa *S. aureus* ATCC 700698, com uma redução de biomassa pré-formada em torno de 21%, enquanto a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 exibiu uma maior produção de biomassa nas concentrações mais altas, sugerindo que concentrações mais baixas podem ser mais eficazes nesse caso indicando um efeito paradoxal (Figura 61). A contagem de UFC's para o **GRBA** também revelou uma redução significativa para *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698, embora a *S. epidermidis* ATCC 12228 tenha apresentado um aumento no número de células nas menores concentrações.

De forma geral, esses resultados são promissores e demonstram o potencial dos complexos **GRPA** e **GRBA** no tratamento de biofilmes bacterianos resistentes. A alta taxa de inibição de biomassa e a significativa redução no número de UFC's, especialmente em cepas relevantes como *S. aureus* ATCC 700698, destacam o valor terapêutico desses complexos de rutênio, especialmente quando combinados com estratégias de fotoirradiação. No entanto, o efeito paradoxal observado em algumas cepas sugere que o ajuste fino das concentrações é necessário para otimizar a eficácia antimicrobiana. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que visam a destruição de biofilmes em infecções persistentes e de difícil tratamento.

4.10.4 Ensaios de Citotoxicidade

Outros estudos biológicos foram realizados em que os complexos metálicos **GRPA** e **GRBA** foram investigados avaliando suas potencialidades citotóxicas em várias linhagens de células de carcinoma humano, como MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano de fenótipo mesenquimal), A549 (adenocarcinoma de células basais epiteliais alveolares pulmonares humanas), A2780 (adenocarcinoma ovariano humano) e em uma célula normal saudável MRC-5 (pulmão humano não tumoral). Em geral, ambos os complexos metálicos mostraram citotoxicidade contra todos os diferentes tipos de células cancerosas testadas, tanto no escuro quanto sob irradiação de luz azul, com valores de IC₅₀ variando de níveis micromolares a nanomolares, sugerindo ainda uma dependência fotoinduzida na atividade citotóxica desses compostos (Tabela 15).

O **GRPA** apresentou valores de IC₅₀ sem irradiação de luz de 1,51, 1,99 e 6,14 µmol L⁻¹ para as linhagens celulares A2780, MDA-MB-231 e A549, respectivamente. Esses valores indicam uma atividade citotóxica bastante expressiva mesmo no escuro, com maior eficácia contra a linhagem A2780. A citotoxicidade foi melhorada com a irradiação de luz azul (460 nm por 10 minutos, 10,8 J/cm²), apresentando valores de IC₅₀ de 0,23, 0,39 e 1,03 µmol L⁻¹ para as linhagens celulares A2780, MDA-MB-231 e A549, respectivamente. Esta resposta à luz resultou em um índice de fotoletalividade moderado (IC₅₀_escuro/IC₅₀_luz) de aproximadamente 6,6, 5,1 e 6,0 vezes de melhoria para as linhagens celulares A2780, MDA-MB-231 e A549, respectivamente. Apesar disso, a citotoxicidade frente às células MRC-5 saudáveis no escuro foi moderada (IC₅₀ = 14 µmol L⁻¹), o que significa que apenas com a irradiação de luz este composto pode causar danos celulares significativos, permitindo um tratamento localizado, como desejado para a fototerapia.

No escuro, o **GRBA** mostrou valores de IC_{50} de 3,71, 4,48 e 16,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as linhagens celulares A2780, MDA-MB-231 e A549, respectivamente, que foram levemente superiores aos medidos para o **GRPA**. No entanto, este complexo metálico apresentou um efeito notável de fotoativação com IC_{50} muito baixo, sob irradiação de luz azul, de 0,013, 0,043 e 0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as linhagens celulares A2780, MDA-MB-231 e A549, respectivamente. Esses resultados mostraram citotoxicidade em concentrações de 13 a 43 nmol L^{-1} , o que significou um aumento na atividade de 104 até 285 vezes com o uso de luz azul. Para células MRC-5 saudáveis, não houve citotoxicidade mensurável no escuro até 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esse resultado também pode ser interpretado como que, ao aplicar esse composto, não seria observado citotoxicidade até que a luz fosse aplicada, o que se espera que seja feito em uma região precisa de um tumor, causando então uma ativação de até 3.800 vezes, desencadeando a citotoxicidade total.

Notavelmente, o **GRBA** foi expressivamente mais potente e fotoativo do que o **GRPA**, mesmo com menor citotoxicidade para células saudáveis. Alguns complexos de rutênio relatados apresentam propriedades fotoativas, com citotoxicidade aprimorada após irradiação de luz, possuindo fotoseletividade aprimorada para terapia.^{158,193,194} O mecanismo de ação desses compostos fotoativos geralmente envolve a fotoprodução de espécies reativas de oxigênio,¹⁵⁹ que podem causar danos às células alvo.

Tabela 15 – Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para os complexos **GRPA** e **GRBA** nas linhas celulares MDA-MB-231 (adenocarcinoma da mama humano triplo-negativo de fenótipo mesenquimal), A2780 (adenocarcinoma do ovário humano), A549 (adenocarcinoma de células basais do epitélio alveolar do pulmão humano) e MRC-5 (pulmão humano não tumoral) no escuro e após irradiação de luz (460 nm, 10 min, 10,8 J cm^{-2}) e 48 h de incubação.

Citotoxicidade IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)													
	MDA-MB-231			A2780			A549			MRC-5			
Luz	OFF	ON	PI	OFF	ON	PI	OFF	ON	PI	OFF	ON	PI	
GRPA	1.99	0.39		1.51	0.23		6.14	1.03		14.09	0.34		
	±	±	5.1	±	±	6.6	±	±	6.0	±	±	41	
	0.11	0.01		0.03	0.01		0.57	0.06		0.98	0.03		
GRBA	4.48	0.043		3.71	0.013		16.98	0.18		0.09			
	±	±	104.2	±	±	285	±	±	94	> 50	±	>555	
	0.53	0.009		0.20	0.005		1.35	0.02		0.01			

Fonte: Elaborada pelo autor.

Previamente, mostramos que é possível que ambos os complexos metálicos, **GRPA** e **GRBA**, gerem espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete e superóxido. Essas espécies podem desempenhar um papel importante na citotoxicidade desses complexos metálicos. No caso do **GRBA**, outras possíveis reações na matriz biológica (por exemplo, estimuladas pela glutationa) podem levar à formação de subprodutos ainda mais citotóxicos, o que poderia explicar sua maior atividade em comparação com o **GRPA**. Isso sugere que o ambiente biológico pode desempenhar um papel na ativação e potencialização da atividade citotóxica desses complexos metálicos. Além disso, suas diferenças estruturais poderiam levar a distintas captações e/ou localizações celulares, resultando em respostas fotocitotóxicas distintas. Os dados *in vitro* sugeririam que o **GRPA** seria o composto mais bioativo esperado, considerando LogP, ligação ao DNA, alto rendimento de oxigênio singlete, todavia, o **GRBA** foi o mais eficaz frente às células cancerosas.

A superioridade do **GRBA** em relação ao **GRPA**, especialmente contra a linhagem MDA-MB-231, que é um subtipo agressivo de câncer de mama triplo-negativo, reforça a relevância desses compostos no desenvolvimento de novos tratamentos fototerapêuticos. Este subtipo de câncer é notoriamente difícil de tratar, e o **GRBA**, com um IC₅₀ de 43 nmol L⁻¹ sob luz azul, apresenta-se como uma opção promissora para estudos futuros.

Tabela 16 – Índice de seletividade (SI) dos compostos metálicos na ausência de luz para diferentes linhagens de células tumorais através da razão SI = IC₅₀(MRC-5)/IC₅₀(tumor cell).

SI	MDA-MB-231	A2780	A549
GRPA	7.1	9.3	2.3
GRBA	> 11.2	> 13.5	> 2.9

Fonte: Elaborada pelo autor.

Existem alguns compostos com atividade promissora contra este tipo de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), como [Ru(dpphen)₂(dmbpy)]²⁺ (sendo dpphen = 4,7-difenil-1,10-fenantrolina e dmbpy = 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina). Este composto mostrou um IC₅₀ de 0,74 µmol L⁻¹ após 30 minutos de irradiação de luz azul com incubação celular de 72 horas.¹⁹⁵ Em outro caso, um complexo de bifosfina de rutênio, [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ (sendo GA = ácido gálico e dppe = 1,2-bis(difenilfosfino)etano) exibiu um IC₅₀ de 0,84 µmol L⁻¹ sem qualquer irradiação de luz (após 48 horas de incubação celular).¹⁹⁶ Da mesma forma, um composto de

rutênio baseado em terpiridina, $[\text{Ru}(\text{tpy-CM})_2]\text{Cl}_2$ (sendo tpy-CM = [2,2':6',2"-terpiridina]-4'-il)-N,N-bis(2-cloroetil)anilina)¹⁹⁷ mostrou IC_{50} de 2,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, também sem irradiação de luz, mas com uma incubação celular mais longa de 72 horas. Ao combinar um composto de rutênio baseado em bipiridina, $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})_2]$ (sendo HPIP = (2-Hidroxifenil)imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina), com uma droga anticâncer conhecida, a doxorrubicina, os autores obtiveram um IC_{50} de 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sem luz e com incubação celular de 24 horas.¹⁹⁸ Um dos melhores compostos de rutênio para eliminação das células MDA-MB-231 foi o ct-[$\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{dpqQX})\text{PF}_6$] (sendo dppb = 1,4-bis(difenilfosfino)butano) e dpqQX = dipirido[3,2-a:2',3'-c]quinoxalina[2,3-b]quinoxalina), cujo IC_{50} foi de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ medido sem irradiação de luz e após um tempo de incubação celular de 48 horas.¹⁹⁹ No caso do **GRBA**, apresentou algumas características muito interessantes, inclusive uma potente citotoxicidade alcançada com irradiação de luz ($\text{IC}_{50} = 43 \text{ nmol L}^{-1}$), enquanto sem luz apenas uma citotoxicidade modesta é observada, tornando-o atraente para a fototerapia.

5 CONCLUSÃO

Os complexos de rutênio **GRPA** e **GRBA** demonstraram ser moléculas promissoras, tanto em aplicações anticancer quanto antimicrobianas, destacando-se como candidatos relevantes para futuras investigações. A partir da funcionalização da bipiridina com o grupo antracenil combinado com os outros ligantes auxiliares presentes nas estruturas dos dois complexos foi possível torna-los seletivos e com potencial terapêutico. Ainda foi possível demonstrar diversas características como lipofilicidade, ligação ao DNA, particularmente com estruturas não canônicas como o DNA G-quadruplex e vias fotoquímicas para a geração de espécies reativas de oxigênio.

As sequências de DNA do tipo G-quadruplexes estão presentes em regiões teloméricas e promotoras de genes oncogênicos, sendo alvos biológicos para diferentes tipos de câncer, incluindo mama, ovário e pulmão. Os resultados dessa tese mostraram que ambos os complexos **GRPA** e **GRBA** interagem com essas estruturas de DNA do tipo G-quadruplex, estabilizando suas conformações e induzindo mudanças estruturais. Esta estabilização é fundamental, pois pode inibir processos relacionados à proliferação celular, como a atividade da telomerase, que está diretamente associada à imortalidade celular em muitos casos de câncer.

As propriedades fotoativas desses complexos também foram notáveis, especialmente em combinação com luz azul, sendo que o **GRBA** se destacou como um potente agente fototerapêutico, apresentando uma atividade mais de 100 vezes superior em células agressivas de câncer como o de mama triplo negativo, MDA-MB-23 ($IC_{50} = 43 \text{ nmol L}^{-1}$) e ainda mais eficaz em células de câncer de ovário ($IC_{50} = 13 \text{ nmol L}^{-1}$). Além disso, o **GRBA** mostrou um aumento de 94 vezes na citotoxicidade contra células de câncer de pulmão (A549), sem apresentar citotoxicidade em células pulmonares saudáveis no escuro ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol L}^{-1}$).

O comportamento fotoativado específico desses complexos, gerando diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS), como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), os torna candidatos para terapia fotodinâmica altamente seletiva, com menor citotoxicidade em células saudáveis no escuro.

Em relação às propriedades antimicrobianas, ambos os complexos exibiram excelentes atividades contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, isolada de um paciente com câncer de pulmão, com uma melhora de mais de 130 vezes na atividade sob irradiação de luz. Além disso, a sinergia observada quando combinados com antibióticos clínicos, como ampicilina e tetraciclina, é especialmente promissora para o tratamento de infecções resistentes

associadas a biofilmes bacterianos. Esse efeito sinérgico, aliado à alta seletividade e fotossensibilidade, destaca o potencial desses complexos para o desenvolvimento de terapias combinadas que podem otimizar a eficácia no tratamento de infecções graves em pacientes com câncer.

Os resultados de fotoclivagem de DNA, as propriedades de ligação ao DNA (K_b de ordem 10^4), bem como a natureza intercalante do **GRPA** reforça seu potencial para interagir com estruturas de DNA, o que pode ser explorado em várias frentes terapêuticas. Além disso, as características lipofílicas (logP positivo), a possível satisfatória biodisponibilidade e citotoxicidade tornam esses complexos promissores para estudos futuros para desenvolvimento de fármacos.

Portanto, os complexos **GRPA** e **GRBA**, ao interagirem com o DNA G-quadruplex e induzirem mudanças conformacionais, oferecem uma nova via terapêutica para o combate a diversos tipos de câncer, ao mesmo tempo em que demonstram ser potentes agentes antimicrobianos e fototerapêuticos. Assim, representam uma nova geração de compostos multifuncionais, com promissora aplicação tanto no combate ao câncer quanto na eliminação de biofilmes bacterianos associados a infecções hospitalares, especialmente quando ativados por luz, abrindo caminho para desenvolvimento de terapias mais seletivas e eficazes.

REFERÊNCIAS

- (1) INCA. **Incidência de Câncer No Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
- (2) ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS); OMS. **Carga Global de Câncer Aumenta Em Meio a Crescente Necessidade de Serviços**. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2024-carga-global-cancer-aumenta-em-meio-crescente-necessidade-servicos>. Acesso em 18 agost. 2024.
- (3) URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VINALS, F.; CAPELLA, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. [s. l.] **CPD**, v. 16, n. 1, p. 3–10, 2010.
- (4) BONNETT, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. 1. ed. London: Gordon and Breach Science Publishers, 2000.
- (5) SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; COLEMAN, D. C. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Type XI Carrying Highly Divergent *mecA* , *mecI* , *mecR1* , *blaZ* , and *Ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemother**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.
- (6) SRISUKNIMIT, V.; QIAO, Y.; SCHAEFER, K.; KAHNE, D.; WALKER, S. Peptidoglycan Cross-Linking Preferences of *Staphylococcus Aureus* Penicillin-Binding Proteins Have Implications for Treating MRSA Infections. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 139, n. 29, p. 9791–9794, 2011.
- (7) SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. e00026-19, 2020.
- (8) OLIVEIRA, W. F.; SILVA, P. M. S.; SILVA, R. C. S.; SILVA, G. M. M.; MACHADO, G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis* Infections on Implants. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 111–117, 2018.
- (9) OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiol Spectrum**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2018.
- (10) BARANELLO, L.; LEVENS, D.; GUPTA, A.; KOUZINE, F. The Importance of Being Supercoiled: How DNA Mechanics Regulate Dynamic Processes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, [s. l.], v. 1819, n. 7, p. 632–638, 2012.

- (11) LU, X.-J. 3DNA: A Software Package for the Analysis, Rebuilding and Visualization of Three-Dimensional Nucleic Acid Structures. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 31, n. 17, p. 5108–5121, 2003.
- (12) MORADI, M.; BABIN, V.; ROLAND, C.; SAGUI, C. Reaction Path Ensemble of the B–Z-DNA Transition: A Comprehensive Atomistic Study. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 33–43, 2013.
- (13) APPS, M. G.; CHOI, E. H. Y.; WHEATE, N. J. The State-of-Play and Future of Platinum Drugs. **Endocrine-Related Cancer**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. R219–R233, 2015.
- (14) ALMAQWASHI, A. A.; PARAMANATHAN, T.; ROUZINA, I.; WILLIAMS, M. C. Mechanisms of Small Molecule–DNA Interactions Probed by Single-Molecule Force Spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 3971–3988, 2016.
- (15) HARPER, B. W.; LI, F.; BEARD, R.; GARBUTCHEON-SINGH, K. B.; NG, N. S.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Biomolecular Interactions of Platinum Complexes. In: Schneider, H. J. (Org.). **Supramolecular Systems in Biomedical Fields**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2013, p. 260–299.
- (16) YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s.l.], v. 1845, n. 1, p. 84–89, 2014.
- (17) KOSIOL, N.; JURANEK, S.; BROSSART, P.; HEINE, A.; PAESCHKE, K. G-Quadruplexes: A Promising Target for Cancer Therapy. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 40, 2021.
- (18) HUANG, F.; CHANG, C.; WANG, J.; CHANG, T.; LIN, J. Induction of Senescence in Cancer Cells by the G-quadruplex Stabilizer, BMVC4, Is Independent of Its Telomerase Inhibitory Activity. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 167, n. 2, p. 393–406, 2012.
- (19) NOH, B.; BLASCO-CONEZA, M. P.; LAI, Y.-J.; GANESH, B. P.; URAYAMA, A.; MORENO-GONZALEZ, I.; MARRELLI, S. P.; MCCULLOUGH, L. D.; MORUNO-MANCHON, J. F. G-Quadruplexes Stabilization Upregulates CCN1 and Accelerates Aging in Cultured Cerebral Endothelial Cells. **Frontiers in Aging**, [s.l.], v. 2, p. 797562, 2022.
- (20) SATO, K.; KNIPSCHEER, P. G-Quadruplex Resolution: From Molecular Mechanisms to Physiological Relevance. **DNA Repair**, [s.l.], v. 130, p. 103552, 2023.
- (21) AWADASSEID, A.; MA, X.; WU, Y.; ZHANG, W. G-Quadruplex Stabilization via Small-Molecules as a Potential Anti-Cancer Strategy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 139, p. 111550, 2021.

- (22) BURGE, S.; PARKINSON, G. N.; HAZEL, P.; TODD, A. K.; NEIDLE, S. Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 34, n. 19, p. 5402–5415, 2006.
- (23) SPIEGEL, J.; ADHIKARI, S.; BALASUBRAMANIAN, S. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes. **Trends in Chemistry**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 123–136, 2020.
- (24) ZEGERS, J.; PETERS, M.; ALBADA, B. DNA G-Quadruplex-Stabilizing Metal Complexes as Anticancer Drugs. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 117–138, 2022.
- (25) YANG, D. G-Quadruplex DNA and RNA. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 2035, p. 1–24, 2019.
- (26) BHATTACHARYYA, D.; MIRIHANA ARACHCHILAGE, G.; BASU, S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. **Frontiers in Chemistry**, [s.l.], v. 4, 2016.
- (27) KUMAR, S.; BISWAS, A.; SUDHAKAR, S.; KUMARI, D.; PRADEEPKUMAR, P. I. Estrone-Based Derivatives Stabilize the c-MYC and c-KIT G-Quadruplex DNA Structures. **ACS Omega**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 6616–6626, 2024.
- (28) SINGH, M.; GUPTA, R.; COMEZ, L.; PACIARONI, A.; RANI, R.; KUMAR, V. BCL2 G Quadruplex-Binding Small Molecules: Current Status and Prospects for the Development of next-Generation Anticancer Therapeutics. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 27, n. 9, p. 2551–2561, 2022.
- (29) D'ARIA, F.; D'AMORE, V. M.; DI LEVA, F. S.; AMATO, J.; CATERINO, M.; RUSSOMANNO, P.; SALERNO, S.; BARRESI, E.; DE LEO, M.; MARINI, A. M.; TALIANI, S.; DA SETTIMO, F.; SALGADO, G. F.; POMPILI, L.; ZIZZA, P.; SHIRASAWA, S.; NOVELLINO, E.; BIROCCIO, A.; MARINELLI, L.; GIANCOLA, C. Targeting the KRAS Oncogene: Synthesis, Physicochemical and Biological Evaluation of Novel G-Quadruplex DNA Binders. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 149, p. 105337, 2020.
- (30) MUENCH, D.; REZZOUG, F.; THOMAS, S. D.; XIAO, J.; ISLAM, A.; MILLER, D. M.; SEDORIS, K. C. Quadruplex-Forming Oligonucleotide Targeted to the VEGF Promoter Inhibits Growth of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. e0211046, 2019.
- (31) WEN, L.; HAN, Z.; LI, J.; DU, Y. C-MYC and HIF1 α Promoter G-Quadruplexes Dependent Metabolic Regulation Mechanism of Berberine in Colon Cancer. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 1152–1168, 2022.
- (32) MERGNY, J.-L.; SEN, D. DNA Quadruplex Helices in Nanotechnology. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 119, n. 10, p. 6290–6325, 2019.

- (33) PROROK, P.; ARTUFEL, M.; AZE, A.; COULOMBE, P.; PEIFFER, I.; LACROIX, L.; GUÉDIN, A.; MERGNY, J.-L.; DAMASCHKE, J.; SCHEPERS, A.; CAYROU, C.; TEULADE-FICHOU, M.-P.; BALLESTER, B.; MÉCHALI, M. Involvement of G-Quadruplex Regions in Mammalian Replication Origin Activity. **Nature Communications**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 3274, 2019.
- (34) MURAT, P.; MARSICO, G.; HERDY, B.; GHANBARIAN, A. T.; PORTELLA, G.; BALASUBRAMANIAN, S. Correction to: RNA G-Quadruplexes at Upstream Open Reading Frames Cause DHX36- and DHX9-Dependent Translation of Human mRNAs. **Genome Biology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 124, 2019.
- (35) PAVLOVA, A. V.; KUBAREVA, E. A.; MONAKHOVA, M. V.; ZVEREVA, M. I.; DOLINNAYA, N. G. Impact of G-Quadruplexes on the Regulation of Genome Integrity, DNA Damage and Repair. **Biomolecules**, [s.l.], v. 11, n. 9, p. 1284, 2021.
- (36) KERKOUR, A.; MERGNY, J.-L.; SALGADO, G. F. NMR Based Model of Human Telomeric Repeat G-Quadruplex in Complex with 2,4,6-Triarylpyridine Family Ligand. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1861, n. 5, p. 1293–1302, 2017.
- (37) BRUSCHI, F., GRADONI, L., Eds. **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018.
- (38) ZHANG, Z.-H.; QIAN, S. H.; WEI, D.; CHEN, Z.-X. In Vivo Dynamics and Regulation of DNA G-Quadruplex Structures in Mammals. **Cell Bioscience**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 117, 2023.
- (39) VARSHNEY, D.; SPIEGEL, J.; ZYNER, K.; TANNAHILL, D.; BALASUBRAMANIAN, S. The Regulation and Functions of DNA and RNA G-Quadruplexes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 21, n. 8, p. 459–474, 2020.
- (40) FIGUEIREDO, J.; MERGNY, J.-L.; CRUZ, C. G-Quadruplex Ligands in Cancer Therapy: Progress, Challenges, and Clinical Perspectives. **Life Sciences**, [s.l.], v. 340, p. 122481, 2024.
- (41) SIDDIQUI-JAIN, A.; GRAND, C. L.; BEARSS, D. J.; HURLEY, L. H. Direct Evidence for a G-Quadruplex in a Promoter Region and Its Targeting with a Small Molecule to Repress c- MYC Transcription. **Proc. National Academy of Science U.S.A.**, [s.l.], v. 99, n. 18, p. 11593–11598, 2002.
- (42) COGOI, S.; XODO, L. E. G-Quadruplex Formation within the Promoter of the KRAS Proto-Oncogene and Its Effect on Transcription. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 34, n. 9, p. 2536–2549, 2006.

- (43) MOLNÁR, O. R.; VÉGH, A.; SOMKUTI, J.; SMELLER, L. Characterization of a G-Quadruplex from Hepatitis B Virus and Its Stabilization by Binding TMPyP4, BRACO19 and PhenDC3. **Science Reports**, v 11, n 1, p 23243, 2021.
- (44) MANAIA, M. N.; CHIORCEA-PAQUIM, A.-M. Cationic Porphyrin TMPyP4 Redox Behaviour and Interaction with Nucleic Acids: Towards a New Methodology for Screening Porphyrin-Based Anticancer Drugs. **Electrochimica Acta**, v 462, p 142749, 2023.
- (45) LIBERA, V.; FASOLATO, C.; RIPANTI, F.; CATALINI, S.; BERTINI, L.; PETRILLO, C.; SCHIRÒ, G.; D'AMICO, F.; ROSSI, B.; PACIARONI, A.; COMEZ, L. Molecular Mechanisms behind BRACO19 and Human Telomeric G-Quadruplex Interaction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 322, p. 124684, 2024.
- (46) MICCO, M.; COLLIE, G. W.; DALE, A. G.; OHNMACHT, S. A.; PAZITNA, I.; GUNARATNAM, M.; RESZKA, A. P.; NEIDLE, S. Structure-Based Design and Evaluation of Naphthalene Diimide G-Quadruplex Ligands As Telomere Targeting Agents in Pancreatic Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 7, p. 2959–2974, 2023.
- (47) MARCHETTI, C.; ZYNER, K. G.; OHNMACHT, S. A.; ROBSON, M.; HAIDER, S. M.; MORTON, J. P.; MARSICO, G.; VO, T.; LAUGHLIN-TOTH, S.; AHMED, A. A.; DI VITA, G.; PAZITNA, I.; GUNARATNAM, M.; BESSER, R. J.; ANDRADE, A. C. G.; DIOCOU, S.; PIKE, J. A.; TANNAHILL, D.; PEDLEY, R. B.; EVANS, T. R. J.; WILSON, W. D.; BALASUBRAMANIAN, S.; NEIDLE, S. Targeting Multiple Effector Pathways in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with a G-Quadruplex-Binding Small Molecule. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 61, n. 6, p. 2500–2517, 2018.
- (48) PRIETO OTOYA, T. D.; MCQUAID, K. T.; CARDIN, C. J. Structural Insights into G-Quadruplex Binding by Metal Complexes: Implications for Drug Design. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], 2024.
- (49) WUMAIER, M.; SHI, J.-J.; YAO, T.-M.; HU, X.-C.; GAO, R.-R.; SHI, S. G-Quadruplex and Duplex DNA Binding Studies of Novel Ruthenium(II) Complexes Containing Ascididemin Ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 196, p. 110681, 2019.
- (50) MCQUAID, K. T.; TAKAHASHI, S.; BAUMGAERTNER, L.; CARDIN, D. J.; PATERSON, N. G.; HALL, J. P.; SUGIMOTO, N.; CARDIN, C. J. Ruthenium Polypyridyl Complex Bound to a Unimolecular Chair-Form G-Quadruplex. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 144, n. 13, p. 5956–5964, 2022.
- (51) PIRAX, G.; BAR, L.; ABRAHAM, M.; LAVERGNE, T.; JAMET, H.; DEJEU, J.; MARCÉLIS, L.; DEFRENCQ, E.; ELIAS, B. New Ruthenium-Based Probes for

- Selective G-Quadruplex Targeting. **Chemistry A European Journal**, [s.l.], v. 23, n. 49, p. 11872–11880, 2017.
- (52) GILLARD, M.; PIRAUT, G.; DAENEN, M.; ABRAHAM, M.; TROIAN-GAUTIER, L.; BAR, L.; BONNET, H.; LOISEAU, F.; JAMET, H.; DEJEU, J.; DEFRENCQ, E.; ELIAS, B. Photo-Oxidizing Ruthenium(II) Complexes with Enhanced Visible-Light Absorption and G-Quadruplex DNA Binding Abilities. **Chemistry A European Journal**, [s.l.], v. 28, n. 66, p. e202202251, 2022.
- (53) ZHANG, J.; YU, Q.; LI, Q.; YANG, L.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; LIU, J. A Ruthenium(II) Complex Capable of Inducing and Stabilizing Bcl-2 G-Quadruplex Formation as a Potential Cancer Inhibitor. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 134, p. 1–11, 2014.
- (54) YUSOH, N. A.; TILEY, P. R.; JAMES, S. D.; HARUN, S. N.; THOMAS, J. A.; SAAD, N.; HII, L.-W.; CHIA, S. L.; GILL, M. R.; AHMAD, H. Discovery of Ruthenium(II) Metallocompound and Olaparib Synergy for Cancer Combination Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 66, n. 10, p. 6922–6937, 2023.
- (55) MITCHELL, R. J.; GOWDA, A. S.; OLIVELLI, A. G.; HUCKABA, A. J.; PARKIN, S.; UNRINE, J. M.; OZA, V.; BLACKBURN, J. S.; LADIPO, F.; HEIDARY, D. K.; GLAZER, E. C. Triarylphosphine-Coordinated Bipyridyl Ru(II) Complexes Induce Mitochondrial Dysfunction. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 28, p. 10940–10954, 2023.
- (56) AROLA, A.; VILAR, R. Stabilisation of G-Quadruplex DNA by Small Molecules. **CTMC**, [s.l.], v. 8, n. 15, p. 1405–1415, 2008.
- (57) JIANG, J.; TEUNENS, T.; TISAUN, J.; DENUIT, L.; MOUCHERON, C. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes and Their Use as Probes and Photoreactive Agents for G-Quadruplexes Labelling. **Molecules**, [s.l.], v. 27, n. 5, p. 1541, 2022.
- (58) Chen, T.; Liu, Y.; Zheng, W.-J.; Liu, J.; Wong, Y.-S. Ruthenium Polypyridyl Complexes That Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 14, p. 6366–6368, 2010.
- (59) ZHOU, K.; LIU, J.; XIONG, X.; CHENG, M.; HU, X.; NARVA, S.; ZHAO, X.; WU, Y.; ZHANG, W. Design, Synthesis of 4,5-Diazafluorene Derivatives and Their Anticancer Activity via Targeting Telomeric DNA G-Quadruplex. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 178, p. 484–499, 2019.
- (60) NIELSEN, M. C.; LARSEN, A. F.; ABDIKADIR, F. H.; Ulven, T. Phenanthroline-2,9-Bistriazoles as Selective G-Quadruplex Ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 72, n. 119–126, 2014.
- (61) CRACIUN, A.-M.; ROTARU, A.; COJOCARU, C.; MANGALAGIU, I. I.; DANAC, R. New 2,9-Disubstituted-1,10-Phenanthroline Derivatives with Anticancer Activity by

- Selective Targeting of Telomeric G-Quadruplex DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 249, p. 119318, 2021.
- (62) LU, L.; WANG, W.; YANG, C.; KANG, T.-S.; LEUNG, C.-H.; MA, D.-L. Iridium(III) Complexes with 1,10-Phenanthroline-Based N⁺N Ligands as Highly Selective Luminescent G-Quadruplex Probes and Application for Switch-on Ribonuclease H Detection. **Journal of Materials Chemistry B**, [s.l.], v. 4, n. 42, p. 6791–6796, 2016.
- (63) WEI, C.-Y.; WANG, J.-H.; WEN, Y.; LIU, J.; WANG, L.-H. 4-(1H-Imidazo[4,5-f]-1,10-Phenanthrolin-2-Yl)Phenol-Based G-Quadruplex DNA Binding Agents: Telomerase Inhibition, Cytotoxicity and DNA-Binding Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 11, p. 3379–3387, 2013.
- (64) MEDEIROS-SILVA, J.; GUÉDIN, A.; SALGADO, G. F.; MERGNY, J.-L.; QUEIROZ, J. A.; CABRITA, E. J.; CRUZ, C. Phenanthroline-Bis-Oxazole Ligands for Binding and Stabilization of G-Quadruplexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1861 n. 5, p. 1281–1292, 2017.
- (65) DORIA, F.; PIROTA, V.; BISBANO, G.; OLDANI, A.; BERNARDI, E.; SERRA, M.; PAOLILLO, M. Selective Delivery of G-Quadruplex Ligand in Glioma Cell Lines: The Power of Cyclic-RGD Peptide, 2024.
- (66) NADAI, M.; DORIA, F.; FRASSON, I.; PERRONE, R.; PIROTA, V.; BERGAMASCHI, G.; FRECCERO, M.; RICHTER, S. N. Naphthalene Diimide-Tetraazacycloalkane Conjugates Are G-Quadruplex-Based HIV-1 Inhibitors with a Dual Mode of Action. **ACS Infect. Dis.**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 489–499, 2024.
- (67) AHMED, A. A.; CHEN, S.; ROMAN-ESCORZA, M.; ANGELL, R.; OXENFORD, S.; MCCONVILLE, M.; BARTON, N.; SUNOSE, M.; NEIDLE, D.; HAIDER, S.; ARSHAD, T.; NEIDLE, S. Structure–Activity Relationships for the G-Quadruplex-Targeting Experimental Drug QN-302 and Two Analogues Probed with Comparative Transcriptome Profiling and Molecular Modeling. **Science Reports**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 3447, 2024.
- (68) AHMED, A. A.; ANGELL, R.; OXENFORD, S.; WORTHINGTON, J.; WILLIAMS, N.; BARTON, N.; FOWLER, T. G.; O'FLYNN, D. E.; SUNOSE, M.; MCCONVILLE, M.; VO, T.; WILSON, W. D.; KARIM, S. A.; MORTON, J. P.; NEIDLE, S. Asymmetrically Substituted Quadruplex-Binding Naphthalene Diimide Showing Potent Activity in Pancreatic Cancer Models. **ACS Medicinal Chemistry Letters Journal**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. 1634–1644, 2020.
- (69) KOH, G. C. C.; BOUSHAKI, S.; ZHAO, S. J.; PREGNALL, A. M.; SADIYAH, F.; BADJA, C.; MEMARI, Y.; GEORGAKOPOULOS-SOARES, I.; NIK-ZAINAL, S. The Chemotherapeutic Drug CX-5461 Is a Potent Mutagen in Cultured Human Cells. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 23–26, 2024.
- (70) HILTON, J.; GELMON, K.; BEDARD, P. L.; TU, D.; XU, H.; TINKER, A. V.; GOODWIN, R.; LAURIE, S. A.; JONKER, D.; HANSEN, A. R.; VEITCH, Z. W.;

- RENOUF, D. J.; HAGERMAN, L.; LUI, H.; CHEN, B.; KELLAR, D.; LI, I.; LEE, S.-E.; KONO, T.; CHENG, B. Y. C.; YAP, D.; LAI, D.; BEATTY, S.; SOONG, J.; PRITCHARD, K. I.; SORIA-BRETONES, I.; CHEN, E.; FEILOTTER, H.; RUSHTON, M.; SEYMOUR, L.; APARICIO, S.; CESCON, D. W. Results of the Phase I CCTG IND.231 Trial of CX-5461 in Patients with Advanced Solid Tumors Enriched for DNA-Repair Deficiencies. **Nature Communications**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 3607, 2022.
- (71) VILAR, R. Interaction of Metal Complexes with G-Quadruplex DNA. In Advances in Inorganic Chemistry. **Elsevier**, [s.l.], v. 75, p. 425–445, 2020.
- (72) ANGERANI, S.; WINSSINGER, N. Visible Light Photoredox Catalysis Using Ruthenium Complexes in Chemical Biology. **Chemistry A European Journal**, [s.l.], v. 25, n. 27, p. 6661–6672, 2019.
- (73) LI, G.; SUN, L.; JI, L.; CHAO, H. Ruthenium(II) Complexes with Dppz: From Molecular Photoswitch to Biological Applications. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 45, n. 34, p. 13261–13276, 2016.
- (74) HOLDEN, L.; GKIKA, K. S.; BURKE, C. S.; LONG, C.; KEYES, T. E. Selective, Disruptive Luminescent Ru(II) Polypyridyl Probes of G-Quadruplex. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 62, n.5, p. 2213–2227, 2023.
- (75) SHI, S.; GENG, X.; ZHAO, J.; YAO, T.; WANG, C.; YANG, D.; ZHENG, L.; JI, L. Interaction of [Ru(Bpy)2(Dppz)]2+ with Human Telomeric DNA: Preferential Binding to G-Quadruplexes over i-Motif. **Biochimie**, [s.l.], v. 92, n. 4, p. 370–377, 2010.
- (76) SHI, S.; ZHAO, J.; GENG, X.; YAO, T.; HUANG, H.; LIU, T.; ZHENG, L.; LI, Z.; YANG, D.; JI, L. Molecular “Light Switch” for G-Quadruplexes and i-Motif of Human Telomeric DNA: [Ru(Phen)2(Dppz)]2+. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 39, n.10, p. 2490, 2010.
- (77) MONRO, S.; COLÓN, K. L.; YIN, H.; ROQUE, J.; KONDA, P.; GUJAR, S.; THUMMEL, R. P.; LILGE, L.; CAMERON, C. G.; MCFARLAND, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 119, n.2, p. 797–828, 2019.
- (78) KARGES, J. Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 61, n. 5, p. e202112236, 2022.
- (79) BLAZEVIC, A.; HUMMER, A. A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; FILIPITS, M.; CIBIN, G.; KEPPLER, B. K.; ROMPEL, A. Electronic State of Sodium Trans-[Tetrachloridobis(1H-Indazole)Ruthenate(III)] (NKP-1339) in Tumor, Liver and

- Kidney Tissue of a SW480-Bearing Mouse. **Science Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 40966, 2017.
- (80) 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 Inorganic Chemistry**, 2017.
- (81) CHAKRABORTTY, S.; AGRAWALLA, B. K.; STUMPER, A.; VEGI, N. M.; FISCHER, S.; REICHARDT, C.; KÖGLER, M.; DIETZEK, B.; FEURING-BUSKE, M.; BUSKE, C.; RAU, S.; WEIL, T. Mitochondria Targeted Protein-Ruthenium Photosensitizer for Efficient Photodynamic Applications. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 139, n. 6, p. 2512–2519, 2017.
- (82) DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G. E.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 119, n. 3, p. 2043–2086, 2019.
- (83) ANKATHATTI MUNEGOWDA, M.; MANALAC, A.; WEERSINK, M.; MCFARLAND, S. A.; LILGE, L. Ru(II) Containing Photosensitizers for Photodynamic Therapy: A Critique on Reporting and an Attempt to Compare Efficacy. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 470, p. 214712, 2022.
- (84) GORINI, F.; SCALA, G.; COOKE, M. S.; MAJELLO, B.; AMENTE, S. Towards a Comprehensive View of 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine: Highlighting the Intertwined Roles of DNA Damage and Epigenetics in Genomic Instability. **DNA Repair**, [s.l.], v. 97, p. 103027, 2021.
- (85) WU, S.; JIANG, L.; LEI, L.; FU, C.; HUANG, J.; HU, Y.; DONG, Y.; CHEN, J.; ZENG, Q. Crosstalk between G-Quadruplex and ROS. **Cell Death & Disease**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 37, 2023.
- (86) JURIS, A.; BALZANI, V.; BARIGELLETTI, F.; CAMPAGNA, S.; BELSER, P.; ZELEWSKY, A. V. Ru II polypiridine complexes: photophysics, electrochemistry, chemiluminescence. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 84, p. 85–277, 1988.
- (87) DEROSA, M. Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 233–234, p. 351–371, 2002.
- (88) ABREU, F. D.; PAULO, T. D. F.; GEHLEN, M. H.; ANDO, R. A.; LOPES, L. G. F.; GONDIM, A. C. S.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; SOUSA, E. H. S.; DE CARVALHO, I. M. M. Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 15, p. 9084–9096, 2017.

- (89) OLIVEIRA, G. D. F. S.; GOUVEIA, F. S.; PINHEIRO, A. D. A.; DO NASCIMENTO NETO, L. G.; DE VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; GONDIM, A. C. S.; LOPES, L. G. D. F.; DE CARVALHO, I. M. M.; SOUSA, E. H. S. An Anthracene-Pendant Ruthenium(II) Complex Conjugated to a Biotin Anchor, an Essential Handle for Photo-Induced Anti-Cancer Activity. **New Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 16, p. 6610–6622, 2020.
- (90) BOYNTON, A. N.; MARCÉLIS, L.; BARTON, J. K. $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{Phen})_2\text{Dppz}]^{2+}$, a Light Switch for DNA Mismatches. **Journal American Chemical Society**, [s.l.], v. 138, n. 15, p. 5020–5023, 2016.
- (91) ALEXANDER, C.; NITHYAKUMAR, A.; PAUL, M. W. B.; AROCKIA SAMY, N. Platinum(II) Complexes of Imidazophenanthroline-Based Polypyridine Ligands as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Characterization, in Vitro Cytotoxicity Studies and a Comparative Ab Initio, and DFT Studies with Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. **Journal Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 833–848, 2018.
- (92) REICHARDT, C.; SCHNEIDER, K. R. A.; SAINUDDIN, T.; WÄCHTLER, M.; MCFARLAND, S. A.; DIETZEK, B. Excited State Dynamics of a Photobiologically Active Ru(II) Dyad Are Altered in Biologically Relevant Environments. **The Journal Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 121, n. 30, p. 5635–5644, 2017.
- (93) KALININA, S.; BREYMAIER, J.; REEß, K.; LILGE, L.; MANDEL, A.; RÜCK, A. Correlation of Intracellular Oxygen and Cell Metabolism by Simultaneous PLIM of Phosphorescent TLD1433 and FLIM of NAD(P)H. **Journal of Biophotonics**, [s.l.], v. 11, n. 10, p. e201800085, 2018.
- (94) DEVI, C. S.; SATYANARAYANA, S. Review: Synthesis, Characterization, and DNA-Binding Properties of Ru(II) Molecular “Light Switch” Complexes. **Journal of Coordination Chemistry**, [s.l.], v. 65, n. 3, p. 474–486, 2012.
- (95) ABREU, F. D.; DIÓGENES, I. C. N.; LOPES, L. G. D. F.; SOUSA, E. H. S.; DE CARVALHO, I. M. M. Ruthenium(II) Bipyridine Complexes with Pendant Anthracenyl and Naphthyl Moieties: A Strategy for a ROS Generator with DNA Binding Selectivity. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 439, p. 92–99, 2016.
- (96) OLIVEIRA, G. D. F. S.; GOUVEIA, F. S.; ANDRADE, A. L.; DE VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; PALMEIRA-MELLO, M. V.; BATISTA, A. A.; LOPES, L. G. D. F.; DE CARVALHO, I. M. M.; SOUSA, E. H. S. Minimal Functionalization of Ruthenium Compounds with Enhanced Photoreactivity against Hard-to-Treat Cancer Cells and Resistant Bacteria. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 31, p. 14673–14690, 2024.
- (97) MCCAFFERTY, D. G.; BISHOP, B. M.; WALL, C. G.; HUGHES, S. G.; MECKLENBERG, S. L.; MEYER, T. J.; ERICKSON, B. W. Synthesis of Redox

- Derivatives of Lysine and Their Use in Solid-Phase Synthesis of a Light-Harvesting Peptide. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 51, n. 4, p. 1093–1106, 1995.
- (98) DICKESON, J. E.; SUMMERS, L. A. Derivatives of 1,10-Phenanthroline-5,6-Quinone. **Australian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 1023–1027, 1970.
- (99) LISKA, P.; VLACHOPOULOS, N.; COMTE, P.; GRATZEL, M. Cis-Diaquabis(2,2'-bipyridyl4,4'-Dicarboxylate)- Ruthenium(I1) Sensitizes Wide Band Gap Oxide Semiconductors Very Efficiently over a Broad Spectral Range in the Visible. **Journal American Chemical Society**, [s.l.], v. 110, p. 3686-3687, 1988.
- (100) DE CARVALHO, I. M. M.; DE SOUSA MOREIRA, I.; GEHLEN, M. H. Synthesis, Characterization, and Photophysical Studies of New Bichromophoric Ruthenium(II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 42, n. 5, p. 1525–1531, 2003.
- (101) DENNINGTON, R.; KEITH, T. E.; MILLAM, J. **GaussView**, Version 5. Semichem Inc Shawnee Mission KS. 2009.
- (102) FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOXLOWSKII, J. E.; FOX, D. **Gaussian 09**. Gaussian, Inc Wallingford, CT, USA, 2009.
- (103) LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. **Physical Review**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 785–789, 1988.
- (104) BECKE, A. D. Density-functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 98, n. 7, p.5648–5652, 1993.
- (105) STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C. F.; FRISCH, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **The Jounal of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 98, n. 45, p. 11623–11627, 1994.
- (106) 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.], v. 82, n. 1, p. 299–310, 1985.
- (107) FRENKING, G.; KOCH, W. A Mo/Ller-Plesset Study of the Electron Affinities of the Diatomic Hydrides XH (X=Li, B, Be, C, N, O). **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 84, n. 6, p. 3224–3229, 1986.

- (108) MENNUCCI, B.; CANCÈS, E.; TOMASI, J. Evaluation of Solvent Effects in Isotropic and Anisotropic Dielectrics and in Ionic Solutions with a Unified Integral Equation Method: Theoretical Bases, Computational Implementation, and Numerical Applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 101, n. 49, p. 10506–10517, 1997.
- (109) MARQUES, M. A. L.; MAITRA, N. T.; NOGUEIRA, F. M. S.; GROSS, E. K. U.; RUBIO, A. **Fundamentals of Time-Dependent Density Functional Theory**. Cambridge: Lect Notes Physics, Springer Verlag, 2012.
- (110) PAVLISHCHUK, V. V.; ADDISON, A. W. Conversion Constants for Redox Potentials Measured versus Different Reference Electrodes in Acetonitrile Solutions at 25°C. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 298, n. 1, p. 97–102, 2000.
- (111) DING, H.-Y.; WANG, X.-S.; SONG, L.-Q.; CHEN, J.-R.; YU, J.-H.; CHAO-LI; ZHANG, B.-W. Aryl-Modified Ruthenium Bis(Terpyridine) Complexes: Quantum Yield of O_2 Generation and Photocleavage on DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s.l.], v. 177, n. 2–3, p. 286–294, 2006.
- (112) TANIELIAN, C.; WOLFF, C.; ESCH, M. Singlet Oxygen Production in Water: Aggregation and Charge-Transfer Effects. **The Journal of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 100, n. 16, p. 6555–6560, 1996.
- (113) NITROBLUE, O. F.; CUPREIN, B. Y. Volume 6 1, Number 2 FEBS LETTERS January 1976. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 209–212, 1976.
- (114) PYLE, A. M.; REHMANN, J. P.; MESHOYRER, R.; KUMAR, C. V.; TURRO, N. J.; BARTON, J. K. Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium(11): Factors Governing Binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 111, n. 8, p. 3051–3058, 1989.
- (115) SOUSA, E. H. S.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M.-A. Oxygen Blocks the Reaction of the FixL–FixJ Complex with ATP but Does Not Influence Binding of FixJ or ATP to FixL. **Biochemistry**, [s.l.], v. 44, n. 46, p. 15359–15365, 2005.
- (116) STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.
- (117) VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; DE ALENCAR, D. B.; SAKER-SAMPAIO, S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; DOS SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; CAVADA, B. S.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M. O.; TEIXEIRA, E. H. Antibacterial and Antioxidant Activities of Derriobtusone A Isolated

- from *Lonchocarpus Obtusus*. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2014, p. 1–9, 2014.
- (118) PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN JR. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução Da 4a Edição Norte-Americana. São Paulo: Learning Cengage, 2010.
- (119) SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed.. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.
- (120) PEEK, B. M.; ROSS, G. T.; EDWARDS, S. W.; MEYER, G. J.; MEYER, T. J.; ERICKSON, B. W. Synthesis of Redox Derivatives of Lysine and Related Peptides Containing Phenothiazine or Tris(2,2'-Bipyridine)Ruthenium(II). **International Journal of Peptide and Protein Research**, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 114–123, 2009.
- (121) TROIAN-GAUTIER, L.; MOUCHERON, C. RutheniumII Complexes Bearing Fused Polycyclic Ligands: From Fundamental Aspects to Potential Applications. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 5028–5087, 2014.
- (122) ATKINS, P. W.; SHRIVER, D. F. **Química Inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- (123) TAGHIZADEH SHOOL, M.; AMIRI RUDBARI, H.; CUEVAS-VICARIO, J. V.; RODRÍGUEZ-RUBIO, A.; STAGNO, C.; IRACI, N.; EFFERTH, T.; OMER, E. A.; SCHIRMEISTER, T.; BLACQUE, O.; MOINI, N.; SHEIBANI, E.; MICALE, N. Investigating the Cytotoxicity of Ru(II) Polypyridyl Complexes by Changing the Electronic Structure of Salicylaldehyde Ligands. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 1083–1101, 2024.
- (124) FRANCO, L. R.; TOLEDO, K. C. F.; MATIAS, T. A.; ARAUJO, C. M.; ARAKI, K.; COUTINHO, K. Theoretical Investigation of Solvent and Oxidation/Deprotonation Effects on the Electronic Structure of a Mononuclear Ru-Aqua-Polypyridine Complex in Aqueous Solution. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 25, n. 36, p. 24475–24494, 2023.
- (125) CAMPAGNA, S.; PUNTORIERO, F.; NASTASI, F.; BERGAMINI, G.; BALZANI, V. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium. In *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I*; Balzani, V., Campagna, S., Eds.; **Topics in Current Chemistry**, Berlin, v. 280, p. 117–214, 2007.
- (126) YANG, X.-J.; JANIAK, C.; HEINZE, J.; DREPPER, F.; MAYER, P.; PIOTROWSKI, H.; KLÜFERS, P. Heteroleptic 5,5'-Disubstituted-2,2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium(II): Spectral, Electrochemical, and Structural Investigations. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 318, n.1–2, p. 103–116, 2001.

- (127) O'NEILL, L.; PERDISATT, L.; O'CONNOR, C. Structure-Property Relationships for a Series of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Elucidated through Raman Spectroscopy. **Journal of Spectroscopy**, [s.l.], v. 2018, p. 1–11, 2018.
- (128) SLIM, M.; SLEIMAN, H. F. Ruthenium(II)–Phenanthroline–Biotin Complexes: Synthesis and Luminescence Enhancement upon Binding to Avidin. **Bioconjugate Chemistry**, [s.l.], v. 155, p. 949–953, 2004.
- (129) REICHARDT, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 94, n. 8, p. 2319–2358, 1994.
- (130) PADILLA, R.; MAZA, W. A.; DOMINIJANNI, A. J.; WINKEL, B. S. J.; MORRIS, A. J.; BREWER, K. J. Pushing the Limits of Structurally-Diverse Light-Harvesting Ru(II) Metal-Organic Chromophores for Photodynamic Therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s.l.], v. 322–323, p. 67–75, 2016.
- (131) ZIGLER, D. F.; ELVINGTON, M. C.; HEINECKE, J.; BREWER, K. J. Luminescently Tagged 2,2'-Bipyridine Complex of Fe^{II}: Synthesis and Photophysical Studies of 4-[N-(2-Anthryl)Carbamoyl]-4'-Methyl-2,2'-Bipyridine. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 17, p. 6565–6567, 2006.
- (132) DE CARVALHO, I. M. M.; MOREIRA, I. D. S.; GEHLEN, M. H. The Amide Bridge Photocleavage in Ruthenium Bichromophoric Complex. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 358, n. 7, p. 2255–2261, 2005.
- (133) SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.; SNYDER, S. **Química Orgânica**. 13. ed. Rio de Janeiro: LTC Graham, 2024.
- (134) JIANG, X.; ZHU, N.; ZHAO, D.; MA, Y. New Cyclometalated Transition-Metal Based Photosensitizers for Singlet Oxygen Generation and Photodynamic Therapy. **Science China Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 40–52, 2016.
- (135) WANG, X.; DEL GUERZO, A.; SCHMEHL, R. H. Photophysical Behavior of Transition Metal Complexes Having Interacting Ligand Localized and Metal-to-Ligand Charge Transfer States. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 55–77, 2004.
- (136) SCIUTO, E. L.; SANTANGELO, M. F.; VILLAGGIO, G.; SINATRA, F.; BONGIORNO, C.; NICOTRA, G.; LIBERTINO, S. Photo-Physical Characterization of Fluorophore Ru(Bpy)₃ 2+ for Optical Biosensing Applications. **Sensing and Bio-Sensing Research**, [s.l.], v. 6, p. 67–71, 2015.
- (137) WANG, C.-L.; DU, J.; YANG, H.; ZHAN, S.-Z. A Water Soluble Cobalt(II) Complex with 1,10-Phenanthroline, a Catalyst for Visible-Light-Driven Reduction of CO₂ to CO with High Selectivity. **Catalysis Letters**, [s.l.], v. 152, n. 7, p. 1961–1968, 2022.

- (138) ENTRADAS, T.; WALDRON, S.; VOLK, M. The Detection Sensitivity of Commonly Used Singlet Oxygen Probes in Aqueous Environments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 204, p. 111787, 2020.
- (139) OHYASHIKI, T.; NUNOMURA, M.; KATOH, T. Detection of Superoxide Anion Radical in Phospholipid Liposomal Membrane by Fluorescence Quenching Method Using 1,3-Diphenylisobenzofuran. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1421, p. 131-139, 1999.
- (140) ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2j-7j-dichlorofluorescin to the fluorescent dye 2j-7j-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 27, n. 7-8, p. 873-881, 1999.
- (141) MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- (142) WARDMAN, P. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 1637-1755, 1989.
- (143) POPOVICH, K.; TOMANOVÁ, K.; ČUBA, V.; PROCHÁZKOVÁ, L.; PELIKÁNOVÁ, I. T.; JAKUBEC, I.; MIHÓKOVÁ, E.; NIKL, M. LuAG:Pr³⁺-Porphyrin Based Nanohybrid System for Singlet Oxygen Production: Toward the next Generation of PDTX Drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 179, p. 149-155, 2018.
- (144) MAHADEVAN, S. Spectroscopic and Voltammetric Studies of Copper(II) Complexes of Bis(Pyrid-2-Yl)-Di/Trithia Ligands Bound to Calf Thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 254, p. 291-302, 1997.
- (145) LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; JI, L. DNA-Binding and Cleavage Studies of Macroyclic Copper(II) Complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 91, n. 1, p. 269-276, 2002.
- (146) 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.], v. 95, n. 2-3, p. 177-193, 2003.
- (147) SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 124, n. 1-19, 2013.

- (148) AMBROISE, A.; MAIYA, B. G. Ruthenium(II) Complexes of 6,7-Dicyanodipyridoquinoxaline: Synthesis, Luminescence Studies, and DNA Interaction. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 39, n. 19, p. 4264–4272, 2000.
- (149) COURY, J. E.; ANDERSON, J. R.; MCFAIL-ISOM, L.; WILLIAMS, L. D.; BOTTOMLEY, L. A. Scanning Force Microscopy of Small Ligand–Nucleic Acid Complexes: Tris(o -Phenanthroline)Ruthenium(II) as a Test for a New Assay. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 119, n. 16, p. 3792–3796, 1997.
- (150) MIHAILOVIC, A.; VLADESCU, I.; MCCUALEY, M.; LY, E.; WILLIAMS, M. C.; SPAIN, E. M.; NUÑEZ, M. E. Exploring the Interaction of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes with DNA Using Single-Molecule Techniques. **Langmuir**, [s.l.], v. 22, n. 10, p. 4699–4709, 2006.
- (151) JI, L.-N.; ZOU, X.-H.; LIU, J.-G. Shape- and Enantioselective Interaction of Ru(II)/Co(III) Polypyridyl Complexes with DNA. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 216–217, p. 513–536, 2001.
- (152) BURYA, S. J.; LUTTERMAN, D. A.; TURRO, C. Absence of Quenching by $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ Is Not Proof of DNA Intercalation. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 1848, 2011.
- (153) 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.], v. 103, n. 10, p. 1395–1404, 2009.
- (154) FOX, K. R. **Drug-DNA Interaction Protocols**. 2. ed. New York: Humana Press: Springer Protocols, Methods in Molecular Biology, 2010.
- (155) 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. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 8, p. 3282–3290, 2011.
- (156) TUITE, E.; SEHLSTEDT, U.; HAGMAR, P.; NORDEN, B.; TAKAHASHI, M. Effects of Minor and Major Groove-Binding Drugs and Intercalators on the DNA Association of Minor Groove-Binding Proteins RecA and Deoxyribonuclease I Detected by Flow Linear Dichroism. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 243, n. 1–2, p. 482–492, 1997.
- (157) METZLER-NOLTE, N.; SCHATZSCHNEIDER, U. **Bioinorganic Chemistry: A Practical Course**. 1. ed. Berlin: Co.W de GG, 2009.

- (158) COLASSON, B.; CREDI, A.; RAGAZZON, G. Light-Driven Molecular Machines Based on Ruthenium(II) Polypyridine Complexes: Strategies and Recent Advances. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 325, p. 125–134, 2016.
- (159) MARI, C.; PIERROZ, V.; FERRARI, S.; GASSER, G. Combination of Ru(II) Complexes and Light: New Frontiers in Cancer Therapy. **Chemical Science**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 2660–2686, 2015.
- (160) NAVARRO, M. Synthesis, Characterization, DNA Binding Study and Biological Activity against Leishmania Mexicana of [Cu(Dppz)2]BF4. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 97, n. 4, p. 364–369, 2003.
- (161) PLSIKOVA, J.; JANOVEC, L.; KOVAL, J.; UNGVARSKY, J.; MIKES, J.; JENDZELOVSKY, R.; FEDOROCKO, P.; IMRICH, J.; KRISTIAN, P.; KASPARKOVA, J.; BRABEC, V.; KOZURKOVA, M. 3,6-Bis(3-Alkylguanidino)Acridines as DNA-Intercalating Antitumor Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 57, p. 283–295, 2012.
- (162) KYPR, J.; KEJNOVSKA, I.; RENCIUK, D.; VORLICKOVA, M. Circular Dichroism and Conformational Polymorphism of DNA. **Nucleic Acids Research**, 2009, [s.l.], v. 37, n. 6, p. 1713–1725, 2009.
- (163) SHAHABADI, N.; MOGHADAM, N. H. Determining the Mode of Interaction of Calf Thymus DNA with the Drug Sumatriptan Using Voltammetric and Spectroscopic Techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 99, p. 18–22, 2012.
- (164) PALMEIRA-MELLO, M. V.; CABALLERO, A. B.; LOPEZ-ESPINAR, A.; GUEDES, G. P.; CAUBET, A.; DE SOUZA, A. M. T.; LANZMASTER, M.; GAMEZ, P. DNA-Interacting Properties of Two Analogous Square-Planar Cis-Chlorido Complexes: Copper versus Palladium. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 6, p. 727–740, 2021.
- (165) CRAIG, J. S.; MELIDIS, L.; WILLIAMS, H. D.; DETTMER, S. J.; HEIDECKER, A. A.; ALTMANN, P. J.; GUAN, S.; CAMPBELL, C.; BROWNING, D. F.; SIGEL, R. K. O.; JOHANNSEN, S.; EGAN, R. T.; AIKMAN, B.; CASINI, A.; PÖTHIG, A.; HANNON, M. J. Organometallic Pillarplexes That Bind DNA 4-Way Holliday Junctions and Forks. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 145, n. 25, p. 13570–13580, 2023.
- (166) WRIGHT, E. P.; HUPPERT, J. L.; WALLER, Z. A. E. Identification of Multiple Genomic DNA Sequences Which Form I-Motif Structures at Neutral pH. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 45, n. 6, p. 2951–2959, 2017.

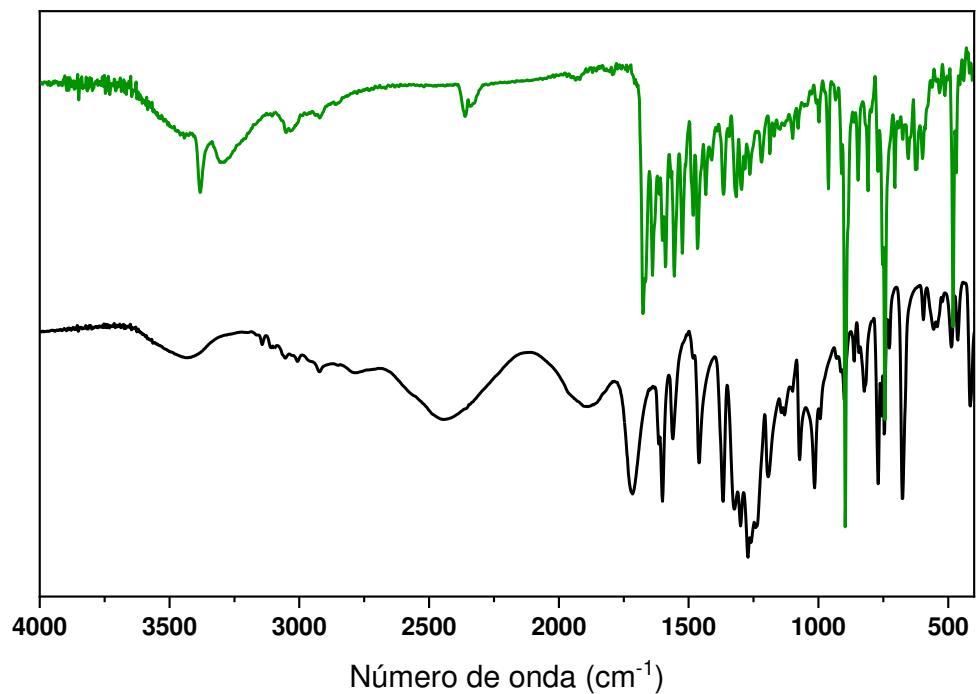
- (167) RAJENDRAN, A.; NAKANO, S.; SUGIMOTO, N. Molecular Crowding of the Cosolutes Induces an Intramolecular I-Motif Structure of Triplet Repeat DNA Oligomers at Neutral pH. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 46, n. 8, p. 1299, 2010.
- (168) ABOU ASSI, H.; GARAVÍS, M.; GONZÁLEZ, C.; DAMHA, M. J. I-Motif DNA: Structural Features and Significance to Cell Biology. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 46, n. 16, p. 8038–8056, 2018.
- (169) TAO, S.; RUN, Y.; MONCHAUD, D.; ZHANG, W. I-Motif DNA: Identification, Formation, and Cellular Functions. **Trends in Genetics**, [s.l.], v. 40, n.10, p. 853–867, 2024.
- (170) PAGES, B. J.; GURUNG, S. P.; MCQUAID, K.; HALL, J. P.; CARDIN, C. J.; BRAZIER, J. A. Stabilization of Long-Looped i-Motif DNA by Polypyridyl Ruthenium Complexes. **Frontiers in Chemical**, [s.l.], v. 7, p. 744, 2019.
- (171) SPENCE, P.; FIELDEN, J.; WALLER, ZOË. A. E. Beyond Solvent Exclusion: I-Motif Detecting Capability and an Alternative DNA Light-Switching Mechanism in a Ruthenium(II) Polypyridyl Complex. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 142, n.32, p. 13856–13866, 2020.
- (172) WU, Y.; ZAN, L.-P.; WANG, X.-D.; LU, Y.-J.; OU, T.-M.; LIN, J.; HUANG, Z.-S.; GU, L.-Q. Stabilization of VEGF G-Quadruplex and Inhibition of Angiogenesis by Quindoline Derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1840, n. 9, p.2970–2977, 2014.
- (173) ZHONG, L.-T.; YUAN, J.-M.; FU, W.-L.; ZHANG, Z.-L.; LI, X.; OU, T.-M.; TAN, J.-H.; HUANG, Z.-S.; CHEN, S.-B. Identification of Sanguinarine as C-MYC Transcription Inhibitor through Enhancing the G-Quadruplex-NM23-H2 Interactions. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 153, p. 107842, 2024.
- (174) MAZZINI, S.; GARGALLO, R.; MUSSO, L.; DE SANTIS, F.; AVIÑÓ, A.; SCAGLIONI, L.; ERITJA, R.; DI NICOLA, M.; ZUNINO, F.; AMATULLI, A.; DALLAVALLE, S. Stabilization of C-KIT G-Quadruplex DNA Structures by the RNA Polymerase I Inhibitors BMH-21 and BA-41. **IJMS**, [s.l.], v. 20, n. 19, p. 4927, 2019.
- (175) RICCARDI, C.; NAPOLITANO, E.; PLATELLA, C.; MUSUMECI, D.; MONTESARCHIO, D. G-Quadruplex-Based Aptamers Targeting Human Thrombin: Discovery, Chemical Modifications and Antithrombotic Effects. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 217, p. 107649, 2021.
- (176) LU, K.; WANG, H.-C.; TU, Y.-C.; LOU, P.-J.; CHANG, T.-C.; LIN, J.-J. EGFR Suppression Contributes to Growth Inhibitory Activity of G-Quadruplex Ligands in Non-Small Cell Lung Cancers. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 216, p. 115788, 2023.

- (177) LAVRADO, J.; BRITO, H.; BORRALHO, P. M.; OHNMACHT, S. A.; KIM, N.-S.; LEITÃO, C.; PISCO, S.; GUNARATNAM, M.; RODRIGUES, C. M. P.; MOREIRA, R.; NEIDLE, S.; PAULO, A. KRAS Oncogene Repression in Colon Cancer Cell Lines by G-Quadruplex Binding Indolo[3,2-c]Quinolines. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 9696, 2015.
- (178) DEY, A.; ANAND, K.; SINGH, A.; PRASAD, R.; BARTHWAL, R. Binding-Induced Thermal Stabilization of mosR and ndhA G-Quadruplex Comprising Genes by Emodin Leads to Downregulation and Growth Inhibition in Mtb: Potential as Anti-Tuberculosis Drug. **Results in Chemistry**, [s.l.], v. 6, p. 101114, 2023.
- (179) DEY, A.; ANAND, K.; SINGH, A.; PRASAD, R.; BARTHWAL, R. MOSR and NDHA Genes Comprising G-Quadruplex as Promising Therapeutic Targets against Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Recognition by Mitoxantrone Suppresses Replication and Gene Regulation. **Genes**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 978, 2023.
- (180) BELMONTE-RECHE, E.; MORALES, J. C. G4-iM Grinder: When Size and Frequency Matter. G-Quadruplex, i-Motif and Higher Order Structure Search and Analysis Tool. **NAR Genomics and Bioinformatics**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. lqz005, 2020.
- (181) WIERSTRA, I.; ALVES, J. The C-myc Promoter: Still MysterY and Challenge. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, [s.l.], v. 99, p. 113–333, 2008.
- (182) ESAIN-GARCIA, I.; KIRCHNER, A.; MELIDIS, L.; TAVARES, R. D. C. A.; DHIR, S.; SIMEONE, A.; YU, Z.; MADDEN, S. K.; HERMANN, R.; TANNAHILL, D.; BALASUBRAMANIAN, S. G-Quadruplex DNA Structure Is a Positive Regulator of MYC Transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, [s.l.], v. 121, n. 7, p. e2320240121, 2024.
- (183) FU, B.; ZHANG, D.; WENG, X.; ZHANG, M.; MA, H.; MA, Y.; ZHOU, X. Cationic Metal–Corrole Complexes: Design, Synthesis, and Properties of Guanine-Quadruplex Stabilizers. **Chemistry A European Journal**, [s.l.], v. 14, n. 30, p. 9431–9441, 2008.
- (184) ROY, S.; COLOMBO, E.; VINCK, R.; MARI, C.; RUBBIANI, R.; PATRA, M.; GASSER, G. Increased Lipophilicity of Halogenated Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Leads to Decreased Phototoxicity in Vitro When Used as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **ChemBioChem**, [s.l.], v. 21, n. 20, p. 2966–2973, 2020.
- (185) GILL, M. R.; THOMAS, J. A. Ruthenium(Ii) Polypyridyl Complexes and DNA—from Structural Probes to Cellular Imaging and Therapeutics. **Chemical Society Reviews Journal**, [s.l.], v. 41, n. 8, p. 3179, 2012.
- (186) LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The Influence of Drug-like Concepts on Decision-Making in Medicinal Chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 6, n. 11, p. 881–890, 2007.

- (187) SVENSSON, F. R.; MATSON, M.; LI, M.; LINCOLN, P. Lipophilic Ruthenium Complexes with Tuned Cell Membrane Affinity and Photoactivated Uptake. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 149, n. 3, p. 102–106, 2010.
- (188) 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. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, [s.l.], v. 42, n. 1, 2006.
- (189) POYNTON, F. E.; BRIGHT, S. A.; BLASCO, S.; WILLIAMS, D. C.; KELLY, J. M.; GUNNL AUGSSON, T. The Development of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes and Conjugates for in Vitro Cellular and in Vivo Applications. **Chemical Society Reviews Journal**, [s.l.], v. 46, n. 24, p. 7706–7756, 2017.
- (190) ZHANG, P.; SADLER, P. J. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. **Eur J Inorg Chem**, [s.l.], v. 2017, n. 12, p. 1541–1548, 2017.
- (191) BUTLER, J. S.; SADLER, P. J. Targeted Delivery of Platinum-Based Anticancer Complexes. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 175–188, 2013.
- (192) EUCAST. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Broth Dilution. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. ix–xv, 2011.
- (193) SMITH, N. A.; ZHANG, P.; GREENOUGH, S. E.; HORBURY, M. D.; CLARKSON, G. J.; MCFEELY, D.; Habtemariam, A.; Salassa, L.; Stavros, V. G.; Dowson, C. G.; Sadler, P. J. Combatting AMR: Photoactivatable Ruthenium(II)-Isoniazid Complex Exhibits Rapid Selective Antimycobacterial Activity. **Chemical Science**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 395–404, 2017.
- (194) KARAOUN, N.; RENFREW, A. K. A Luminescent Ruthenium(II) Complex for Light-Triggered Drug Release and Live Cell Imaging. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 51, n. 74, p. 14038–14041, 2015.
- (195) FAYAD, C.; AUDI, H.; KHNAZER, R. S.; DAHER, C. F. The Anti-Cancer Effect of Series of Strained Photoactivatable Ru(II) Polypyridyl Complexes on Non-Small-Cell Lung Cancer and Triple Negative Breast Cancer Cells. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 43–55, 2021.
- (196) NAVES, M. A.; GRAMINHA, A. E.; VEGAS, L. C.; LUNA-DULCEY, L.; HONORATO, J.; MENEZES, A. C. S.; BATISTA, A. A.; COMINETTI, M. R. Transport of the Ruthenium Complex $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{Dppe})_2]\text{PF}_6$ into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors. **Molecular Pharmaceutics Journal**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 1167–1183, 2019.

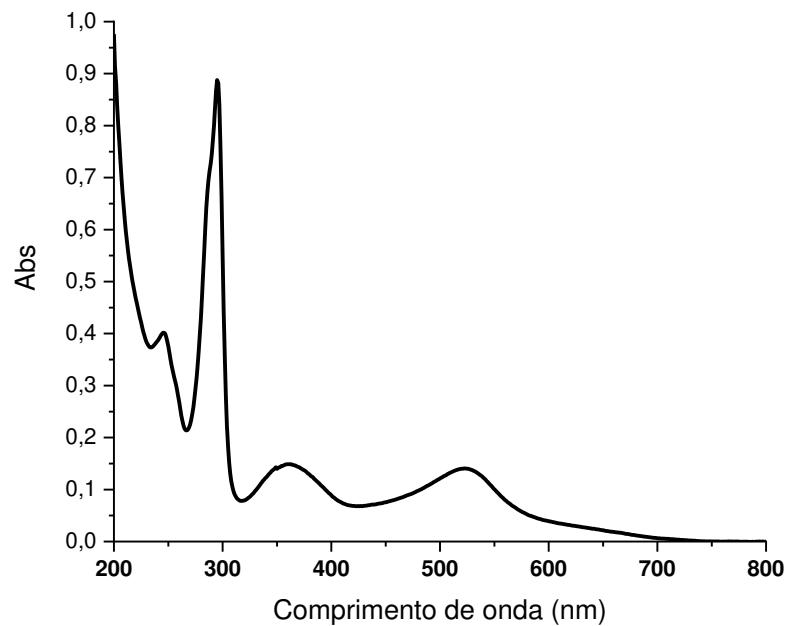
- (197) LIANG, Y.; HUANG, W.; WANG, S.; SU, W.; SITU, Q.; HE, L. Synthesis of a Novel Nitrogen Mustard-Conjugated Bis-Terpyridine Ruthenium(II) Complex as a Potent Anticancer Agent That Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis. **Journal of Chemical Research**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 1747519 - 8221085, 2022.
- (198) LIN, K.; RONG, Y.; CHEN, D.; ZHAO, Z.; BO, H.; QIAO, A.; HAO, X.; WANG, J. Combination of Ruthenium Complex and Doxorubicin Synergistically Inhibits Cancer Cell Growth by Down-Regulating PI3K/AKT Signaling Pathway. **Frontiers in Oncology**, [s.l.], v. 10, n. 141, 2020.
- (199) BAROLLI, J.; CORRÊA, R.; MIRANDA, F.; RIBEIRO, J.; BLOCH JR., C.; ELLENA, J.; MORENO, V.; COMINETTI, M.; BATISTA, A. Polypyridyl Ruthenium Complexes: Novel DNA-Intercalating Agents against Human Breast Tumor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], 2017.

**APÊNDICE A – ESPECTRO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO
DOS COMPOSTOS: BPY-ANTH (—) E BPY-COOH (—).**



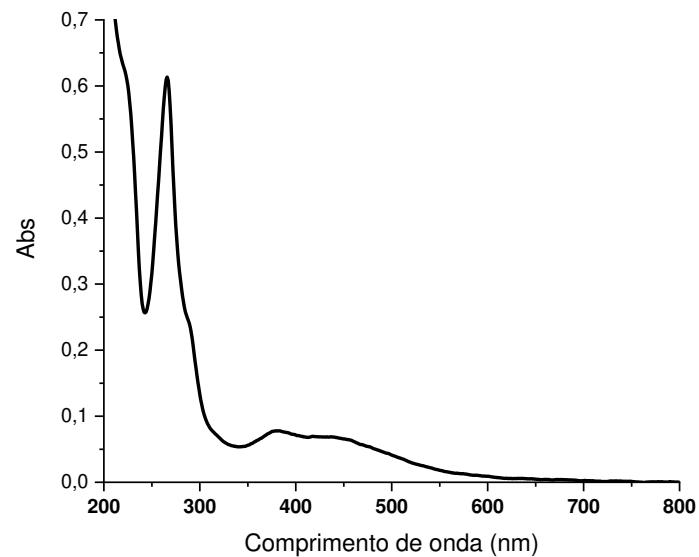
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE B – ESPECTRO ELETRÔNICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL DO COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO DE 2×10^{-5} mol L⁻¹.



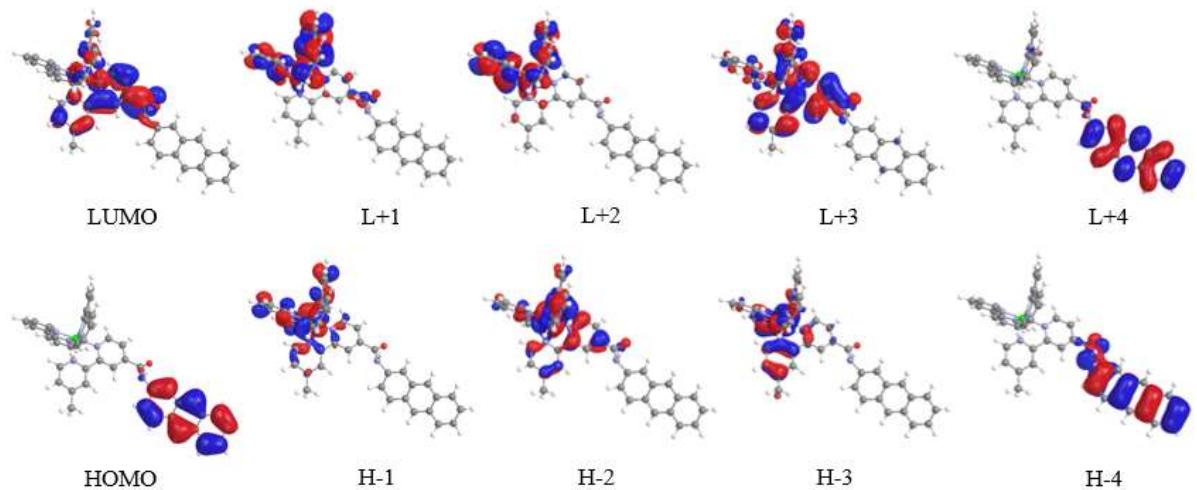
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE C – ESPECTRO ELETRÔNICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL DO COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO DE 2×10^{-5} mol L⁻¹.



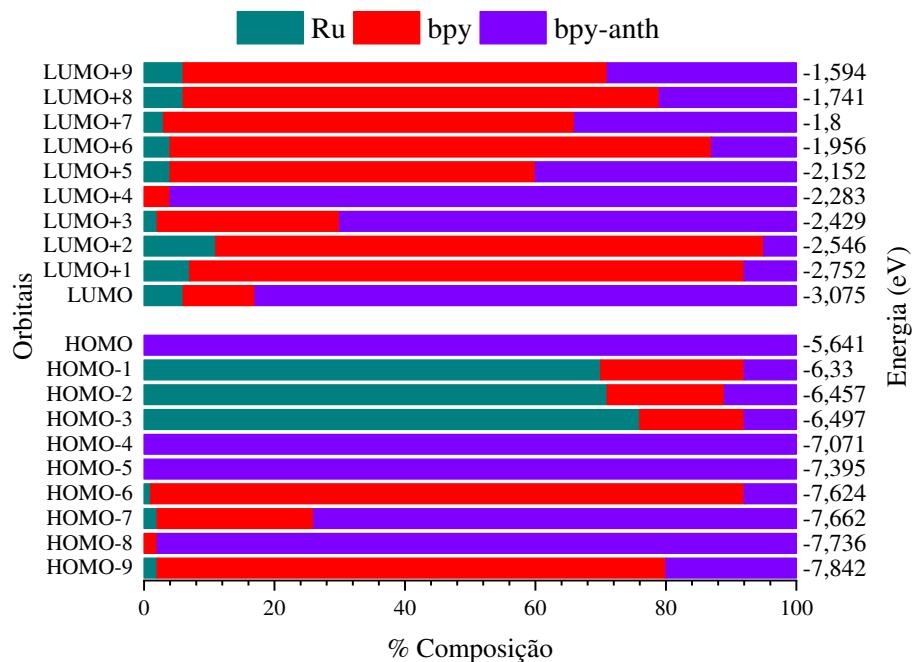
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE D – SUPERFÍCIES DE CONTORNO DOS ORBITAIS MOLECULARES DO COMPLEXO GRBA CALCULADOS POR TD-DFT.



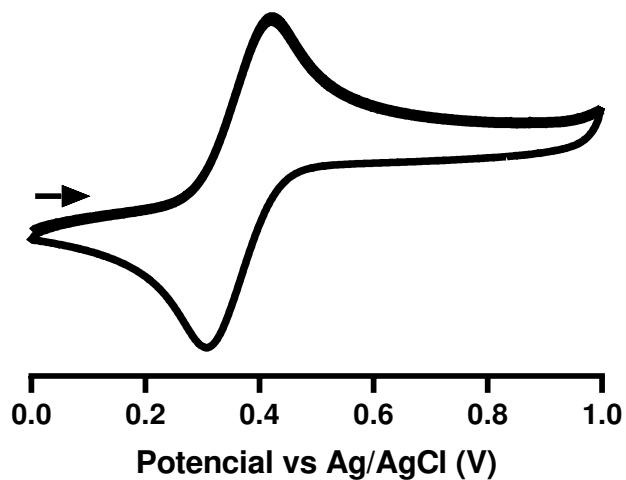
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE E – CONTRIBUIÇÕES DOS ORBITAIS MOLECULARES DA ESPÉCIE GRBA EM FUNÇÃO DE SEUS FRAGMENTOS: RU (—), BPY (—) E BPY-ANTH (—).



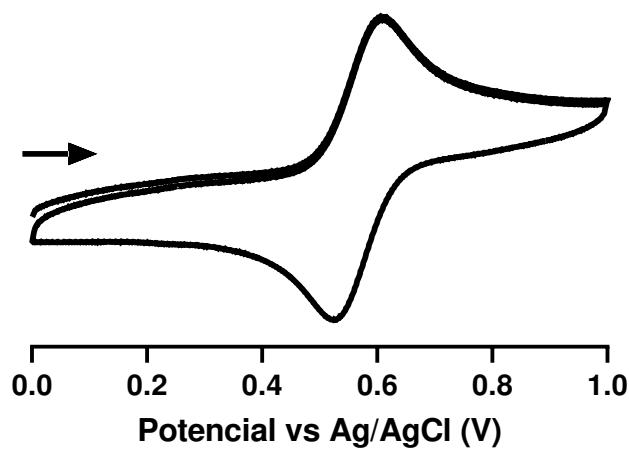
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE F – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ 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.



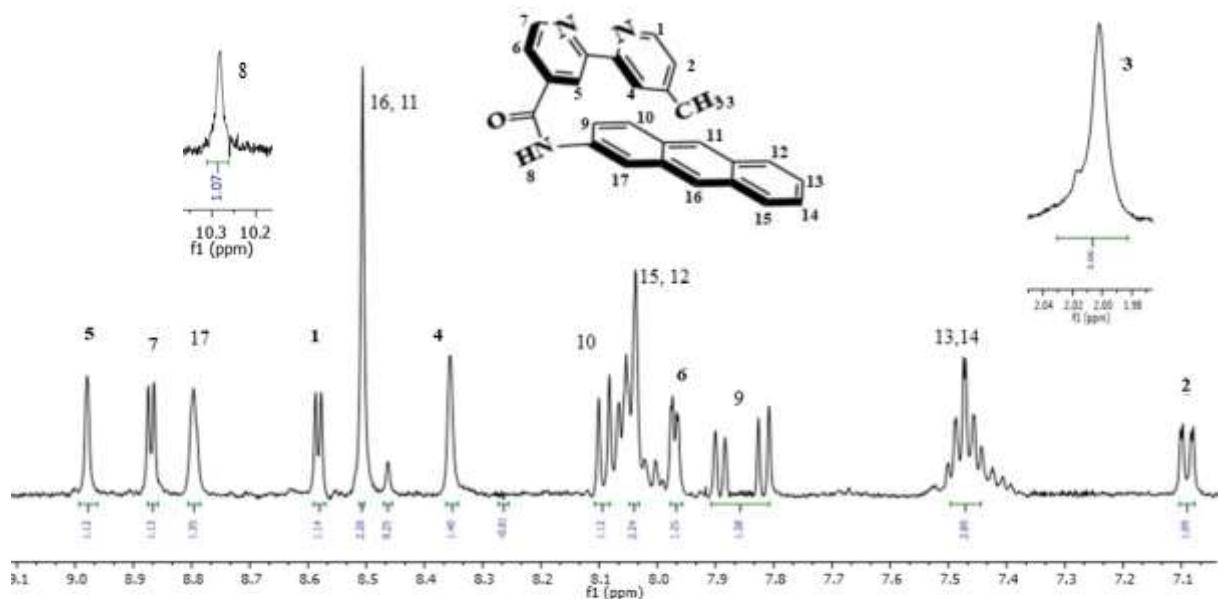
Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE G – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO COMPLEXO PRECURSOR
[Ru(phen)₂Cl₂] 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.**



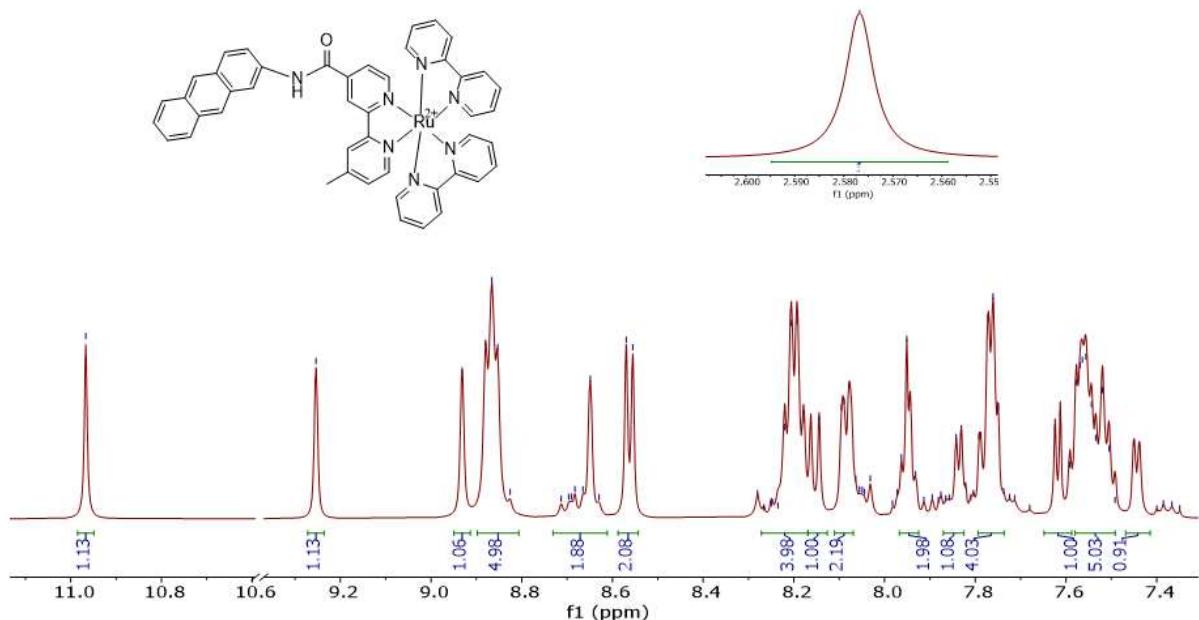
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE H – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H PARA O LIGANTE BPY-ANTH EM DMSO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz.



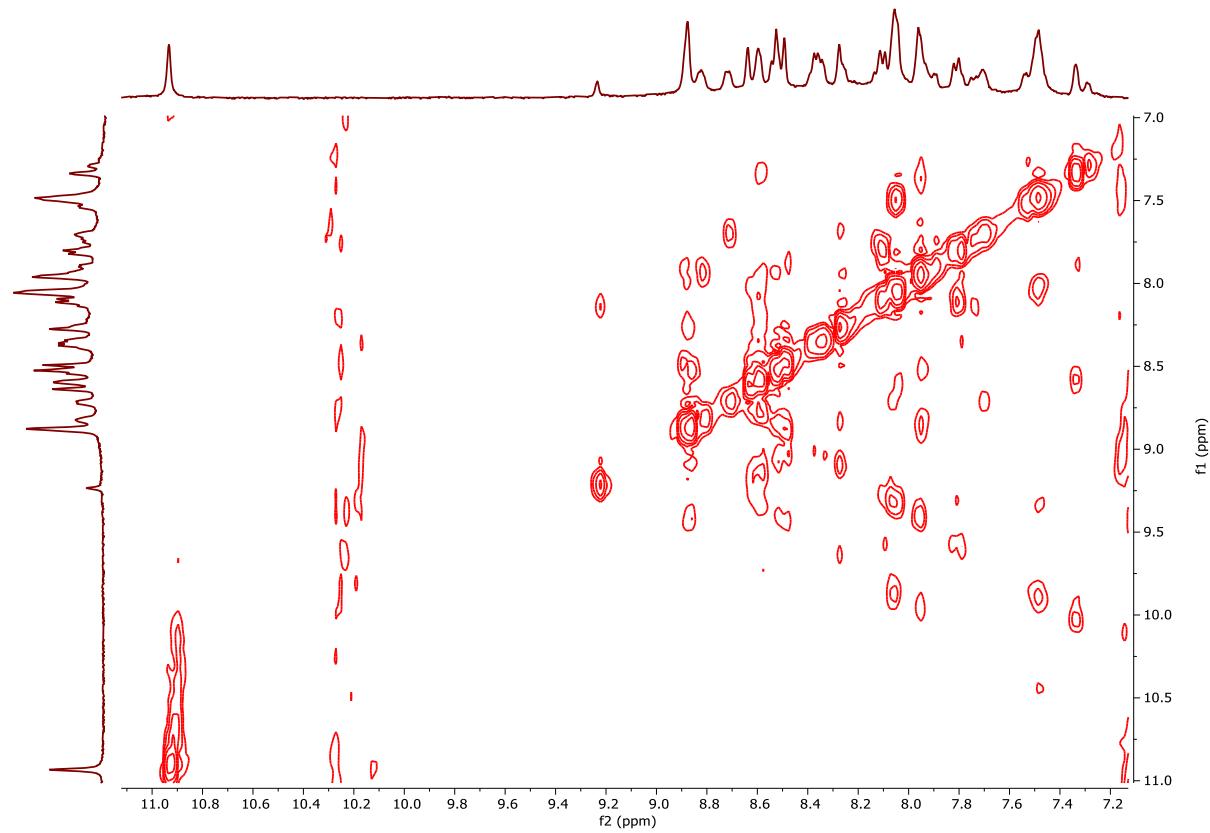
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE I – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H PARA O COMPLEXO GRBA EM DMSO DEUTERADO, OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz.



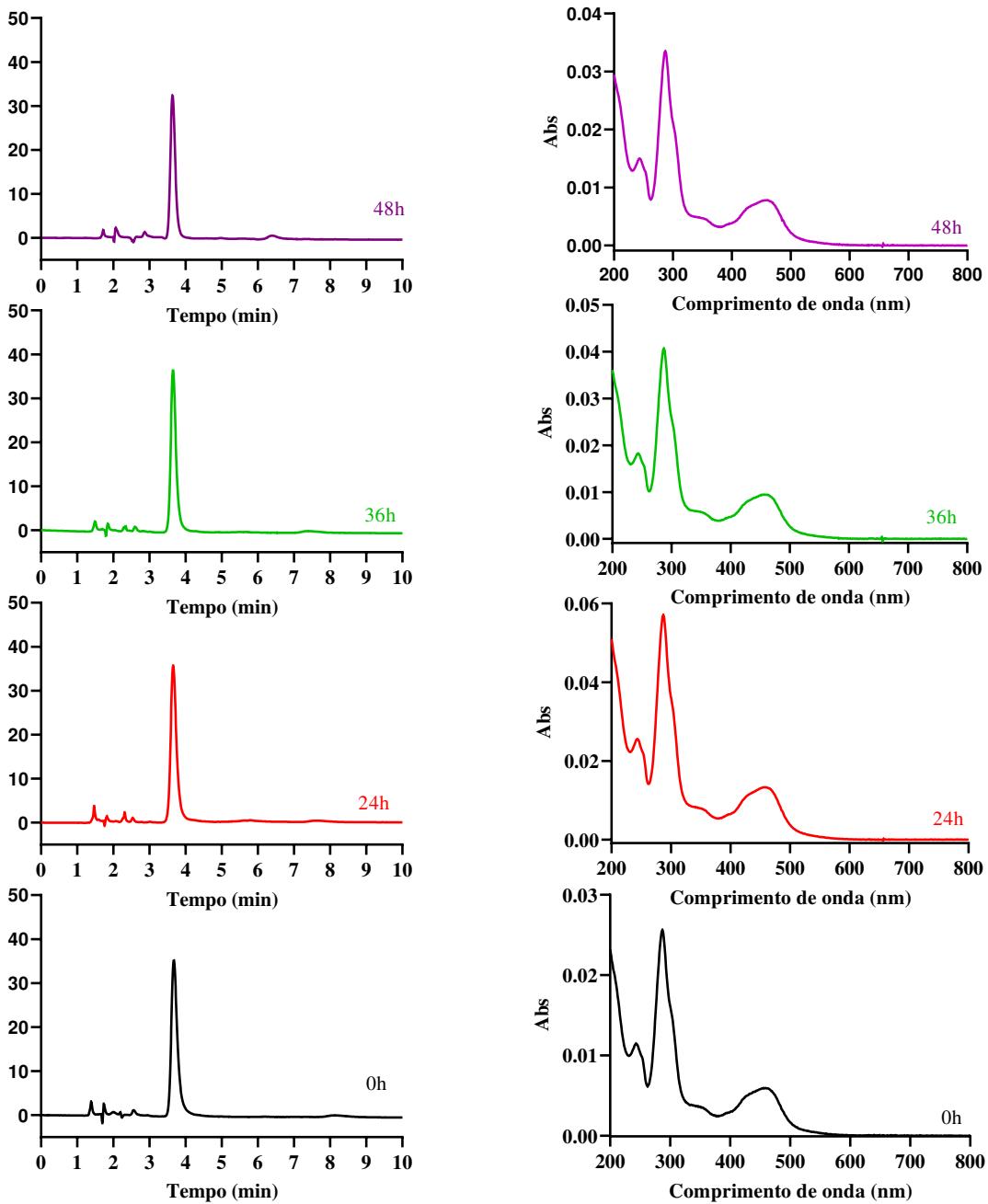
Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE J – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ^1H
BIDIMENSIONAL COSY PARA O COMPLEXO GRPA EM DMSO DEUTERADO,
OBTIDO NA FREQUÊNCIA DE 300 MHz.**



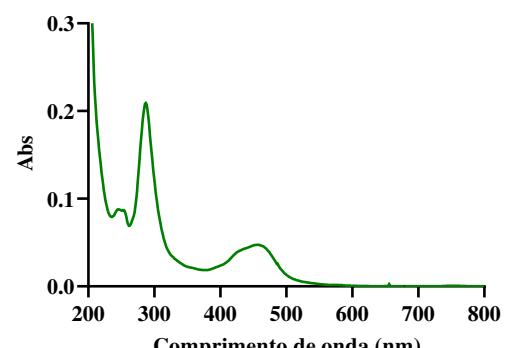
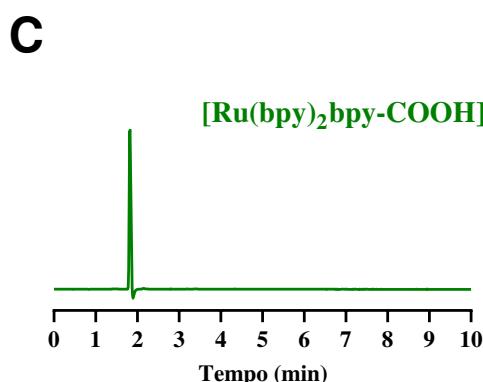
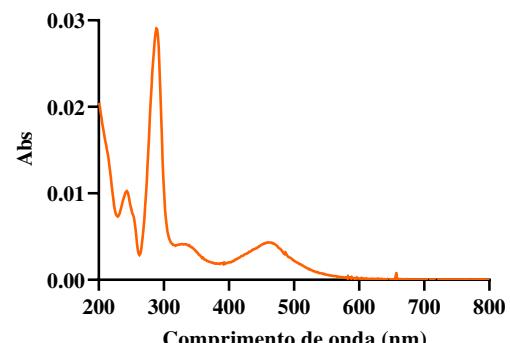
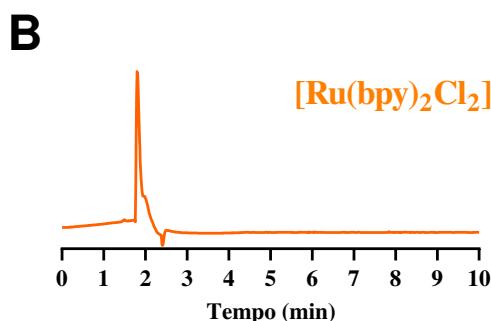
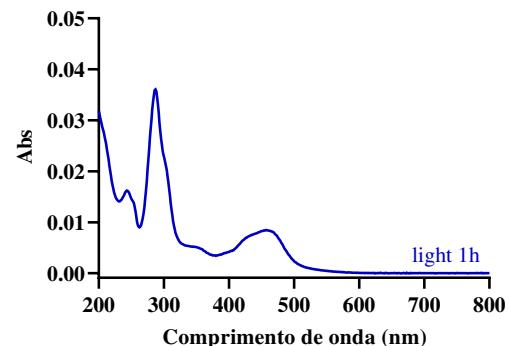
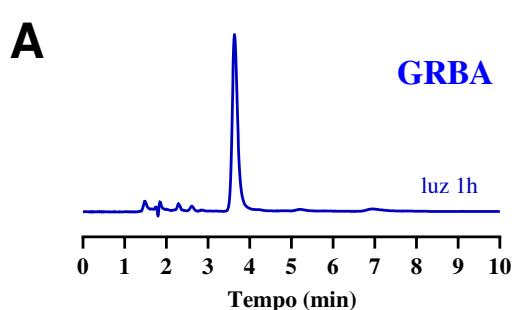
Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE K - ESTUDO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO GRBA
MONITORADO POR HPLC POR 48h, COM INJEÇÕES DE 10 uL EM FASE
MÓVEL EM 15% ACETONITRILE E 85% NATFA A 0.1%.**



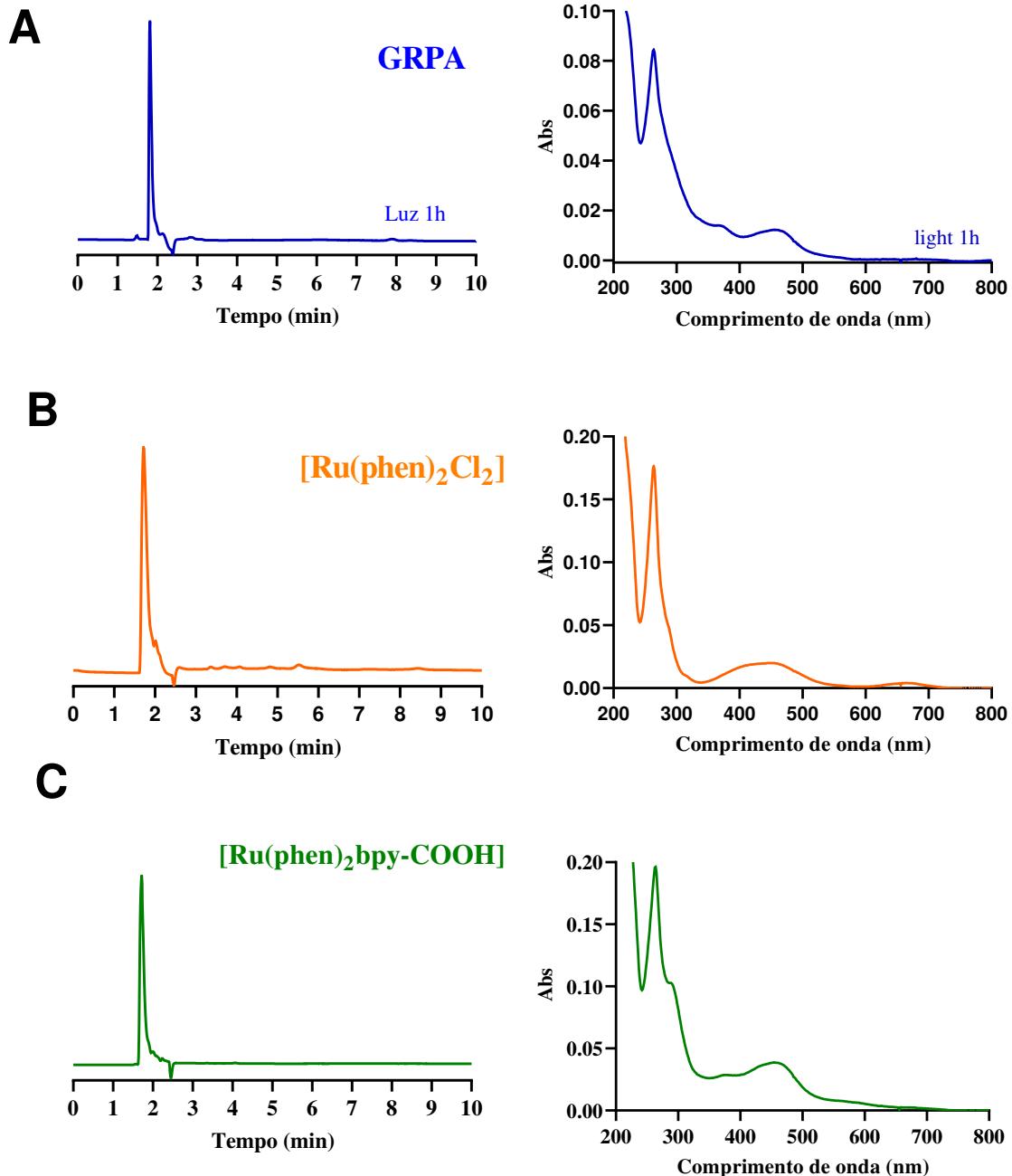
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE L – ESTUDO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO GRBA MONITORADO POR HPLC DURANTE 1h IRRADIADO COM LUZ AZUL (A), COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ (B) E COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mbpy-COOH})]^{2+}$ (C) EM UMA FASE MÓVEL DE 15% ACETONITRILA E 85% NATFA A 0,1%.



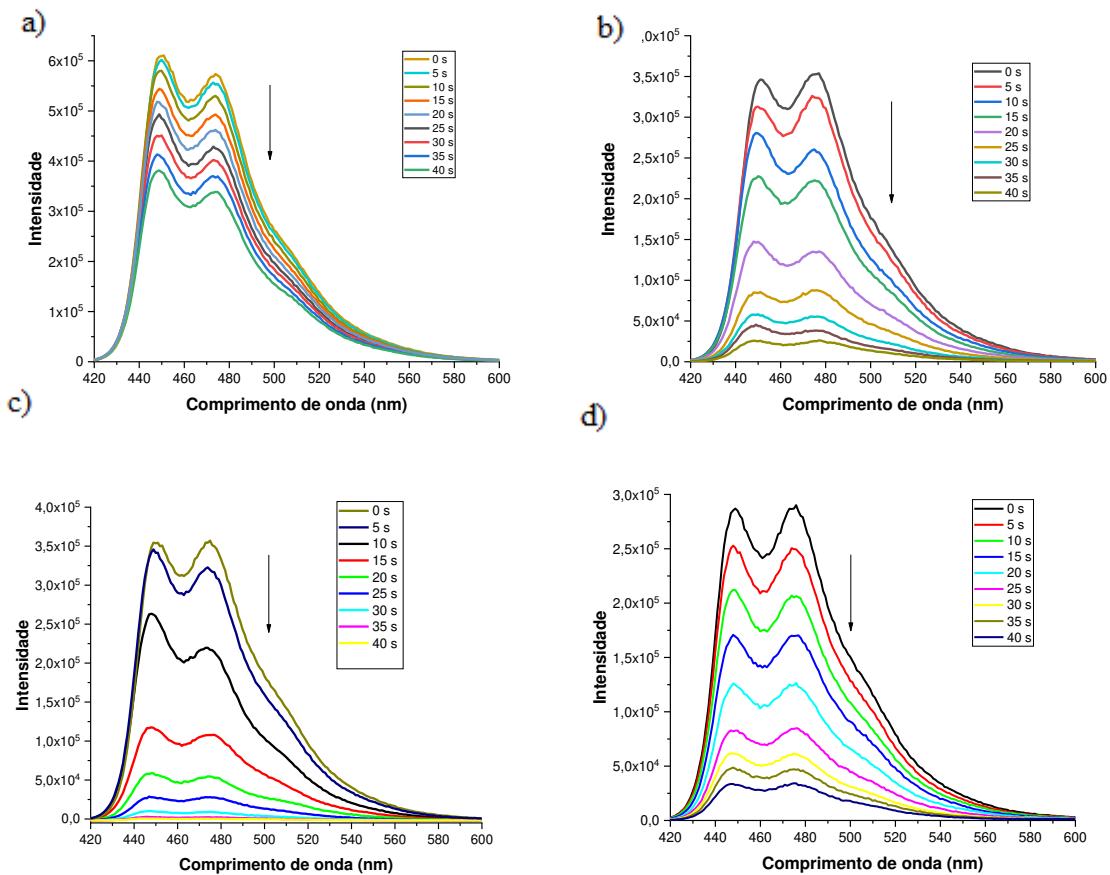
Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE M – ESTUDO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO GRPA
MONITORADO POR HPLC DURANTE 1 HORA IRRADIADO COM LUZ AZUL
(A), COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ (B) E COMPLEXO PRECURSOR
[$\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{mbpy-COOH})^{2+}$ (C) EM UMA FASE MÓVEL DE 15% ACETONITRILA
E 85% NATFA A 0,1%.**



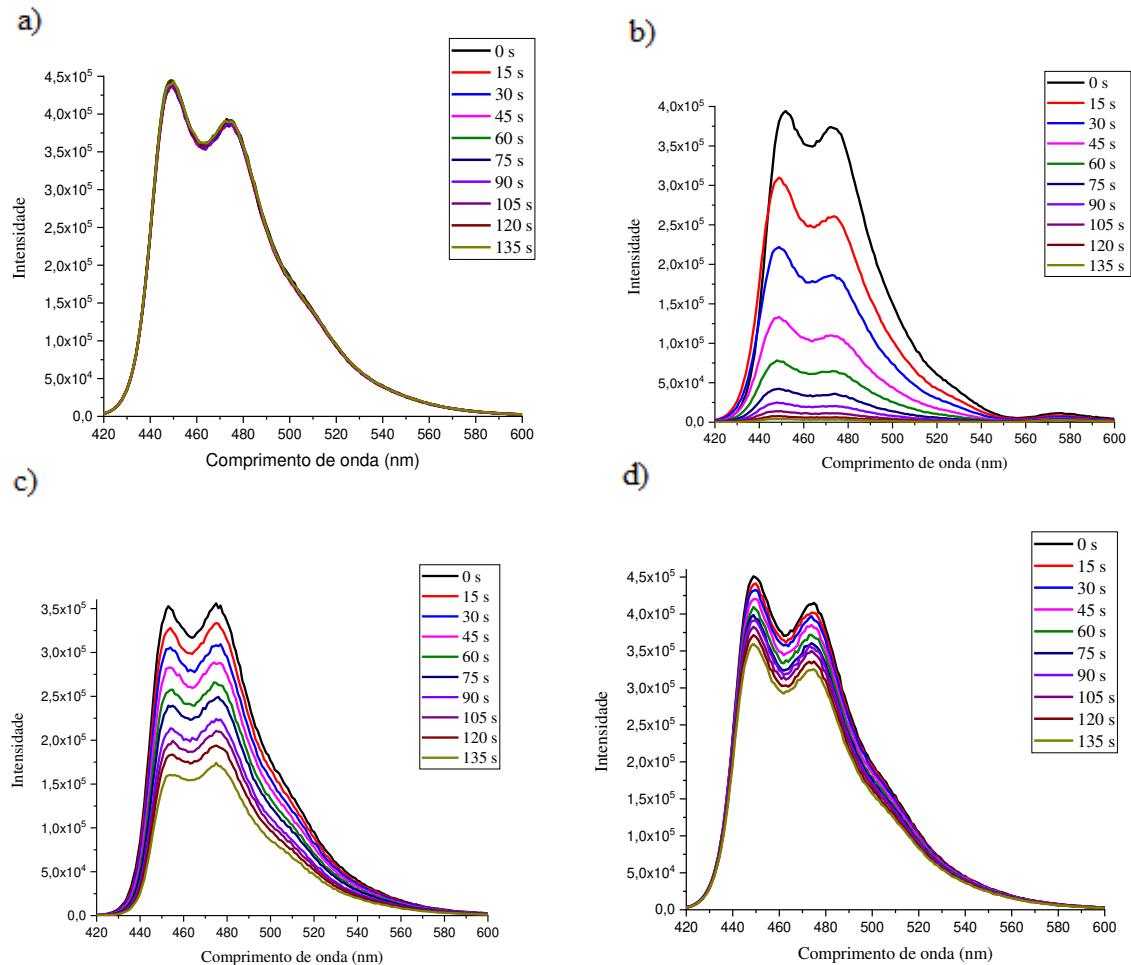
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE N – 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) GRPA E (D) GRBA, EM CONCENTRAÇÃO DE $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ EM METANOL. FENDAS: 0,3 mm, $\lambda_{\text{EXC}} = 410 \text{ nm}$. TEMPO DE IRRADIAÇÃO = 5 s. AMOSTRA IRRADIADA EX SITU USANDO LED AZUL.



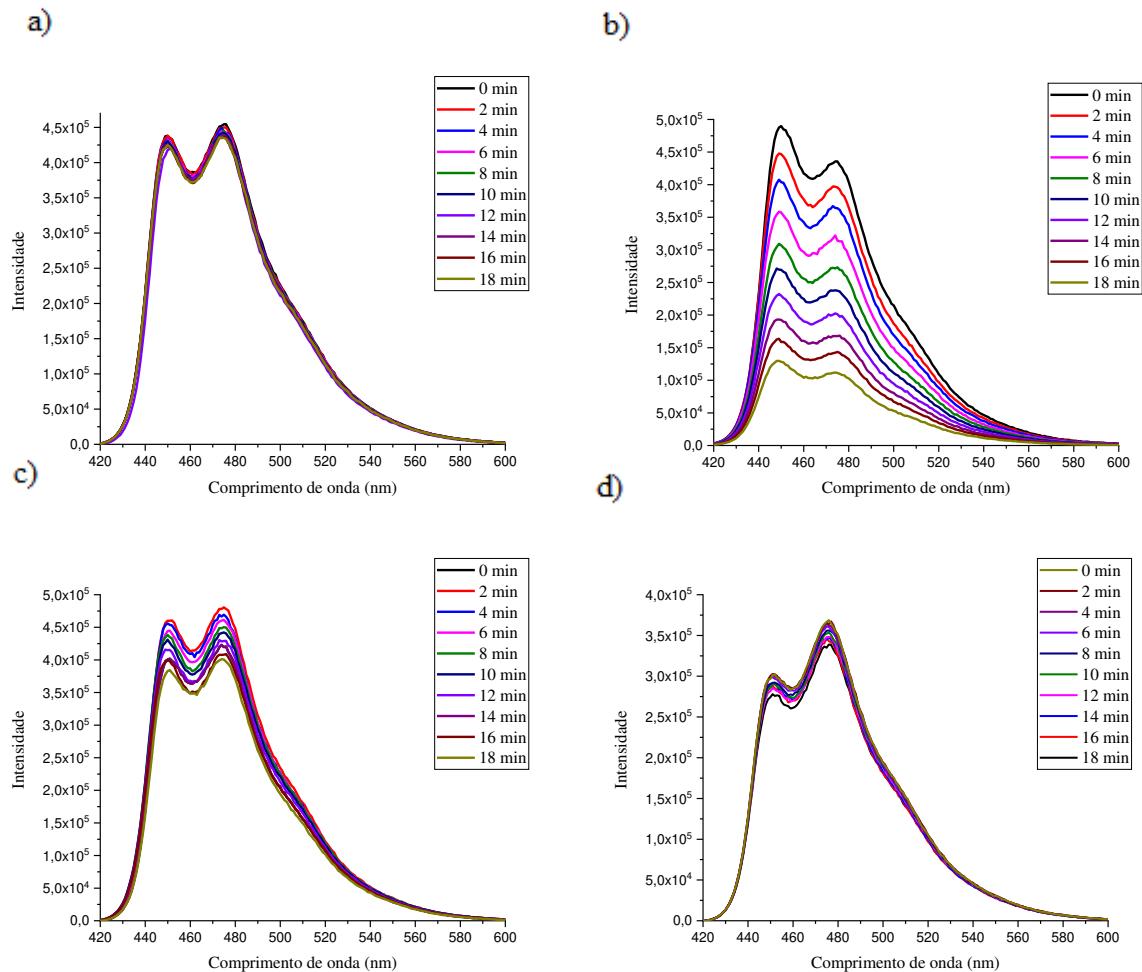
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE O – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE ROSA BENGALA; (C) GRPA; (D) GRBA, NA CONCENTRAÇÃO DE $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ EM METANOL. FENDAS:0,3 mm, $\lambda_{\text{EXC}} = 410 \text{ nm}$ E EMISSÃO DE 420-550 nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 15 s. AMOSTRA IRRADIADA *EX SITU* USANDO LED VERDE.



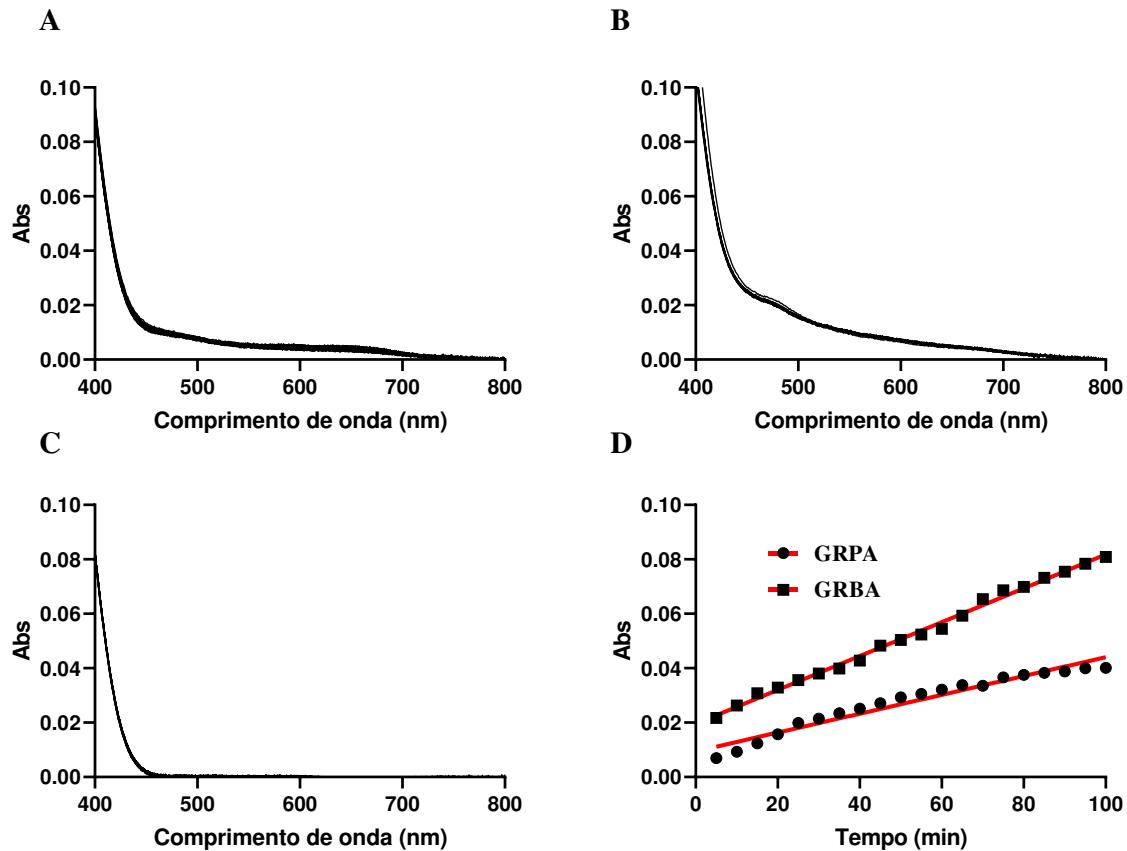
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE P – ESPECTRO DE EMISSÃO DO DPBF EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO NA (A) AUSÊNCIA E (B) PRESENÇA DE AZUL DE METILENO; (C) GRPA; (D) GRBA, NA CONCENTRAÇÃO DE $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ EM METANOL. FENDAS:0,3 mm, $\lambda_{\text{EXC}} = 410 \text{ nm}$ E EMISSÃO DE 420-550 nm. TEMPO DE IRRADIAÇÃO= 2 min. AMOSTRA IRRADIADA *EX SITU* USANDO LED VERMELHO.



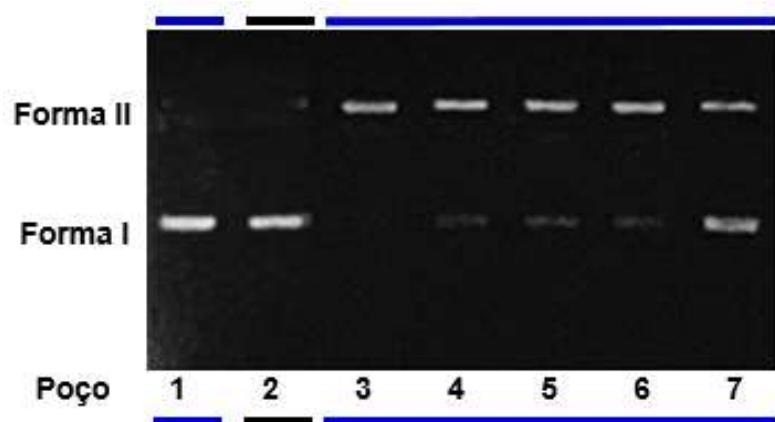
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE Q – ESTUDO DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EMPREGANDO NBT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) COM GRBA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) OU GRPA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B), NBT COM APENAS GSH (1,5 mmol L $^{-1}$) (C) E O GRÁFICO DE ABS₅₉₀ X TEMPO DOS COMPLEXOS GRPA E GRBA (D), TODOS COM IRRADIAÇÃO DE LUZ AZUL.



Fonte: Elaborada pelo autor.

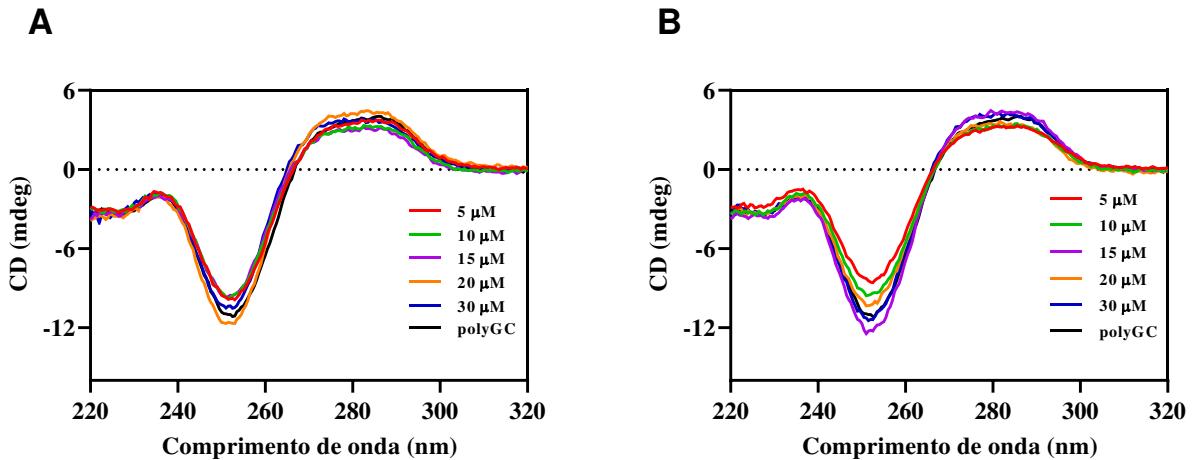
APÊNDICE R – FOTOCLIVAGEM DO DNA PBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DE GRBA (5 $\mu\text{MOL L}^{-1}$) APÓS 1 H DE IRRADIAÇÃO COM LED AZUL NA PRESENÇA DE SEQUESTRADORES DE RADICAIS. POÇO 1: APENAS DNA PBR322 COM IRRADIAÇÃO AZUL. POÇO 2: DNA + COMPLEXOS NO ESCURO. POÇO 3: DNA + COMPLEXOS COM IRRADIAÇÃO DE LUZ AZUL. POÇOS 4 – 7: DNA PBR322 + GRBA + SUPPRESSORES PIRUVATO (4), HISTIDINA (5), D-MANITOL (6) E TIRON (7), RESPECTIVAMENTE.



Fonte: Elaborada pelo autor.

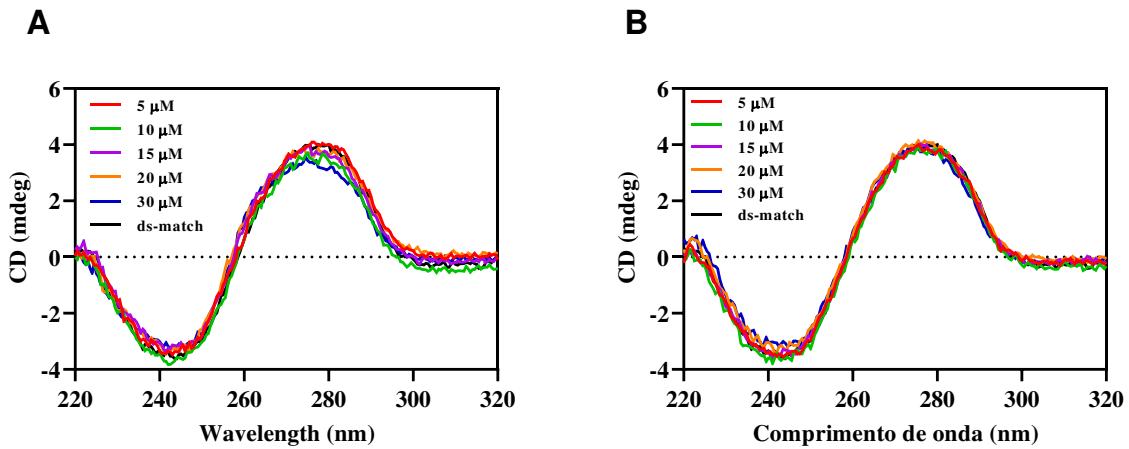
APÊNDICE S – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO POLY GC (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

1) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4.



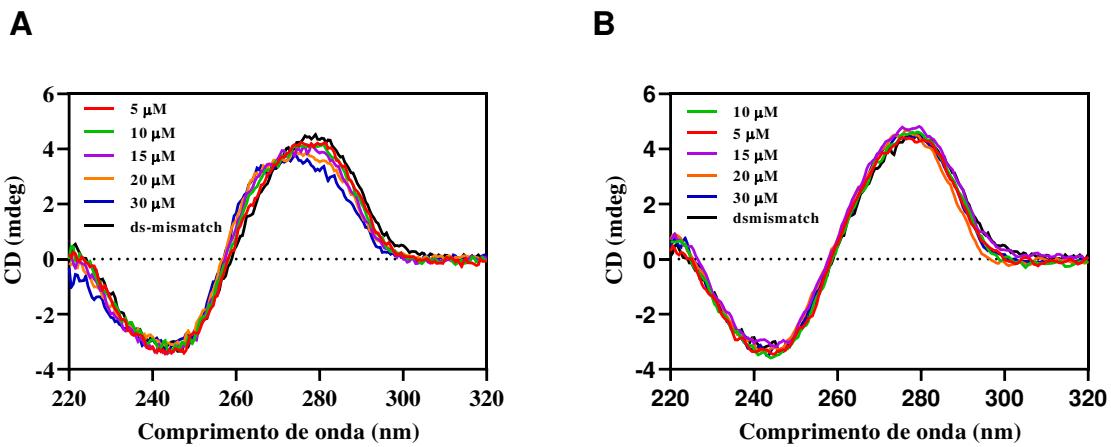
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE T – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DS-MATCH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L $^{-1}$ pH 7,4.



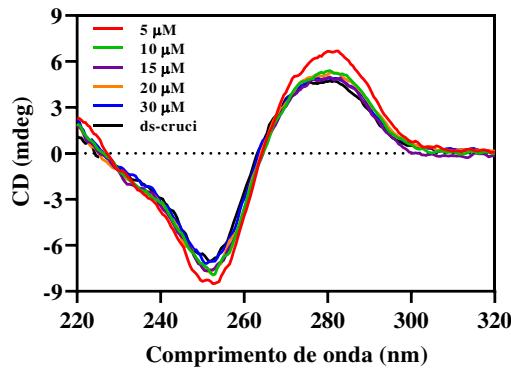
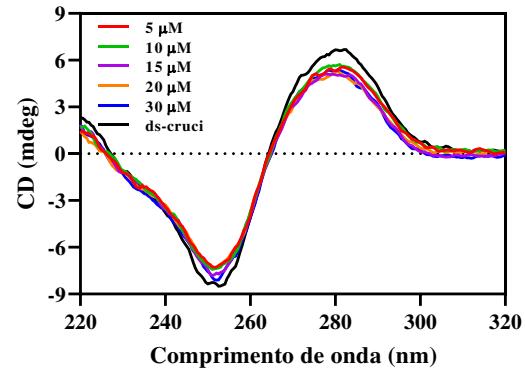
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE U – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DS-MISMATCH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L $^{-1}$ pH 7,4.



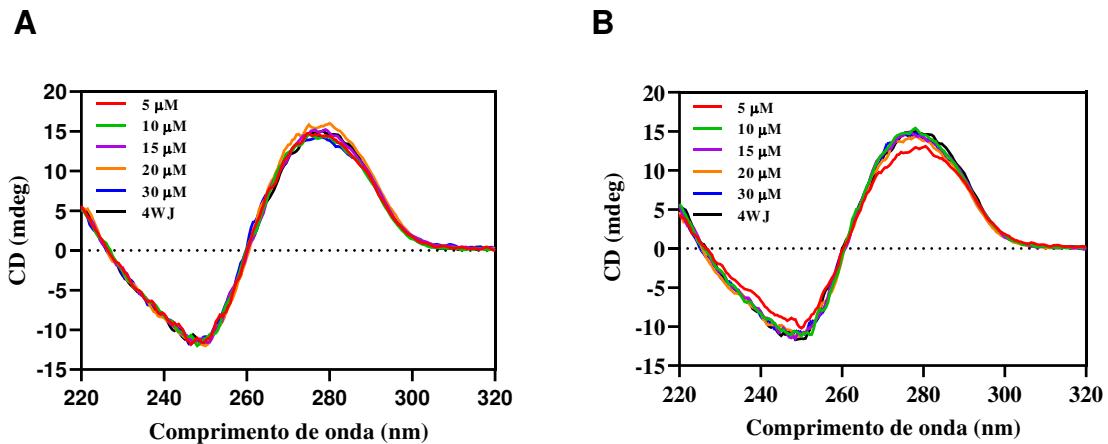
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE V – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DS-CRUCIFORM (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4.

A**B**

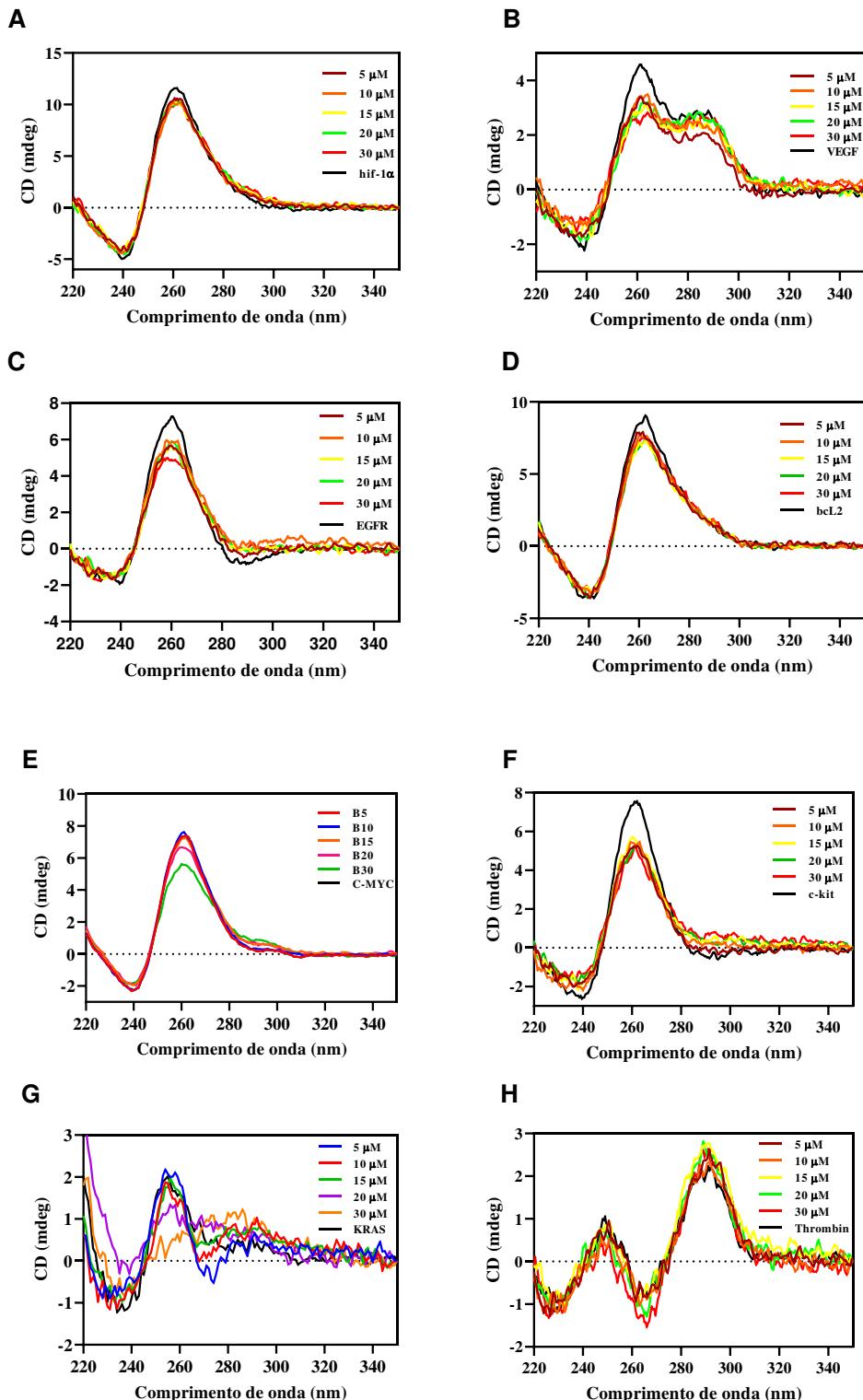
Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE W – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DO 4WJ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$)
NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES (5, 10, 15, 20 E 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) APÓS 1h DE INCUBAÇÃO EM
TAMPÃO TRIS-HCL 10 mmol L⁻¹ pH 7,4.**



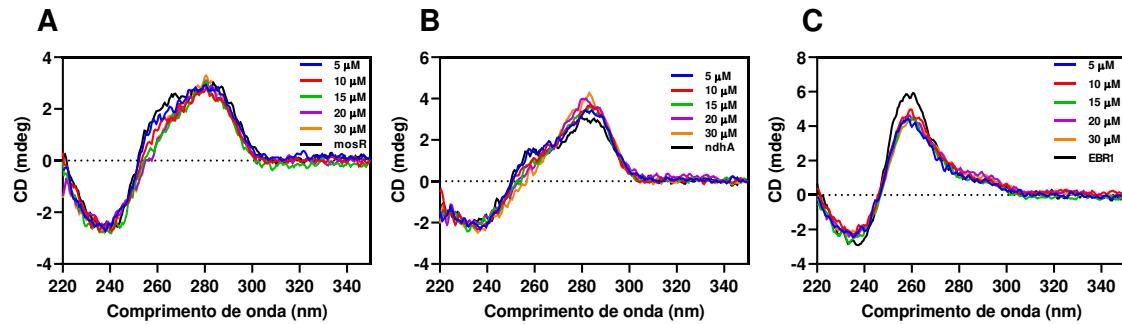
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE X – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO GRPA (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO DNA G-QUADURPLEX HIF-1A (A), VEGF (B), EGFR (C), BCL2 (D), C-MYC (E), C-KIT (F), KRAS (G), TROMBINA (H) (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4 .



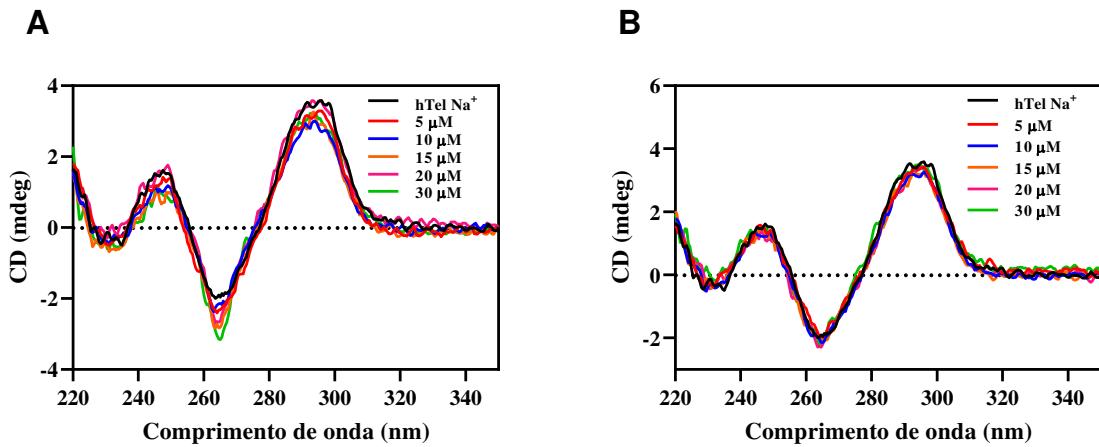
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE Y – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DNA MOSR (A), NDHA (B) E ERB1 (C) ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO COMPLEXO GRBA (0 - 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L $^{-1}$ (pH 7,4).



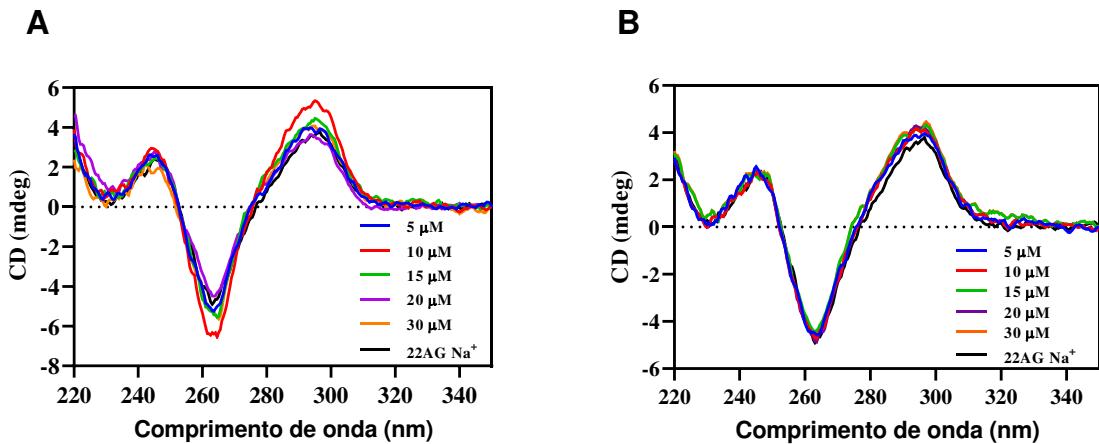
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE Z – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DNA HTEL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10mmol L⁻¹ (pH 7,4), NaCl 100 mmol L⁻¹, EDTA 0,1 mmol L⁻¹.



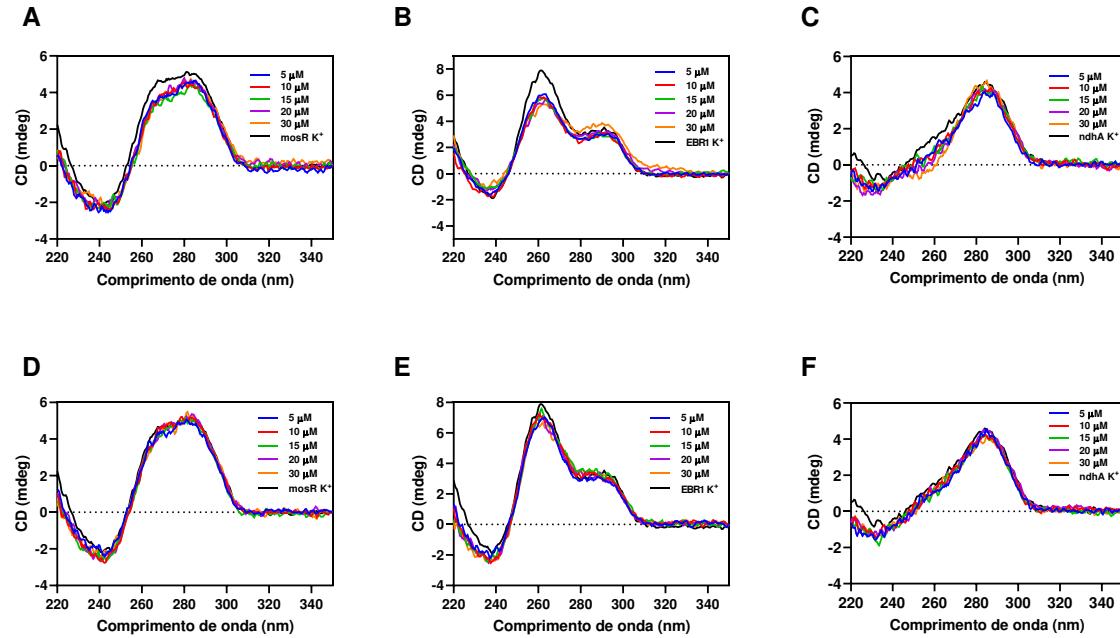
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE AA – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DOS COMPLEXOS GRPA (A) E GRBA (B) (0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L $^{-1}$ (pH 7,4), NaCl 100 mmol L $^{-1}$, EDTA 0,1 mmol L $^{-1}$.



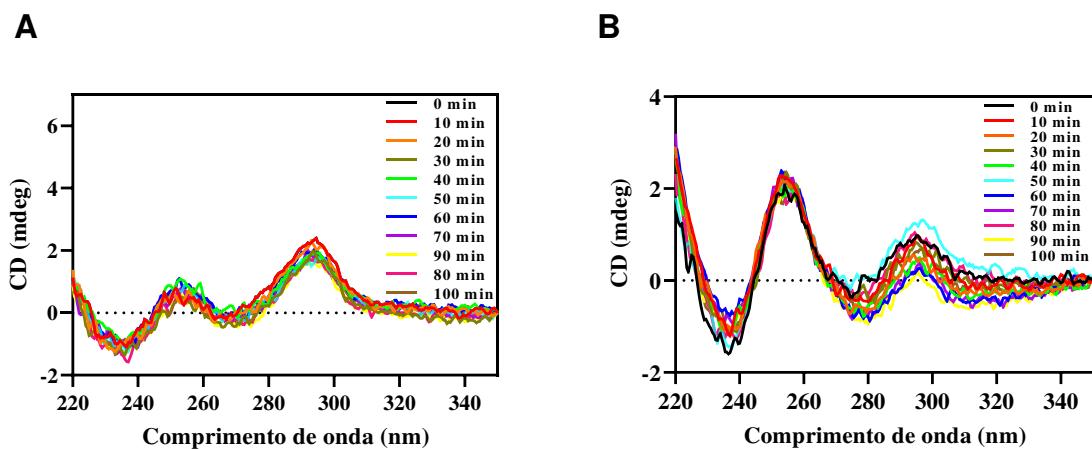
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE AB – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO COMPLEXO GRBA NA PRESENÇA DO DNA mosR (A), EBR1 (B) E ndhA (C) (20 μ MOL L $^{-1}$) E DO COMPLEXO GRPA NA PRESENÇA DO DNA mosR (D), EBR1 (E) E ndhA (F) (20 μ mol L $^{-1}$) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L $^{-1}$ (pH 7,4), KCl 100 mmol L $^{-1}$ E EDTA 0,1 mmol L $^{-1}$.



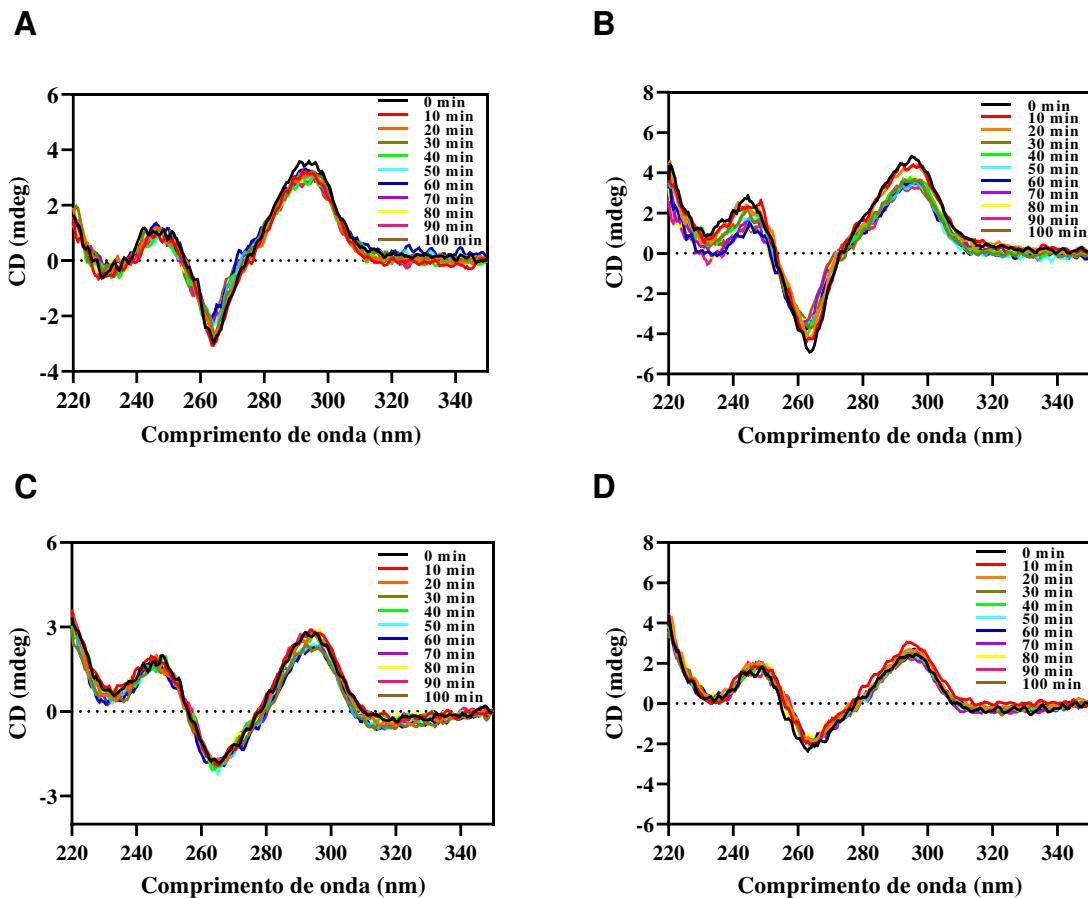
Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE AC – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO COMPLEXO
GRBA (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO DNA HTEL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) E DNA 22AG
(10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) EM TAMPÃO TRIS-HCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,4), KCl 100 mmol L^{-1} E
EDTA 0,1 mmol L^{-1} . TEMPO DE IRRADIAÇÃO = 10 min. LED AZUL.**



Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE AD – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DO COMPLEXO GRPA (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) NA PRESENÇA DO DNA HTEL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A), DNA 22AG (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (B) E DO COMPLEXO GRBA COM DNA HTEL (C), DNA 22AG (D) EM TAMPÃO TRIS-HCL 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4), NaCl 100 mmol L⁻¹ E EDTA 0,1 mmol L⁻¹.
TEMPO DE IRRADIAÇÃO = 10 min. LED AZUL.**



Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE AE – PRODUTOS ORIUNDOS DA TESE

Artigo 1

Inorganic Chemistry

Open Access

This article is licensed under [CC-BY-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/) 

pubs.acs.org/IC

Article

Minimal Functionalization of Ruthenium Compounds with Enhanced Photoreactivity against Hard-to-Treat Cancer Cells and Resistant Bacteria

Geângela de Fátima Sousa Oliveira, Florencio Sousa Gouveia, Jr., Alexandre Lopes Andrade, Mayron Alves de Vasconcelos, Edson Holanda Teixeira, Marcos V. Palmeira-Mello, Alzir A. Batista, Luiz Gonzaga de França Lopes, Idalina Maria Moreira de Carvalho,* and Eduardo Henrique Silva Sousa*

Cite This: *Inorg. Chem.* 2024, 63, 14673–14690

Read Online

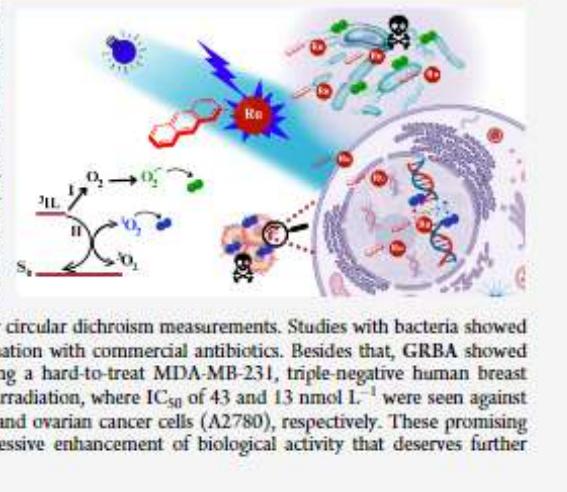
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Metallocompounds have emerged as promising new anticancer agents, which can also exhibit properties to be used in photodynamic therapy. Here, we prepared two ruthenium-based compounds with a 2,2'-bipyridine ligand conjugated to an anthracenyl moiety. These compounds coded GRBA and GRPA contain 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline as auxiliary ligands, respectively, which provide quite a distinct behavior. Notably, compound GRPA exhibited remarkably high photoproduction of singlet oxygen even in water ($\phi_{\Delta} = 0.96$), almost twice that of GRBA ($\phi_{\Delta} = 0.52$). On the other hand, this latter produced twice more superoxide and hydroxyl radical species than GRPA, which may be due to the modulation of their excited state. Interestingly, GRPA exhibited a modest binding to DNA ($K_b = 4.51 \times 10^4$), while GRBA did not show a measurable interaction only noticed by circular dichroism measurements. Studies with bacteria showed a great antimicrobial effect, including a synergistic effect in combination with commercial antibiotics. Besides that, GRBA showed very low or no cytotoxicity against four mammalian cells, including a hard-to-treat MDA-MB-231, triple-negative human breast cancer. Potent activities were measured for GRBA upon blue light irradiation, where IC_{50} of 43 and 13 nmol L⁻¹ were seen against hard-to-treat triple-negative human breast cancer (MDA-MB-231) and ovarian cancer cells (A2780), respectively. These promising results are an interesting case of a simple modification with expressive enhancement of biological activity that deserves further biological studies.



Depósito da Patente870240095316
06/11/2024 17:37

29409162326409414

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase
nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 023183 0

Dados do Depositante (71)**Depositante 1 de 1**

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 07272636000131

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av da universidade, 2853 - Benfica

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60020-181

País: Brasil

Telefone: (85) 3366-9434

Fax: (85) 3366-9941

Email: patentes@ufc.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
06/11/2024 às 17:37, Peticão 870240095316

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de COMPOSTOS À BASE DE RUTÉNIO COMO MODULADORES

Utilidade (54): CONFORMACIONAIS DE DNA NÃO CANÔNICOS COMO SONDAS E ALVOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIÁVEIS

Resumo: Esta patente descreve compostos polipiridínicos de ruténio, especificamente os complexos do tipo cis-[Ru(bpy)2(bpy-anth)]2+ (GRBA) e cis-[Ru(phen)2(bpy anth)]2+ (GRPA), que são capazes de interagir seletivamente com estruturas de DNA não canônico do tipo G-quadruplex. Esses compostos se mostram promissores como agentes terapêuticos, especialmente em doenças negligenciadas como tuberculose, doença de Chagas e leishmaniose, além de apresentarem atividade anticâncer e antibacteriana. A invenção mostra a capacidade desses complexos de estabilizar estruturas de G-quadruplex, induzindo mudanças conformacionais específicas e estabilização. Isso pode afetar processos biológicos importantes, como a replicação e transcrição do DNA, resultando em potenciais efeitos terapêuticos. Os complexos também têm a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete, sob irradiação de luz, o que pode ser explorado para tratamento de células cancerosas e infecções bacterianas, aumentando a seletividade e minimizando os efeitos colaterais. Estudos iniciais mostraram que os complexos interagem de maneira estável com DNA do tipo G-quadruplex com as sequências hTel,22AG, EBR1, mosR e ndhA. Ensaios de fluorescência e dicroismo circular confirmaram a especificidade dos complexos para essas estruturas, em comparação ao DNA duplex convencional. Além disso, os compostos apresentaram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, com aumento da eficácia sob irradiação de luz azul. Os ensaios de citotoxicidade indicam que os complexos possuem baixa citotoxicidade para células saudáveis, enquanto demonstram potente atividade contra linhagens de células cancerosas, sugerindo seu potencial como agentes fotossensibilizadores tendo como alvo G-quadruplex. Dessa forma, esta invenção apresenta novos complexos de ruténio com propriedades promissoras para aplicações terapêuticas, envolvendo tanto doenças negligenciadas como câncer e infecções bacterianas.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 06/11/2024 às 17:37, Petição 870240095316

Dados do Inventor (72)**Inventor 1 de 4****Nome:** EDUARDO HENRIQUE SILVA DE SOUSA**CPF:** 50654020353**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** RUA JUVENAL DE CARVALHO 921, APT 103**Cidade:** Fortaleza CE**Estado:** CE**CEP:****País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:** eduardohss@dqoi.ufc.br**Inventor 2 de 4****Nome:** GEÂNGELA DE FÁTIMA SOUSA DE OLIVEIRA**CPF:** 00457920386**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Rua Um, 171 - Bloco D, APTO 632, Tabapuá**Cidade:** Fortaleza CE**Estado:** CE**CEP:****País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:** geangelasousa@gmail.com**Inventor 3 de 4****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
06/11/2024 às 17:37, Petição 870240095316

Nome: LUIZ GONZAGA DE FRANÇA LOPES
CPF: 59700920453
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Rua senador Pompeu, 2420. Apto 1401
Cidade: Fortaleza CE
Estado: CE
CEP:
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: lopeslu@dqoi.ufc.br

Inventor 4 de 4

Nome: IDALINA MARIA MOREIRA DE CARVALHO
CPF: 48078506368
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Rua João Cordeiro 1100, apto 702.
Cidade: Fortaleza CE
Estado: CE
CEP:
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: idalina@dqoi.ufc.br

PETICIONAMENTO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
ELETRÔNICO 06/11/2024 às 17:37, Petição 870240095316