



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

FELIPE DIÓGENES ABREU

**COMPLEXOS ARIL SUBSTITUÍDOS DE RUTÊNIO (II): SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS DE FOTOCLIVAGEM E INTERAÇÃO COM DNA**

FORTALEZA

2018

FELIPE DIÓGENES ABREU

COMPLEXOS ARIL SUBSTITUÍDOS DE RUTÊNIO (II): SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS DE FOTOCLIVAGEM E INTERAÇÃO COM DNA

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Idalina Maria Moreira de Carvalho.

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

FORTALEZA

2018

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

A145c Abreu, Felipe Diógenes.

Complexos aril substituídos de rutênio (II) : síntese, caracterização, estudos de fotoclivagem e interação com DNA / Felipe Diógenes Abreu. – 2019.
132 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho.
Coorientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

1. Complexos polipiridínicos de rutênio (II). 2. DNA. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Fotofísica. I. Título.
CDD 540

FELIPE DIÓGENES ABREU

COMPLEXOS ARIL SUBSTITUÍDOS DE RUTÊNIO (II): SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS DE FOTOCLIVAGEM E INTERAÇÃO COM DNA

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

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Idalina Maria Moreira de Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Claudenilson da Silva Clemente
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Franca Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Ramilye Araújo Lima
Centro Universitário Christus

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo desmedido esforço em me proporcionar uma formação intelectual digna e, sobretudo, amor sem fim.

À minha companheira, pelo apoio afetivo e um amor precioso.

Aos meus orientadores, Professora Dra. Idalina M. M. de Carvalho e Professor Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa, pela dedicação e solicitude no processo de orientação.

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), pela execução das análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Ao Prof. Dr. Marcelo Gehlen do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo apoio e solicitude na realização dos testes de espectroscopia de emissão resolvido no tempo.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda do Laboratório Teixeira e Mayron A. Vasconcelos do Laboratório Integrado de Biomoléculas (Departamento de Patologia e Medicina Legal-UFC), pelo apoio técnico na realização dos ensaios microbiológicos.

Aos professores e pesquisadores do grupo de Bioinorgânica, pelas relevantes discussões científicas acerca deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioinorgânica, pelos momentos de debates científicos e descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

Nesse estudo, três complexos polipiridínicos de rutênio (II), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (1), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (2) e $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (3) (dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, Naf e Ant são ligantes bipyridínicos com grupos naftil e antracênil, respectivamente) foram sintetizados e caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do UV-vis, espectroscopia de emissão, IV, RMN ^1H e voltametria cíclica. Os experimentos de interação com DNA por titulação espectrofotométrica indicaram desde interações moderadas ($[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ $\log K_b=4,99$) a intercalação ($[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ ($\log K_b=6,83$) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, $\log K_b=6,78$). A competição com agentes competidores por sulco revelaram que os complexos 1 e 2 interagem com DNA via sulco menor. Além disso, esses compostos apresentaram seletividade moderada em relação ao DNA G-quadruplex, provavelmente induzida pelos grupamentos Naf e Ant. O ensaio de geração de oxigênio singleto com DPBF explicitamente demonstrou que os valores de Φ_Δ seguem a tendência (3)>(2)> $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ >(1)> $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ evidenciando a substancial importância dos cromóforos naftil e antracênil nos processos de formação de oxigênio singleto. Além disso, vale destacar que, aparentemente, o número de substituintes antracênil aumenta significativamente Φ_Δ quando comparamos o monossubstituído $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Ant}]^{2+}$ ($\Phi_\Delta = 0,74$) e o trissubstituído $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ ($\Phi_\Delta = 0,99$). Tal comportamento pode ser atribuído aos estados tripleto - eficientes na excitação do oxigênio molecular. Adicionalmente, os complexos mostraram atividade em fotoclivar DNA, mesmo em exposição a um LED amarelo, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ também exibiram ação antibacteriana na presença de luz azul, particularmente frente às bactérias Gram-positivas. Diante de todos esses resultados, considera-se que foi possível desenvolver uma estratégia bem-sucedida em produzir agentes químicos ativáveis por luz visível com potencial farmacológico e biotecnológico.

Palavras-chave: Complexos polipiridínicos de rutênio (II). DNA. Terapia fotodinâmica. Fotofísica.

ABSTRACT

In this study, three polypyridine complexes of ruthenium (II), [Ru (dppz) Naf]²⁺(1), [Ru (dppz) Ant]²⁺(2) and [Ru (Ant)₃]²⁺(3) (dppz = dipyrido [a: 2 ', 3'-c] phenazine, Naf and Ant are bipyridine ligand attached to a naphthyl and anthracenyl groups, respectively) were synthesized and characterized by UV-vis electronic spectroscopy, emission spectroscopy, IR, ¹H NMR and cyclic voltammetry. DNA binding measurements carried out by electronic spectroscopy indicated from moderate ([Ru(Ant)₃]²⁺, logK_b=4.99) to strong ([Ru(dppz)Naf]²⁺, logK_b=6.83) e [Ru(dppz)Ant]²⁺, logK_b=6.78) intercalation binding. Competition assay monitored by fluorescence using selective groove-binders (methyl green and Hoechst) suggested both complexes 1 and 2 interact to DNA via minor groove. Additionally, these complexes exhibited moderate selectivity toward G-quadruplex DNA, which is likely due to the Naf and Ant pendant groups. Light-induced oxygen singlet production was measured using DPBF, which showed the quantum yield values (Φ_{Δ}) followed the trend (3)⁺>(2)>[Ru(bpy)₃]²⁺>(1)>[Ru(bpy)₂dppz]²⁺. This result supports the key role of the pendant chromophoric groups Naf and Ant enabling the efficient production of ¹O₂. Important to remark, that an increase in the number of anthracenyl pendant groups seemed to cause a large enhancement on the Φ_{Δ} , particularly if comparing a singly modified complex [Ru(bpy)₂Ant]²⁺ (Φ_{Δ} = 0.74) and one triply modified [Ru(Ant)₃]²⁺ (Φ_{Δ} = 0.99). This behavior can be assigned to the efficiency of the triplet excited state of these complexes to convert triplet oxygen into singlet oxygen. Besides these metal complexes ability to photocleave DNA, even using a yellow LED, compounds 1 and 2 also showed great antibacterial activity using blue LED, particularly against Gram-positive bacteria. Altogether, these results indicated a new strategy to prepare enhanced light-activatable agents was successful opening new potential opportunities for their application in pharmacology and biotechnology.

Keywords: Polypyridine ruthenium (II) complexes. DNA. Photodynamic therapy. Photophysics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura molecular do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	17
Figura 2	– Diagrama de orbital molecular simplificado do complexo polipiridínico de Ru(II).....	18
Figura 3	– Diagrama de Jablonski do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	19
Figura 4	– Alguns ligantes polipiridínicos com cromóforos encontrados na literatura [Referencias de 2,6-11].....	21
Figura 5	– Diagrama de Jablonski para sistemas bicromóforos.....	22
Figura 6	– Estruturas e diagrama de Jablonski para os processos fotofísicos dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$	23
Figura 7	– Efeito do solvente nos estados não-emissivo e emissivo.....	24
Figura 8	– Diferentes conformações de DNA.....	25
Figura 9	– Vista axial das diferentes conformações de DNA.....	26
Figura 10	– Representação da estrutura de G-quadruplex (a) e um tetrâmero de guanina unido por pontes de Hoogsteen (b).....	26
Figura 11	– Processos físico-químicos relacionados à TFD.....	30
Figura 12	– Estruturas propostas dos complexos desse estudo.....	32
Figura 13	– Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ em pastilha de KBr.....	42
Figura 14	– Espectro vibracional na região do infravermelho dos compostos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}](\text{PF}_6)_2$ em pastilha de KBr.....	43
Figura 15	– Espectro de ressonância magnética de ^1H dos isômeros geométricos do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ em DMSO deuterado.....	45
Figura 16	– Espectro de ressonância magnética de ^1H dos isômeros geométricos do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em DMSO deuterado.....	48
Figura 17	– Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ em metanol na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	51
Figura 18	– Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em acetonitrila na concentração de $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	52

Figura 19	– Espectros eletrônicos calculados dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) por TD-DFT com B3LYP.....	54
Figura 20	– Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ calculados por TD-DFT.....	55
Figura 21	– Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ calculados por TD-DFT.....	56
Figura 22	– Gráfico de energia calculada por TD-DFT dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b).....	57
Figura 23	– Espectro de emissão normalizado (excitação de 460 nm) para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em acetonitrila, na concentração de $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C . $\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$	58
Figura 24	– Diagrama de níveis de energia para os bicromóforos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b). EF= Estado eletrônico fundamental.....	60
Figura 25	– Decaimento de luminescência dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução deareada de acetonitrila. $T = 298 \text{ K}$	61
Figura 26	– Voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa contendo NaTFA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3,5$, contendo o complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$	62
Figura 27	– Voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo em solução de PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (topo) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (abaixo).....	63
Figura 28	– Espectro de fluorescência relativo ao consumo de DPBF em etanol sob irradiação com LED azul na presença de $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (b) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$	65
Figura 29	– Curva cinética do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul).....	66
Figura 30	– Espectro de absorção dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) na presença de diferentes quantidades de CT DNA	68
Figura 31	– Espectro de fluorescência de EB ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) na presença de DNA a diferentes concentrações de complexos ($0\text{-}14 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).....	70

Figura 32	– Luminescência resolvida no tempo dos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) na presença de DNA em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4.....	72
Figura 33	– Intensidade integrada de emissão dos complexos na presença de CT DNA a diferentes concentrações de NaI e KCl. $[\text{Ru}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{CT DNA}] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$	74
Figura 34	– Espectro de emissão do Hoechst na presença de CT DNA a diferentes concentrações de complexos ($0\text{-}4\mu\text{mol L}^{-1}$).....	76
Figura 35	– Espectro de emissão do <i>methyl green</i> na presença de CT DNA a diferentes concentrações de complexos ($0\text{-}3\mu\text{mol L}^{-1}$).....	78
Figura 36	– Espectros de emissão dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a),(c),(e),(g) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b),(d),(f),(h) na presença de diferentes oligonucleotídeos em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , H 7,4. $[\text{Ru}] = 0\text{-}13 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{DNA}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base.....	79
Figura 37	– (a) Intensidade integrada dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ na presença de diferentes oligonucleotídeos.....	81
Figura 38	– Curvas de titulação para os oligonucleotídeos ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos, em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4.....	83
Figura 39	– Espectro de dicroísmo circular da titulação de HT21 pela adição do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 à 25°C. $[\text{HT21}] = 2 \mu\text{mol L}^{-1}$	85
Figura 40	– Fotoclivagem do pBR322 na presença do $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ após 60 min de irradiação sob irradiação de diferentes comprimentos de onda...	87
Figura 41	– Fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base) na presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em diferentes concentrações no escuro e após 60 min de irradiação em diferentes LED's.....	88
Figura 42	– Fotodegradação de pBR322 promovida pelos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, monitorado por fluorescência durante 40 minutos de irradiação no azul ($\lambda_{\text{irr}}=463\text{nm}$).....	90

Figura 43	– Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (ambos a 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e detectores de ROS após 60 min de irradiação no azul.....	92
Figura 44	– Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em pastilha de KBr.....	97
Figura 45	– Espectro de ressonância magnética de ^1H do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetona deuterada (a), <i>inset</i> : sinal dos hidrogênios do grupo metila; e (b) espectro de RMN de ^1H bidimensional COSY.....	98
Figura 46	– Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetonitrila na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	101
Figura 47	– Espectro eletrônico calculado do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ TD-DFT com B3LYP.....	102
Figura 48	– Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ calculados por TD-DFT (hidrogênios omitidos para maior clareza da estrutura).....	103
Figura 49	– Espectro de emissão em diferentes energias de excitação do complexos $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetonitrila, na concentração de $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C	106
Figura 50	– Voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo em solução de PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$	107
Figura 51	– Espectro de fluorescência relativo ao consumo de DPBF em etanol sob irradiação com LED azul na presença de $20 \mu\text{M}$ de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$	109
Figura 52	– Curva cinética do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul) para o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$	110
Figura 53	– Espectro de absorção do complexos $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ na presença de diferentes quantidades de CT DNA. <i>Inset</i> : gráfico de $(\epsilon_a - \epsilon_f) / (\epsilon_b - \epsilon_f)$ vs [DNA].....	111
Figura 54	– Espectro de fluorescência de EB ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) na presença de DNA com diferentes quantidades de complexos ($0\text{-}14 \mu\text{mol L}^{-1}$). $[\text{EB}] = 3 \mu\text{mol L}^{-1}$	113

Figura 55	– Espectro de emissão do Hoechst na presença de CT DNA a diferentes concentrações de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (0-15,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). $[\text{Hoechst}] = 3\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{CT DNA}] = 10 \mu\text{mol, L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$	114
Figura 56	– Espectros de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ na presença de (a) ss-DNA e (b) G4-DNA.....	115
Figura 57	– Intensidade de luminescência integrada do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ na presença de ssDNA e G4-DNA. Medidas realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 a 25°C.....	117
Figura 58	– Fotoclivagem do DNA pBR322 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$	118
Figura 59	– Correlação de geração de oxigênio singleto e constante de afinidade a DNA dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ e outros sistemas polipiridínicos.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Dados de infravermelho dos complexos sintetizados.....	44
Tabela 2	– Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e atribuições para os complexos [Ru(dppz)Naf] ²⁺ e [Ru(dppz)Ant] ²⁺	50
Tabela 3	– Dados de UV-Vis para os complexos [Ru(dppz)Naf] ²⁺ e [Ru(dppz)Ant] ²⁺ em acetonitrila.....	53
Tabela 4	– Transições calculadas de estado singlete para os complexos [Ru(dppz)Naf] ²⁺ e [Ru(dppz)Ant] ²⁺	54
Tabela 5	– Rendimento quântico de emissão dos complexos em diferentes solventes.....	59
Tabela 6	– Dados voltamétricos dos complexos [Ru(dppz)Naf] ²⁺ e [Ru(dppz)Ant] ²⁺	64
Tabela 7	– Valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) sob irradiação no azul ($\lambda_{exc} = 460$ nm).....	67
Tabela 8	– Constantes de dissociação para os complexos [Ru(dppz)Naf] ²⁺ e [Ru(dppz)Ant] ²⁺	84
Tabela 9	– Algumas energias dos orbitais de fronteira dos complexos.....	93
Tabela 10	– Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	94
Tabela 11	– Dados de infravermelho do complexo [Ru(Ant) ₃] ²⁺	97
Tabela 12	– Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e atribuições para o complexo [Ru(Ant) ₃] ²⁺	100
Tabela 13	– Transições calculadas do estado singlete para o complexo [Ru(Ant) ₃] ²⁺	102
Tabela 14	– Energia calculada dos orbitais moleculares do complexo [Ru(Ant) ₃] ²⁺	104
Tabela 15	– Dados espectroscópicos do complexo [Ru(Ant) ₃] ²⁺	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-naf	2-aminonaftaleno
ϵ	Coeficiente de absorvidade molar
δ	Deformação angular
ν	Estiramento ou deformação axial
Φ_{em}	Rendimento quântico de emissão
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{irr}	Comprimento de onda de irradiação
Abs	Absorbância
Ant	Grupo antracênico
bpy	2,2'-bipiridina
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
CT	<i>Calf Thymus</i> DNA
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA pBR322	DNA circular plasmidial
DPBF	Difenilbenzofurano
dppz	dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
ds-DNA	DNA de fita dupla
ds-mis-DNA	DNA de fita dupla não complementar
EB	Brometo de etídio
f	Força do oscilador
FI	DNA plasmidial super-enovelado em fita única
FII	DNA plasmidial clivado em fita única
G4-DNA	DNA G-quadruplex
HOMO	Orbital molecular ocupado de mais alta energia
IV	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho
isc	<i>Intersystem crossing</i> (cruzando entre sistemas)
k_{nr}	Constante de velocidade não radiativa

k_{ET}	Constante de velocidade de transferência de energia
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
mbpy-Ant	4' metil - <i>N</i> -(antracên-2-il) -[2,2'bipiridina]-4-carboxamida
mbpy-COOH	4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico
mbpy-Naf	4' metil – <i>N</i> - (naftalen-2-il)-[2,2'bipiridina]-4-carboxamida
MLCT	Banda de transferência metal-ligante
Naf	Grupo naftil
NaTFA	Trifluoroacetato de sódio
3O_2	Oxigênio molecular
1O_2	Oxigênio singleto
δ /ppm	Deslocamento químico em partes por milhão
phen	Fenantrolina
PTBA	Perclorato de tetrabutilamônio
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de próton
ROS	Espécies oxigenadas reativas
ss-DNA	DNA de fita única
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDA	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TD-DFT	Teoria de densidade funcional dependente do tempo
UV-Vis	Espectroscopia Eletrônica nas Regiões do Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Complexos polipiridínicos de rutênio (II): estrutura eletrônica e espectroscopia.....	17
1.1.1	<i>Complexos bicromóforos de rutênio (II).....</i>	20
1.1.2	<i>Complexos polipiridínicos de Ru (II) com ligante dipirido fenanzínico (dppz).....</i>	23
1.1.3	<i>Interação de complexos polipiridínicos de rutênio (II) com DNA.....</i>	24
1.2	Terapia fotodinâmica (TFD) e terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA).....	29
2	OBJETIVOS.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Reagentes e soluções.....	34
3.1.1	<i>Argônio.....</i>	34
3.1.2	<i>Solventes, reagentes e soluções.....</i>	34
3.2	Equipamentos e técnicas experimentais.....	34
3.2.1	<i>Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região do UV-visível.....</i>	34
3.2.2	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....</i>	35
3.2.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H.....</i>	35
3.2.4	<i>Medidas eletroquímicas.....</i>	35
3.2.5	<i>Espectroscopia de emissão.....</i>	35
3.2.5.1	<i>Rendimento quântico de emissão.....</i>	36
3.2.5.2	<i>Rendimento quântico de geração de ¹O₂.....</i>	36
3.3	Síntese dos compostos orgânicos.....	37
3.3.1	<i>Síntese do composto 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico (mbpy-COOH).....</i>	37
3.3.2	<i>Síntese do ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz).....</i>	37
3.3.3	<i>Síntese dos ligantes 4' metil -N- (naftalen-2-il)-[2,2'bipiridina]-4-carboxamida (mbpy-Naf) e 4' metil -N-(antracen-2-il) -[2,2'bipiridina]-4-carboxamida (mbpy-Ant).....</i>	37
3.4	Síntese dos complexos.....	38
3.4.1	<i>Síntese do complexo cis-Ru(bpy)(dppz)Cl₂.....</i>	38

3.4.2	<i>Síntese dos complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺, [Ru(dppz)Ant]²⁺ e [Ru(Ant)₃]²⁺.....</i>	38
3.5	Estudos de interação e fotoclivagem com DNA.....	38
3.6	Atividade antibacteriana.....	40
3.6.1	<i>Microorganismos e condições de cultura.....</i>	40
3.6.2	<i>Ensaio antibacteriano.....</i>	40
3.7	Estudo computacional.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Sistematis-heteroléptico [Ru(dppz)L]²⁺.....	42
4.1.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....</i>	42
4.1.2	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H.....</i>	44
4.1.3	<i>Espectroscopia de absorção eletrônica.....</i>	51
4.1.4	<i>Espectroscopia de emissão.....</i>	57
4.1.5	<i>Medidas eletroquímicas.....</i>	62
4.1.6	<i>Geração de oxigênio singlete.....</i>	64
4.2	Estudo de interação com DNA.....	67
4.2.1	<i>Constante de ligação (K_b) DNA-Complexo.....</i>	67
4.2.2	<i>Competição com brometo de etídio (EB).....</i>	69
4.2.3	<i>Tempo de vida do estado excitado com DNA.....</i>	71
4.2.4	<i>Estudo de interação por sulcos.....</i>	73
4.2.5	<i>Estudo com G-quadruplex e oligonucleotídeos.....</i>	79
4.2.6	<i>Estudo de fotoclivagem de DNA.....</i>	87
4.3	Atividade antibacteriana.....	93
4.4	Complexo tris-homoléptico [Ru(Ant)₃]²⁺.....	96
4.4.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....</i>	96
4.4.2	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H.....</i>	98
4.4.3	<i>Espectroscopia de absorção eletrônica.....</i>	101
4.4.4	<i>Espectroscopia de emissão.....</i>	105
4.4.5	<i>Medidas eletroquímicas.....</i>	107
4.4.6	<i>Geração de oxigênio singlete.....</i>	108
4.4.7	Estudo de interação com DNA.....	111
4.4.7.1	<i>Constante de ligação (K_b) DNA-Complexo.....</i>	111
4.4.7.2	<i>Competição com brometo de etídio (EB).....</i>	112
4.4.7.3	<i>Estudo de interação por sulcos.....</i>	114

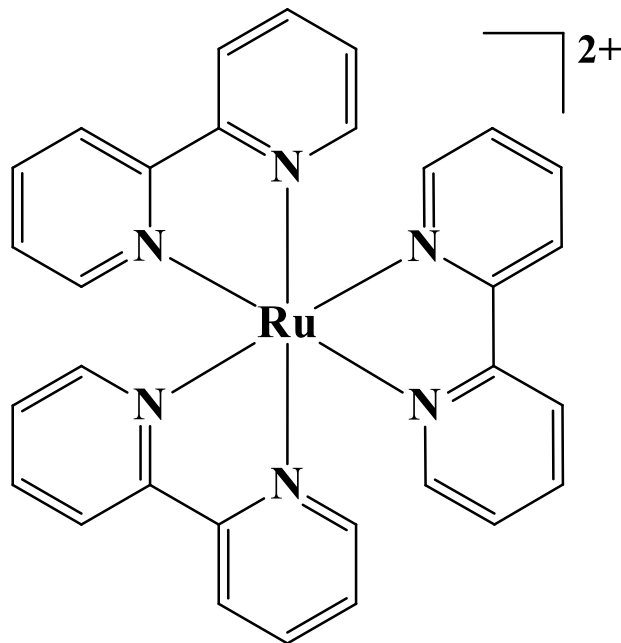
4.4.7.4	<i>Estudo com G-quadruplex.....</i>	115
4.4.7.5	<i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	117
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	120
	REFERÊNCIAS.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Complexos polipiridínicos de rutênio (II): estrutura eletrônica e espectroscopia

Os compostos polipiridínicos de rutênio (II) apresentam um papel central no desenvolvimento da fotofísica e fotoquímica inorgânica, sustentando pelas últimas décadas a pesquisa baseada em metais de transição em fotosensibilização e transferência de elétrons fotoinduzida. O primeiro protótipo de uma classe inovadora de moléculas foi o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipiridina) (Figura 1). Ele foi reportado pela primeira vez em 1936 e suas propriedades luminescentes observadas apenas em 1959¹. Nas décadas que se sucederam, suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e redox desse composto e seus derivados foram extensivamente exploradas. Um dos artigos de revisão mais completos acerca deste complexo e seus derivados foi publicado por Balzani e colaboradores². O estudo apresenta primeiras considerações teóricas em termos de estrutura eletrônica, bem como os interessantes perfis espectroscópicos do complexo e dezenas de compostos derivados.

Figura 1 – Estrutura molecular do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

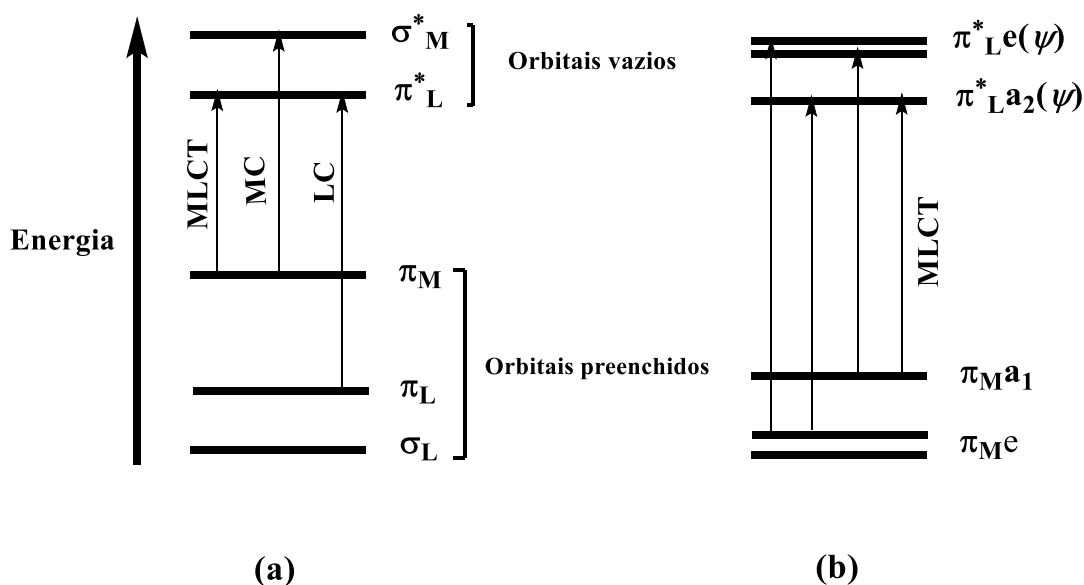


Fonte: Elaborada pelo autor.

A ligação química entre Ru(II) e os ligantes polipiridínicos é caracterizada pela presença de orbitais moleculares pertencentes a um sistema d^6 (baixo spin) e orbitais σ e π do

ligante. Os orbitais sigmas doadores do ligante (σ_L) localizam-se nos átomos de nitrogênio, enquanto que os orbitais moleculares π doadores (π_L) e receptores (π_L^*) estão deslocalizados sobre os anéis aromáticos. Os orbitais d do metal também contribuem para a formação dos orbitais moleculares π_M e σ_M^* . A estabilidade da ligação Ru-bpy é alta, fato refletido na baixa labilidade do ligante e alto potencial de oxidação do metal. Tal efeito é alcançado através retrodoação eletrônica (π *backbonding*)²: o metal recebe densidade eletrônica do orbital sigma e a devolve para os orbitais π antiligantes vazios do anel piridínico. Essa estabilidade é reforçada pelas interações de sobreposição dos orbitais π do ligante com os orbitais d do metal. O diagrama de orbital molecular simplificado para o complexo numa simetria octaédrica é apresentado na Figura 2 (a). A transição de um elétron dos orbitais de caráter d do metal para os orbitais dos ligantes ($p\pi_L^* \leftarrow d\pi_M$) gera uma transição de transferência de carga metal-ligante (MLCT). Quando a transição é confinada entre os orbitais do metal ($d\sigma_L^* \leftarrow d\pi_M$), a transição é do tipo centrada no metal (MC). Transições entre os orbitais dos ligantes (LC) ocorrem quando um elétron é transferido para os orbitais antiligantes vazios nos aromáticos, ($p\pi_L^* \leftarrow p\pi_L$).

Figura 2 – Diagrama de orbital molecular simplificado do complexo polipiridínico de Ru(II) em micro simetria octaédrica mostrando os três tipos de transições eletrônicas ocorrendo a baixas energias (a). Representação detalhada das transições do tipo MLCT na simetria D_3 (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 2b ilustra os orbitais de fronteira do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ considerando, a simetria D_3 da molécula. Segundo a notação de Orgel², os orbitais π^* podem ser simétricos (χ) ou assimétricos (ψ) com relação ao eixo de rotação C_2 de cada unidade de $\text{Ru}(\text{bpy})$. Os orbitais moleculares ocupados de maior energia (HOMO) são $\pi_{\text{MA}1}$ e π_{ME} , onde estão predominantemente localizados no metal; os orbitais desocupados de menor energia (LUMO) são $\pi^*_{\text{LA}2}$ e π^*_{L} e distribuídos principalmente sobre os ligantes. O estado fundamental do complexo é um singleto, oriundo da configuração eletrônica $\pi_{\text{ME}}^4\pi_{\text{MA}1}^2$. Quando uma molécula desse complexo absorve um fóton, um estado excitado do tipo transferência de carga metal-ligante $^1\text{MLCT}$ (tempo de vida de 40 ± 15 fs)³ é populado. A presença do metal causa a mistura dos estados singleto e tripleto via intercruzamento de sistemas dentro de 75 fs⁴ (Figura 3), permitindo o surgimento do estado $^3\text{MLCT}$. Esse estado excitado é responsável pela emissão da luminescência e reações bimoleculares do estado excitado para a maioria dos complexos polipiridínicos de $\text{Ru}(\text{II})$. A Figura 3 é uma representação do diagrama de Jablonski para complexos polipiridínicos de rutênio(II)¹. A equação 1 descreve esse estado, quando um elétron é promovido de um orbital do Ru para o orbital π^* da bipyridina.

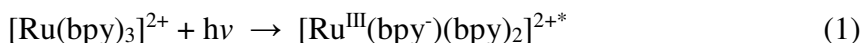
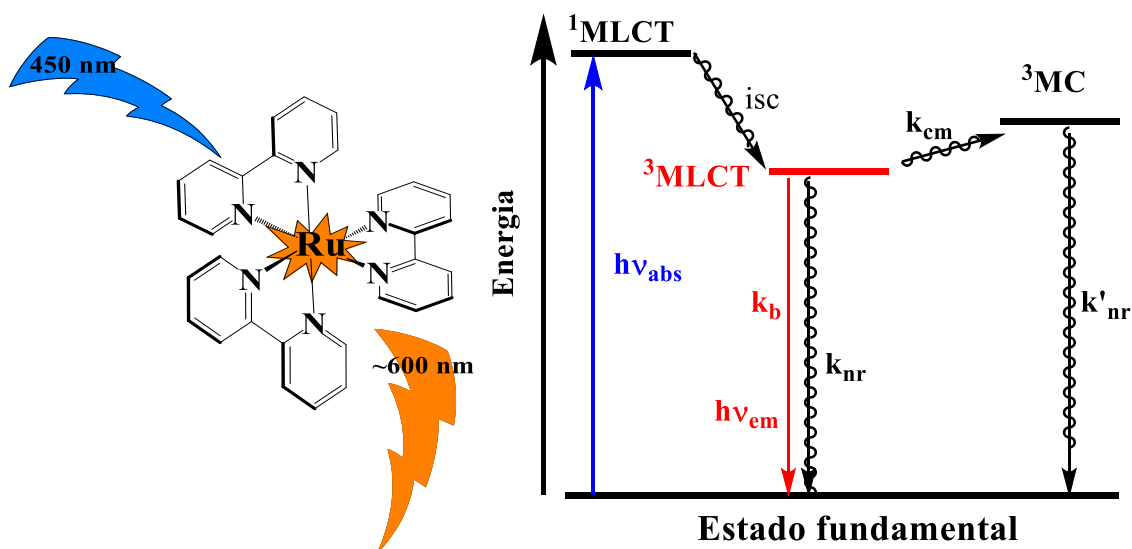


Figura 3 – Diagrama de Jablonski do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que o estado $^3\text{MLCT}$ é populado, ocorre competição de alguns processos de desativação. Quando o estado excitado é desativado pela emissão de um fóton, podemos descrever esse processo pela sua constante de desativação radiativa (k_r). Se essa mudança ocorre

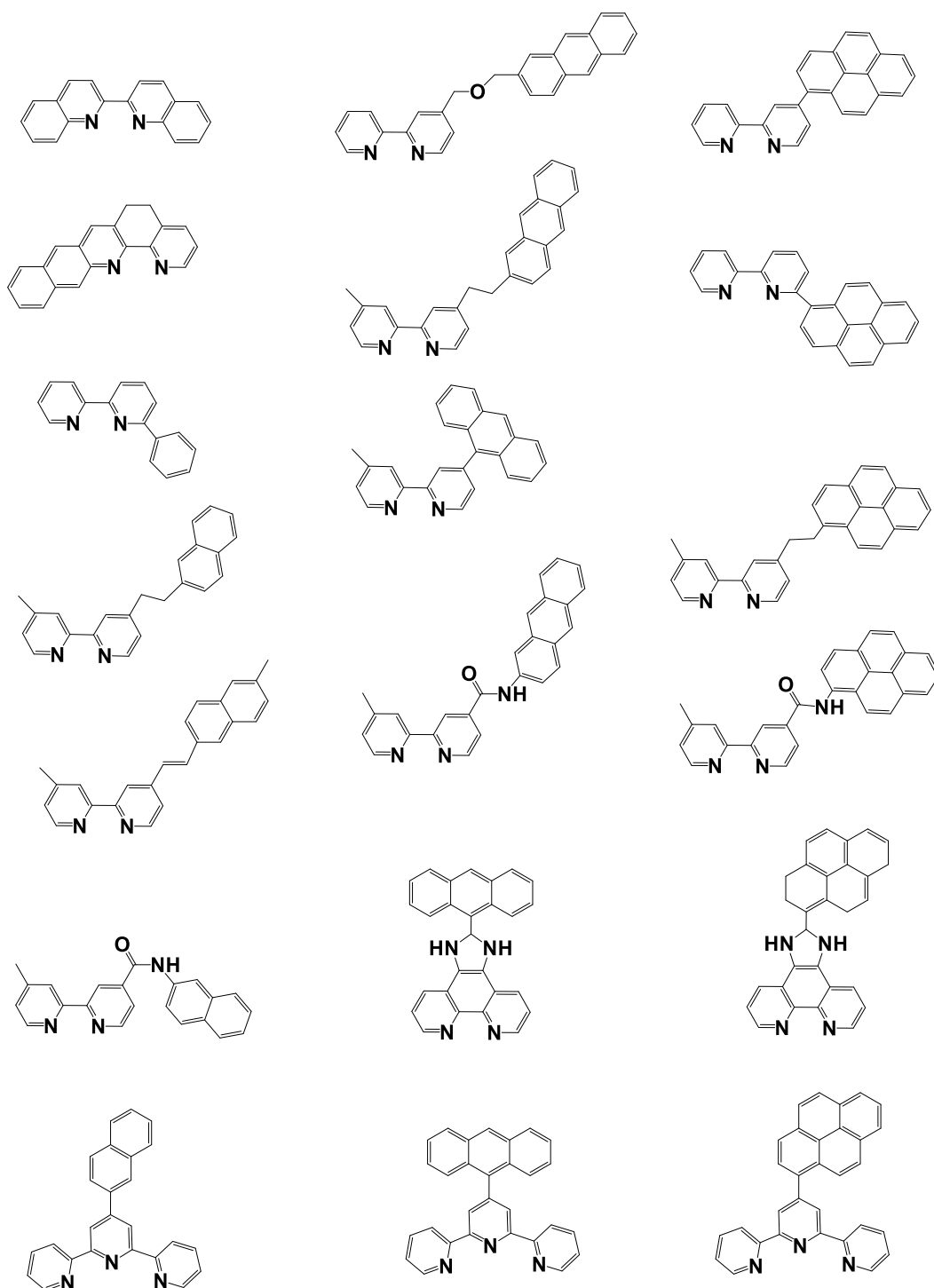
via relaxamento vibracional/rotacional, devemos considerar a constante de desativação não-radiativa (k_{nr})^{1,2}. Um terceiro processo, cuja ativação se dá por ativação térmica (k_{cm}), conduz a um estado tripleto centrado no metal 3MC . A população desse estado diminui a ordem de ligação metal-ligante e causa a perda do ligante da esfera de coordenação^{1,2}. O predomínio de um caminho de desativação em detrimento de outro, dependerá da magnitude da constante de desativação.

1.1.1 Complexos bicromóforos de rutênio (II)

As propriedades espectroscópicas do complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ podem ser moduladas pela funcionalização de um, dois ou até mesmo os três ligantes bipyridínicos. As possibilidades de funcionalização podem ser vastas, indo de grupos retiradores/doadores de elétrons a fusão de anéis aromáticos adicionais^{2,5-8}.

Uma abordagem de funcionalização é modificar remotamente um dos ligantes bipyridínicos com anéis aromáticos, a fim de examinar a dinâmica de relaxação do estado excitado. É possível encontrar na literatura (Figura 4) ligantes polipiridínicos funcionalizados com cromóforos de diferentes extensões aromáticas^{2,6-11}. Quando esses ligantes são coordenados ao centro metálico de Ru(II) formam complexos conhecidos como bicromóforos^{6,8}. Nesse caso, o núcleo $Ru(bpy)_3$ está ligado covalentemente a um segundo cromóforo em uma das bipyridinas⁶. Nesses sistemas, a escolha do cromóforo dita a dinâmica dos processos de transferência de energia e elétron entre o centro metálico e sistema aromático.

Figura 4 – Alguns ligantes polipiridínicos com cromóforos encontrados na literatura [Referencias de 2,6-11].

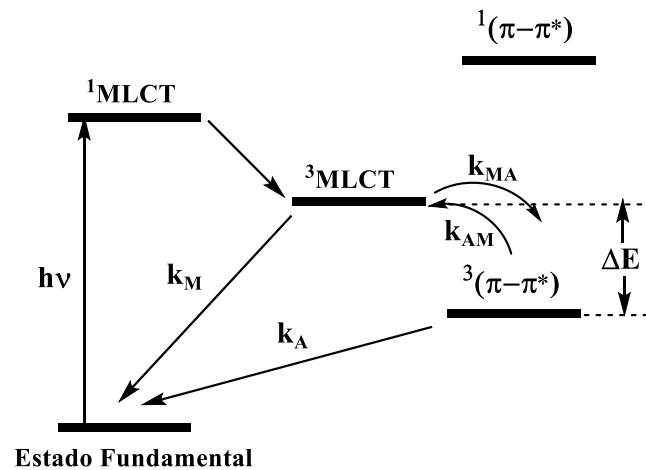


Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando a molécula é excitada em um comprimento de onda específico (~450nm), o estado $^3\text{MLCT}$ é rapidamente atingido. O excesso de energia do estado $^3\text{MLCT}$, originado no núcleo $\text{Ru}(\text{bpy})_3$, pode ser dissipado para estado $^3(\pi-\pi^*)$ do sistema aromático, como mostrado

no diagrama de Jablonski ⁶ para bicromóforos de estados ³MLCT e ³($\pi-\pi^*$) próximos em energia (Figura 5).

Figura 5 – Diagrama de Jablonski para sistemas bicromóforos.



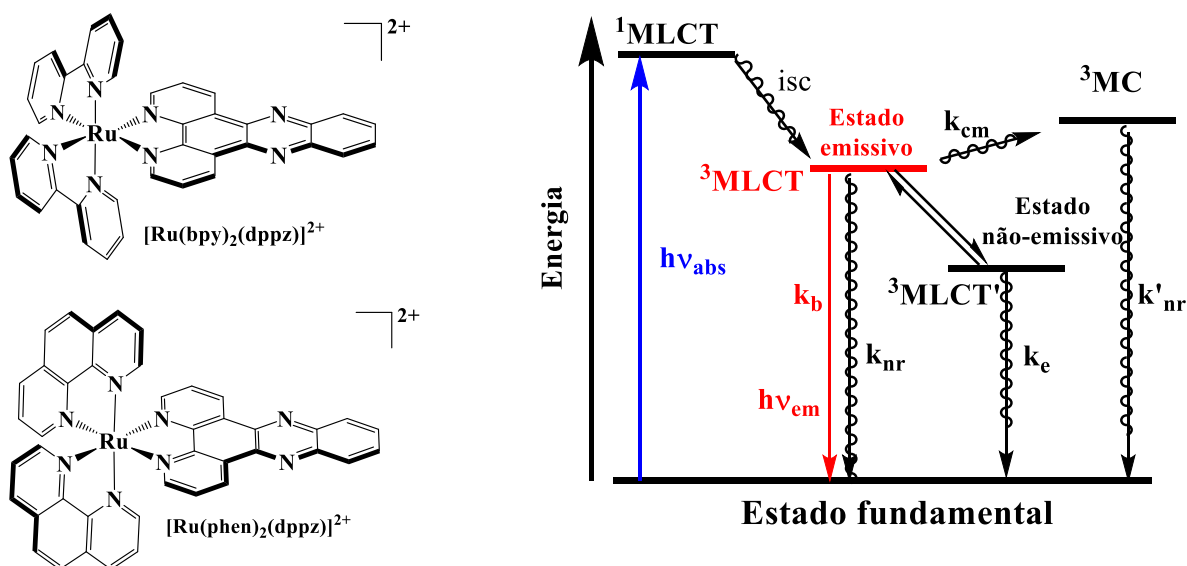
Fonte: Adaptado de WANG, X.; DEL GUERZO, A.; SCHMEHL, R. H. (6).

A dinâmica dos processos de transferência de energia intramolecular em sistemas possuindo estados tripleto é ditada pela magnitude das constantes de relaxação dos processos radiativos e não radiativos: a constante de relaxação de emissão originada no metal (k_M) e aquela com caráter do cromóforo aromático (k_A), bem como as taxas de transferência de energia reversível do estado ³MLCT para ³($\pi-\pi^*$), k_{MA} , e o processo inverso, k_{AM} . Se $k_{MA} \gg k_M$ e $k_{AM} \gg k_A$, os dois estados estarão em equilíbrio e a tendência é elevar o tempo de vida do estado ³MLCT. Outro fator importante é a diferença de energia (ΔE) entre os estados ³MLCT e ³($\pi-\pi^*$), que será influenciada pela natureza do cromóforo^{6,8}. Por exemplo, se o cromóforo naftaleno está presente, o estado ³($\pi-\pi^*$) encontra-se energeticamente acima do estado ³MLCT ($\sim 4900 \text{ cm}^{-1}$); por outro lado, se for o cromóforo aromático antraceno, o estado ³($\pi-\pi^*$) é inferior em energia, cerca de 1460 cm^{-1} ; e para o caso estado do pireno, o ³($\pi-\pi^*$) tem uma condição isoenergética com o ³MLCT. Portanto, a inserção de cromóforos aromáticos com diferentes extensões, altera a dinâmica de relaxação dos estados excitados de diferentes naturezas em um sistema bicromóforo de rutênio (II). Além de adicionar uma dimensão seletiva quanto à energia de excitação em moléculas dessa classe, a sua utilização na fotocatalise, dispositivos eletrônicos e terapia fotodinâmica podem ser promissoras.

1.1.2 Complexos polipiridínicos de Ru (II) com ligante dipirido fenazínico (dppz)

Os primeiros estudos de luminescência de complexos de rutênio (II) possuindo ligantes com anéis fenazínicos fundidos com aromáticos foram realizados por Bartone e colaboradores¹²⁻¹⁵. Um dos exemplos mais proeminentes são os complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, onde phen e dppz são 1,10-fenantrolina e dppz é dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, respectivamente. O diagrama fotofísico do $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Figura 3) não se aplica a esse sistema, e só pode ser racionalizado pelo chamado efeito ‘light-switch’^{1,16}. A observação primeiramente explorada foi uma banda de emissão (~610 nm) somente em solventes orgânicos (switch on) e total ausência de luminescência em água. A princípio, esse efeito ‘light switch off’ foi atribuído a supressão induzida por transferência de próton, reduzindo, portanto, o rendimento quântico de emissão^{14,15}. Em 1997 Barbara e colaboradores¹⁷ propuseram que o mecanismo ‘light-switch’ (Figura 6) é governado por um segundo estado $^3\text{MLCT}$ ($^3\text{MLCT}'$) cuja sua estabilidade energética é altamente sensível ao ambiente, especialmente o solvente.

Figura 6 – Estruturas e diagrama de Jablonski para os processos fotofísicos dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$.



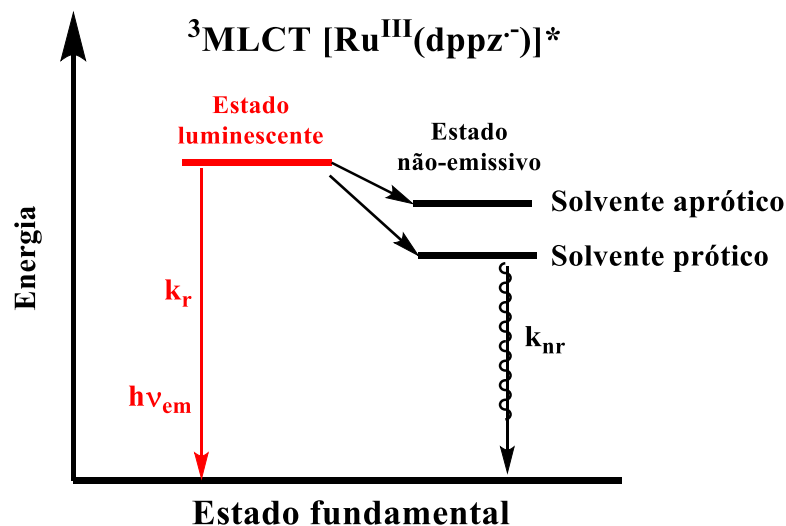
Fonte: O autor

Portanto, o modelo atual que descreve a fotofísica desse sistema é constituído por: um estado ^3MC de maior energia que os estados $^3\text{MLCT}$ e $^3\text{MLCT}'$; um estado luminescente $^3\text{MLCT}$ (estado emissivo) correspondendo a transferência eletrônica do centro metálico para a porção fenantrolina do ligante dppz e um estado não-emissivo ($^3\text{MLCT}'$), de

menor energia, inerente a porção fenazina do ligante dppz². Esse modelo possibilita compreender que o estado luminescente (³MLCT) e não-luminescente (³MLCT') estão em um equilíbrio dinâmico e a população de um estado ou outro dependerá das moléculas da vizinhança.

Em solventes próticos (Figura 7), tal como a água, o estado não-emissivo é estabilizado por ligações de hidrogênio. Logo, esse estado será menor em energia e mais populado (via transferência de energia) do que o estado emissivo à temperatura ambiente, causando a perda da emissão. Entretanto, quando a molécula se encontra em um ambiente aprótico (solventes orgânicos), a energia do ³MLCT' é maior do que em solvente próticos, permitindo o acesso do estado ³MLCT à temperatura ambiente.

Figura 7 – Efeito do solvente nos estados não-emissivo e emissivo.



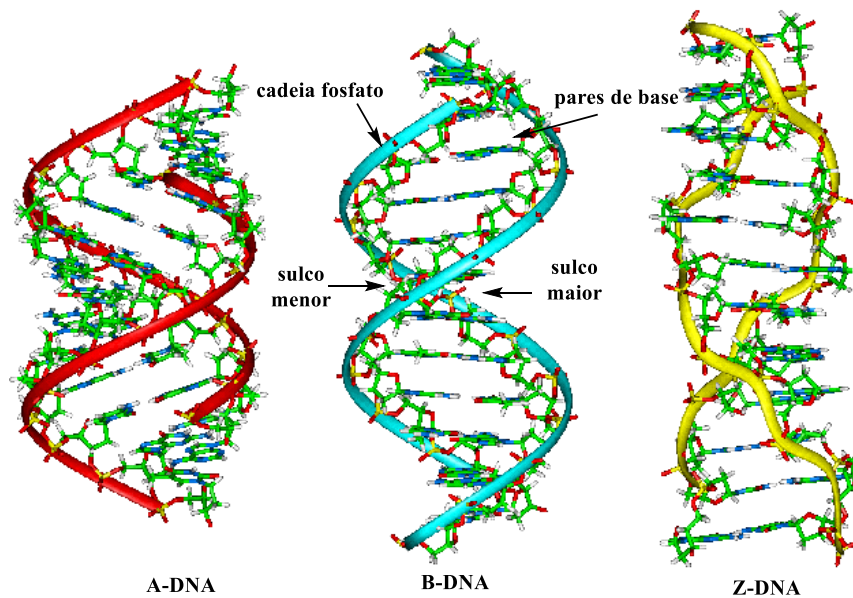
Fonte: Elaborada pelo autor.

1.1.3 Interação de complexos polipiridínicos de rutênio (II) com DNA

A macromolécula responsável pelo armazenamento da informação necessária para reprodução e sustentação da vida é o ácido desoxirribonucleico ou DNA (do inglês *Deoxyribonucleic acid*). Os processos de transcrição e replicação celular são dependentes do DNA. A informação genética é armazenada em bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Essas sequências são estruturadas por um esqueleto aniônico constituído de fosfodiéster e desoxirribose. A estrutura helicoidal gerada apresenta regiões de sulco maior e menor. A complexidade da estrutura é claramente expressa nas diferentes

disposições do açúcar na cadeia, possibilitando diversificação estereoquímica da macromolécula, gerando as formas A, B e Z-DNA^{12,13,18}. Nas formas A e B a hélice gira para direita e na Z para a esquerda (Figura 8). Nos organismos vivos e em solução o DNA assume a conformação B. No caso de pouca água para interagir com a hélice, a forma A é predominante. Fatores do meio, tal como alta concentração salina, pode levar para a conformação Z¹⁸.

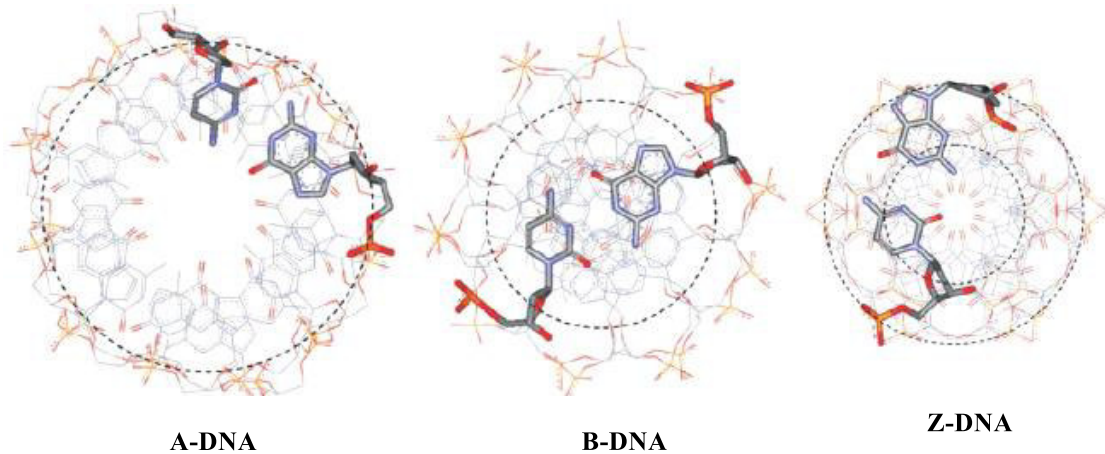
Figura 8 – Diferentes conformações de DNA.



Fonte: Adaptado de commons.wikimedia.org acessado em 20/05/17.

A perspectiva axial das estruturas (Figura 9) torna evidente a disposição das bases nitrogenadas em cada estrutura. As bases ficam mais afastadas do eixo central na forma A e centradas próximo ao eixo na B. Na forma Z ocorre uma alternância entre as bases púricas e pirimídicas posicionadas na parte externa e interna da hélice, respectivamente¹⁸.

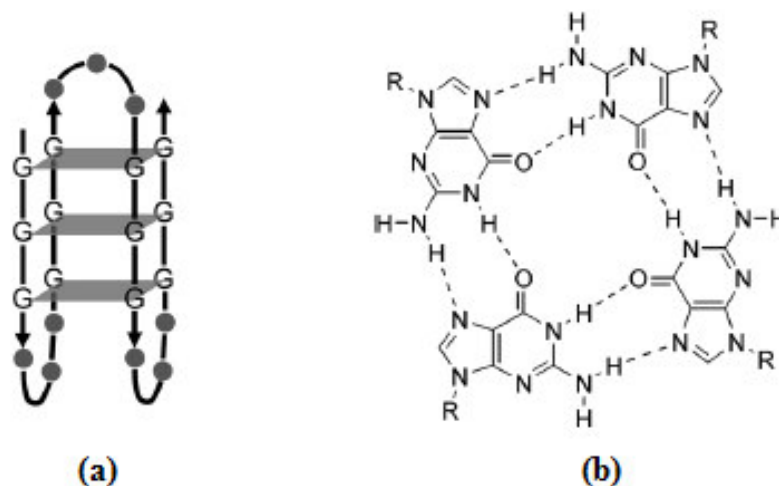
Figura 9 – Vista axial das diferentes conformações de DNA.



Fonte: Adaptado de FUERTES, M.; CEPEDA, V.; ALONSO, C.; PÉREZ, J.M. (18)

Outras estruturas de DNA também podem ser encontradas em seres vivos. Podemos incluir o G-quadruplex como um relevante representante não-canônico dos muitos arranjos de ácidos nucleicos¹⁹⁻²⁴. Essas estruturas possuem sequencias ricas em guanina (uma ou mais fitas de DNA, ssDNA) com alta tendência de formar tetrâmeros. Entidades químicas carregadas positivamente, como alguns cátions metálicos (K^+ , Na^+ , por exemplo) ou cátions de complexos metálicos, induzem a formação de arranjos fechados de quatro guaninas conectadas por pontes de hidrogênio do tipo Hoogsteen (Figura 10).

Figura 10 – Representação da estrutura de G-quadruplex (a) e um tetrâmero de guanina unido por pontes de Hoogsteen (b).



Fonte: Adaptado de AMATO, J.; IACCARINO, N.; RANDAZZO, A., NOVELLINO, E. (19)

O genoma humano contém mais de 30000 sequências propensas a formar estruturas G-quadruplexes¹⁹. É na região terminal dos cromossomos, os telomêros, onde se encontra com maior abundância essas estruturas, implicando numa variedade de funções genômicas. Os telomêros são essenciais para a proteção e replicação do cromossomo, estando diretamente envolvidos na regulação de divisão celular, incluindo envelhecimento e câncer¹⁹⁻²¹. A manutenção do DNA telomérico ocorre por um modo único de replicação promovido pela enzima telomerase. Essa enzima mantém a integridade do DNA telomérico e previne o encurtamento do telomêro à medida que o processo de divisão celular avança²⁰. Além disso, a presença dessa enzima está correlacionada com a rápida e anormal divisão celular de células cancerígenas; em 85% das células tumorais, essa enzima é expressada em altos níveis de concentração¹⁹⁻²¹. Tem sido mostrado em estudos *in vitro* que a formação de G-quadruplexes pelo DNA telomérico inibe a atividade da telomerase. A associação entre G-quadruplex e câncer tem atraído um número elevado de pesquisadores para investigar novas estratégias para interferir na manutenção telomérica, como a busca por moléculas que estabilizem efetivamente estruturas do tipo G-quadruplex para inibir a divisão celular.

Explorar a interação de moléculas artificiais com ácidos nucleicos pode nos mostrar novas formas de impedir o crescimento de um tumor cancerígeno^{12,13,18}. Há poucas décadas o interesse voltou-se intensamente para complexos metálicos como moléculas capazes de alterar a maquinaria celular de uma célula cancerígena, abrindo caminho para esses compostos como promissores agentes anticâncer.^{12,13,18}

Visto a diversidade na complexidade estrutural do DNA e sua natureza polimórfica, as diferentes interações intermoleculares incluem¹³:

- a) ligação covalente irreversível: ocorre pela saída (geralmente dependente de hidrólise) de um ou mais ligantes da esfera de coordenação do complexo e a consequente formação de uma ligação covalente com as bases nitrogenadas do DNA, formando assim um aduto covalente. A cisplatina é o complexo mais conhecido que se liga covalentemente a DNA, em sua ação terapêutica contra câncer;
- b) interação por sulco maior / menor: ocorre por meio da atração eletrostática de complexos (geralmente carregado positivamente) e os sulcos da cadeia fosfato de carga negativa. Essa interação é dependente do tipo de sequência de DNA bem como da forma tridimensional do complexo.

c) intercalação: por definição, é a inserção (reversível) de uma molécula policíclica aromática (rígida e plana) entre dois pares de base adjacentes do DNA. Essa associação ocorre por interação π *stacking*. Alguns intercalantes orgânicos comuns incluem fenantrolinas, fenantridinas, acridinas, antraquinonas, antraceno, brometo de etídio e elipticinas.¹⁰

Compostos de coordenação ampliam consideravelmente as possibilidades de interação com DNA, especialmente se comparados a compostos orgânicos. Um dos pontos de maior destaque é a versatilidade estrutural dos complexos metálicos e sua relativa facilidade em modular sua reatividade e forma tridimensional pela mudança/funcionalização do ligante. Tais características podem ser extremamente úteis tanto na ação terapêutica, quanto na aplicação como sonda para o reconhecimento de diferentes tipos de DNA^{12,13,18}. Além disso, a presença do centro metálico incorpora à molécula ricas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e eletroquímicas, ampliando a capacidade em monitorar alterações estruturais e químicas do DNA.

Recentemente, os efeitos terapêuticos e biológicos de compostos de rutênio (II) e (III) têm sido alvos de interesse por muitos pesquisadores, especialmente devido as suas estruturas versáteis, estáveis, rígidas e bem caracterizadas^{12,13}. O complexo NAMI-A (imidazol *trans*-[tetracloro(imidazol)(dimetilsulfóxido) rutenato(III)] e KP1019 (indazolium *trans*-[tetraclorbis(1*H*-indazol)rutenato(III)]¹³ foram os primeiros compostos a serem utilizados em testes clínicos no combate ao câncer.

Alguns complexos polipiridínicos de rutênio (II) são considerados como eficientes intercaladores de DNA, apresentando interessantes propriedades espectroscópicas e relativa baixa toxicidade^{12,13,16}. Os complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ são os pioneiros da classe *light-switching* para DNA. A intensidade e orientação da intercalação entre complexo-DNA, bem como a natureza da sequência de nucleotídeos, foram exploradas por inúmeras técnicas espectroscópicas^{13,25-28}. Como já citado, esses complexos não são luminescentes em solução aquosa, contudo, quando intercalam com DNA e alguns tipos específicos de sequências (G-quadruplex, CC e CA *mismatches*, *ssDNA* e RNA) exibem emissão.

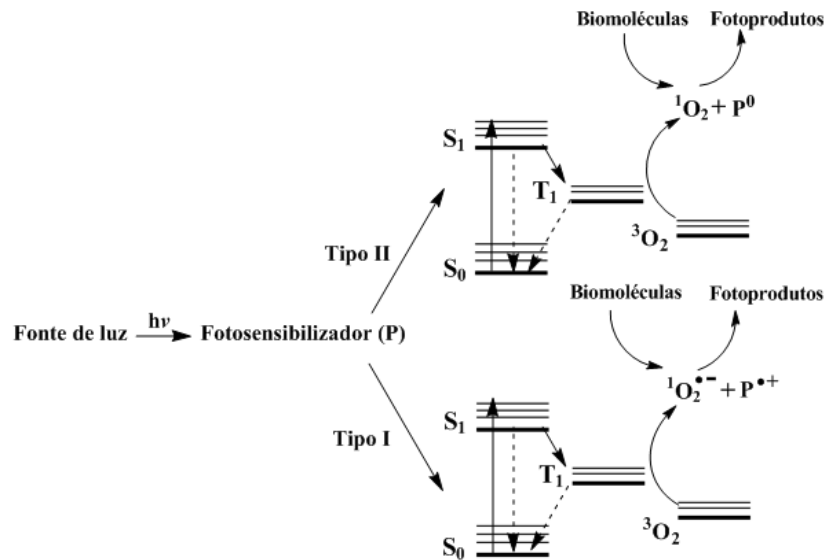
Essencialmente, dois fatores podem alterar profundamente o modo e a força de ligação desses complexos com DNA^{12,13,22}: (i) a escolha do ligante intercalante (dppz) e (ii) ligante auxiliar, bpy ou phen, incluindo a funcionalização dos mesmos. Muitos estudos foram reportados abordando a funcionalização do dppz com grupos retiradores/ doadores de elétrons, bem como a inserção de anéis aromáticos no ligante ou mesmo a adição de heteroátomos¹.

Embora a modificação do intercalador ocasione mudanças nas propriedades redox e no estado fundamental e excitado, a funcionalização do ligante auxiliar (bpy ou phen) pode expressivamente influenciar no modo como o complexo interage com o DNA, incluindo a especificidade a uma determinada sequência de ácido nucleico^{12,13,29-34}.

1.2 Terapia fotodinâmica (TFD) e terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA)

Luz visível pode ser utilizada para potencializar a ação de determinada droga no tratamento de tumores cancerígenos. Esse método confere uma importante seletividade espacial e temporal no combate à doença¹⁶. Uma molécula ideal para esse tipo de tratamento deve absorver luz na chamada janela terapêutica que está entre 600-900 nm. Essa faixa de comprimento de onda possibilita a efetiva absorção de luz pelos tecidos do corpo humano. Sensibilizadores comumente usados são porfirinas, cuja irradiação em determinados comprimento de onda leva a conversão fotoquímica do oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) a oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)³⁵, uma espécie altamente reativa com alta seletividade e localização. Além de ocasionar apoptose e necrose celular, o oxigênio singleto pode danificar macromoléculas celulares tal proteínas, lipídios e DNA³⁵. A Figura 11 ilustra os fenômenos envolvidos na geração de espécies radicalares oxigenadas, ROS (do inglês *reactive oxygen species*), mediante a irradiação de luz. Basicamente, o sensibilizador absorve um fóton de luz no estado fundamental sendo excitado para um estado singleto de curto tempo de vida. Em seguida, pode ocorrer cruzamento intersistema e o estado de longa vida tripleto pode ser acessado. Neste estado, o sensibilizador interage (geralmente de longo tempo de vida, entre ms e μs) com o substrato (S) produzindo um radical ou um íon radical do sensibilizador (P) e do substrato, esse tipo de sensibilizador é do tipo I. No caso do mecanismo do tipo II, a molécula também transfere energia do estado excitado tripleto para o estado fundamental do oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), produzindo $^1\text{O}_2$, que por sua vez, pode reagir com substratos para produzir espécies oxidadas^{16,35}. Há ainda um terceiro processo (Tipo III), o qual ocorre em um contexto estritamente celular. Nesse mecanismo, ocorre transferência de elétrons do estado excitado (T_1) diretamente para componentes celulares¹⁶.

Figura 11 – Processos físico-químicos relacionados à TFD.



Fonte: Adaptado de KNOLL, J. D.; TURRO, C. (16)

Fotossensibilizadores devem ser fotoestáveis e não sofrerem reações redox na presença do oxigênio singleto gerado *in situ*. Além disso, devem apresentar um caráter anfífilo para acumular-se tanto em tecidos quanto no meio fisiológico. Moléculas derivadas de porfirina, metaloporfirinas, hidrocarbonetos aromáticos (naftalenos, antraceno, bifenilas, quininas, pirroles, polipirroles, complexos metálicos (platina, cobre, ródio, rutênio) e até semicondutores são exemplos de agentes sensibilizadores³⁶. Em função do relativo tempo de vida longo do estado 3MLCT e larga faixa de absorção no visível, complexos polipiridínicos de rutênio (II) são visados em terapia fotodinâmica^{16,36}. A capacidade do estado 3MLCT durar tempo suficiente para gerar oxigênio singleto, aliada à sua natureza extremamente oxidante e/ou redutora, são atributos atrativos para um promissor candidato em TFD. O complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ foi estudado como agente sensibilizador e é conhecido por atuar através do mecanismo do tipo II, gerando oxigênio singleto com eficiência de $\phi=0,41$ em água, $\phi=0,87$ em metanol e 0,84 em etanol³⁷. Dada sua inabilidade de associar-se com DNA (praticamente por meio de fraca atração eletrostática), seu uso em TFD é limitado. Alguns estudos de fotoclivagem em DNA já foram feitos em complexos que possuem em sua estrutura dppz e seus análogos, devido à sua intrínseca propriedade de intercalação^{12,13,16}.

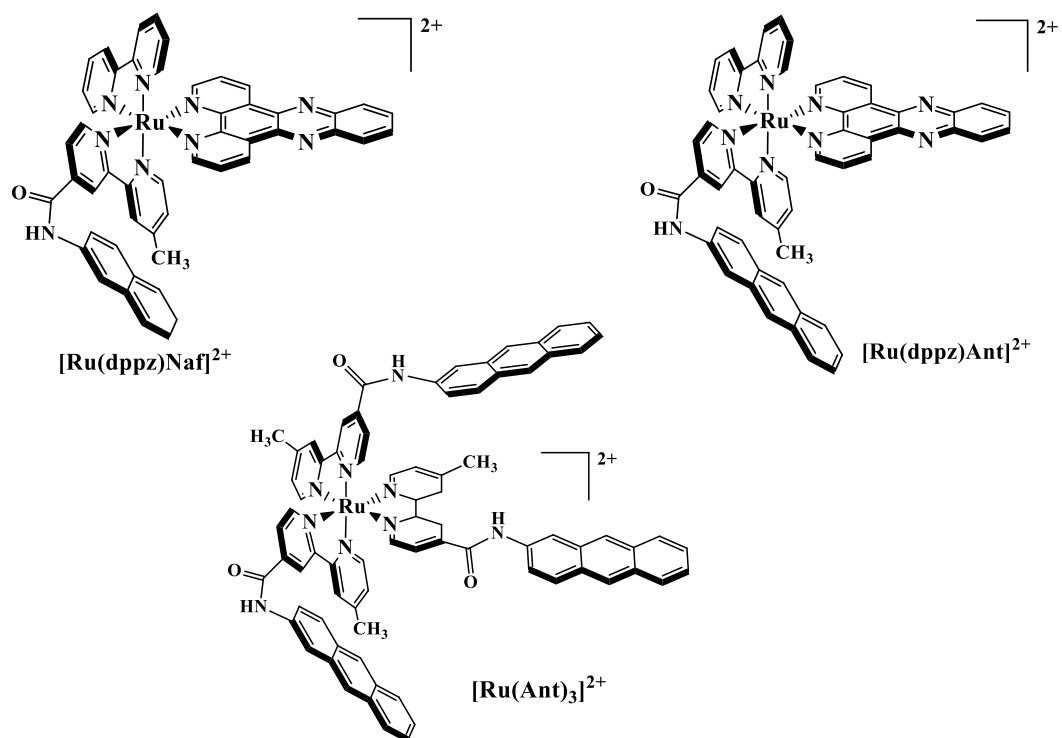
Complexos metálicos têm sido explorados como novas ferramentas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos³¹⁻⁴¹. Uma estratégia antimicrobiana promissora, também conhecida como terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), tem se

baseado na fotogeração de ROS, em que alguns complexos de rutênio têm sido utilizados⁴². A geração, induzida por luz, de espécies reativas pode causar severos danos a muitas biomoléculas (por exemplo, DNA) conduzindo à morte microbiana. Algumas séries de complexos de rutênio com atividade antibacteriana aumentada por irradiação de luz associada à geração de ROS tem sido relatada na literatura^{41,42}.

O uso de complexos polipiridínicos como agentes antimicrobianos foi limitado devido aos seus elevados valores de concentração inibitória mínima (MIC) em comparação com antibacterianos de uso clínico⁴¹⁻⁴². Contudo, o seu potencial uso contra bactérias resistentes a antibióticos ainda é promissor. Embora o modo de ação desses complexos ainda não seja compreendido, a ligação com DNA é normalmente considerada o principal mecanismo responsável pela atividade antimicrobiana^{41,42}. A funcionalização do ligante intercalante (dppz) e dos ligantes aromáticos (bpy ou phen), até a adição de outro centro metálico na molécula, pode melhorar a afinidade com as biomoléculas contidas nas células bacterianas e, conseqüentemente acentuar a atividade antibacteriana⁴¹.

Esse trabalho propõe-se em explorar as propriedades fotofísicas, fotoquímicas e redox de três complexos bicromóforos polipiridínicos de rutênio (II) (Figura 12). Em duas das três estruturas está presente o ligante intercalante de DNA, dppz, e um ligante auxiliar modificado com grupos naftil ou antracênil. O efeito da funcionalização destes ligantes pode ser importante no desempenho de geração de oxigênio singleto e atividade antibacteriana, bem como na seletividade dessas moléculas ante algumas sequencias de DNA e proteínas.

Figura 12 – Estruturas propostas dos complexos desse estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2 OBJETIVOS

Objetiva-se nesse estudo, verificar o potencial uso de três complexos polipiridínicos de rutênio (II) como agentes em TFD por meio da capacidade de gerarem oxigênio singlete em processos de fotoclivagem de DNA (por luz visível) e sua capacidade bactericida.

Tem-se como objetivos específicos:

- a) Sintetizar os complexos: tris-heterolépticos $[\text{Ru}(\text{dppz})(\text{L})]^{2+}$, sendo dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina e L é um ligante bipyridínico funcionalizado com os cromóforos orgânicos naftil (Naf) ou antracênil (Ant); e o complexo tris-homoléptico $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, sendo Ant o agrupamento antracênil;
- b) Caracterizar os bicromóforos por técnicas espectroscópicas de absorção eletrônica na região do UV-visível, infravermelho e técnicas de emissão (estacionária e resolvida no tempo), de ressonância magnética nuclear de ^1H e por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica) e TD-DFT;
- c) Determinar a magnitude das constantes de interação dos compostos com DNA por técnicas espectroscópicas (absorção e emissão na região do UV-visível), ensaios de fotoclivagem por eletroforese, bem como verificar a capacidade de geração de espécies radicalares oxigenadas sob irradiação, tal como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), bem como avaliar a viabilidade para potencial agentes bactericidas na presença das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosae* e *E. coli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

3.1.1 Argônio

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), mantidas a 60°C para conservação da ativação do catalisador.

3.1.2 Solventes, reagentes e soluções

Os solventes orgânicos etanol (Synth), metanol (Synth), acetona (Synth), N,N-dimetilformamida – DMF (Synth), foram utilizados nas etapas sintéticas com purificação prévia. Água deionizada foi utilizada nos procedimentos de síntese.

Os reagentes tricloreto de rutênio triidratado, 2-aminonaftaleno e 2-aminoatraceno de procedência Aldrich, foram utilizados sem qualquer purificação prévia. *Calf thymus* DNA (CT DNA) obtido da Sigma-Aldrich foi utilizado nos ensaios intercalação e o DNA plasmidal pBR 322 (Biolabs inc.) para a eletroforese em gel de agarose. As sequências oligoméricas HTG21 (GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) e sua correspondente sequência *mis-match* são de procedência comercial (IDT). As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se como eletrólito suporte uma solução 0,1 mol L⁻¹ de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) em acetonitrila grau HPLC, de procedência Tedia.

3.2 Equipamentos e técnicas experimentais

3.2.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região do UV-visível

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível em solução foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5000 Varian, acoplado a um computador. As amostras foram analisadas em solução utilizando célula de quartzo retangular de caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

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

3.2.3 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 solventes deuterados.

3.2.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas dos complexos sintetizados foram realizadas utilizando-se um sistema eletroquímico potenciostato/galvanostato BAS Epsilon E2 818 à temperatura ambiente, utilizando uma célula convencional de três eletrodos. As medidas eletroquímicas envolvidas na caracterização do composto *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂] foram realizadas utilizando eletrodos de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodo de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Uma solução aquosa de NaTFA 0,1 molL⁻¹ com pH 3,0 foi utilizada como eletrólito suporte.

As medidas eletroquímicas para os compostos [Ru(bpy)(dppz)Naf](PF₆)₂ e [Ru(bpy)(dppz)Ant](PF₆)₂ foram realizadas em solução de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) 0,1 mol.L⁻¹ em acetonitrila, utilizando eletrodos de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl imerso em solução contendo o eletrólito utilizado como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Utilizou-se ferroceno como padrão interno, admitindo que o par redox ferroceno (Fc⁺⁰) apresenta $E_{1/2} = 0,381 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

3.2.5 Espectroscopia de emissão

Os experimentos de espectroscopia de emissão estacionária e resolvida no tempo foram realizados utilizando Fluorímetro Estacionário QM-40 (PTI). Os decaimentos de luminescência foram medidos através da técnica de contagem de fótons isolados empregando-

se o espectrofluorímetro TC900 Edinburgh (IQSC-Laboratório de Fluorescência Molecular coordenado pelo professor Marcelo H. Gehlen).

3.2.5.1 Rendimento quântico de emissão

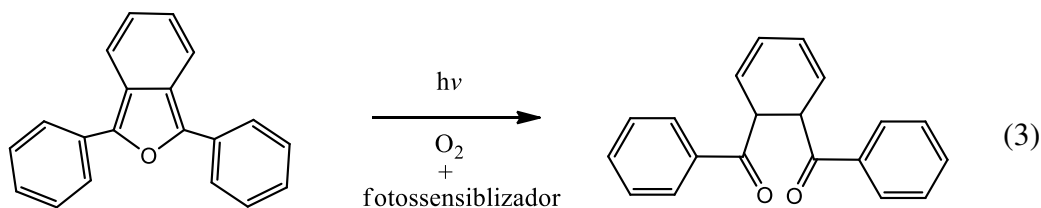
A equação 2 foi utilizada para a determinação do rendimento quântico de emissão.

$$\Phi_{em} = (I_a/I_p)(Abs^p_{\lambda_{exc}}/Abs^a_{\lambda_{exc}}) \Phi_p \quad (2)$$

em que I_a e I_p são as áreas dos espectros corrigidos de emissão da amostra e do padrão obtidos nas mesmas condições experimentais, Abs são as absorvâncias das soluções no mesmo comprimento de excitação e Φ_p é o rendimento quântico do padrão, no caso, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Φ (MeOH) = 0,045; Φ (Acetonitrila) = 0,068; Φ (diclorometano) = 0,062 Φ (H₂O) = 0,042)².

3.2.5.2 Rendimento quântico de geração de ¹O₂

O rendimento quântico de geração de ¹O₂ foi determinado pelo acompanhamento, via fluorescência, da reação da espécie de ¹O₂ com o 1,3 difenilisobenzofurano (DPBF)⁴³⁻⁴⁶. A reação ocorre na presença de luz, como descrito na equação 3:



Neste experimento, 2 mL das soluções dos complexos de rutênio (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em etanol contendo 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DPBF foram adicionados em uma cubeta de quartzo. A irradiação das amostras foram efetuadas com LED's de $\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ (Basetech Conrand, 1.7 W). O consumo de DPBF foi monitorado pela diminuição da intensidade da sua banda fluorescente no máximo de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $^{\text{em}}\lambda_{\text{máx}} = 475 \text{ nm}$) em diferentes tempos de irradiação. O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ foi usado como padrão, cujo valor de rendimento quântico de geração de ¹O₂ é $^p\Phi_{\Delta} = 0,84$ em solução de etanol saturada de ar³⁷. O valor de rendimento quântico de geração da espécie ¹O₂ ($^a\Phi_{\Delta}$) para os complexos foi determinado a partir da equação (4)⁴⁴:

$$k^a/k^p = ^a\Phi_{\Delta}/^p\Phi_{\Delta} \quad (4)$$

em que k^a e k^p são os coeficientes angulares das curvas cinéticas $\ln(I_t / I_0)$ vs tempo de irradiação da amostra e do complexo padrão. I_t e I_0 são as intensidades dos espectros de emissão no tempo t e zero, respectivamente.

3.3 Síntese dos compostos orgânicos

3.3.1 Síntese do composto 4'-metil-2,2'-bipiridina-4-ácido carboxílico (mbpy-COOH)

O composto precursor, mbpy-COOH, dos ligantes mbpy-Naf e mbpy-Ant foi preparado pelo método descrito por McCafferty e colaboradores⁴⁷.

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

O composto dppz foi sintetizado por procedimentos descritos na literatura⁴⁸.

3.3.3 Síntese dos ligantes 4' metil -N-(naftalen-2-il)-[2,2'bipiridina]-4-carboxamida (mbpy-Naf) e 4' metil -N-(antracen-2-il) -[2,2'bipiridina]-4-carboxamida (mbpy-Ant)

Para a síntese dos ligantes mbpy-Naf e mbpy-Ant 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 1 mL de DMF sob agitação. Após 10 minutos foi adicionado a mistura reacional 63,1mg (0,466 mmol) de 1-hidróxi-benzotriazol. Em seguida, adicionou-se 1 mmol do corante orgânico (2-aminonaftaleno ou 2-aminoantraceno) e 20 μ L (0,181 mmol) de N-metil morfolina. A reação se processou durante 15 h à temperatura ambiente. Após esse período, a solução resultante foi filtrada e rotoevaporada a fim de concentrá-la. Os sólidos foram obtidos através da precipitação com etanol e éter etílico, recristalizados e lavados com acetona. Rendimento: 46% (mbpy-Naf) e 77% (mbpy-Ant).

3.4 Síntese dos complexos

3.4.1 Síntese do complexo *cis*-Ru(bpy)(dppz)Cl₂

Para a síntese do complexo precursor, utilizou-se metodologia semelhante a da literatura para obtenção do complexo *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂⁴⁹. Para tal, solubilizou-se 304,7 mg (1,16 mmol) de RuCl₃.3H₂O juntamente com: 184,3 mg (1,18 mmol) de 2,2'-bipiridina, 333,1 mg de dppz (1,18 mmol) e 346,6 mg de LiCl (8,17 mmol) em 50 mL de DMF. Manteve-se a mistura sob refluxo e agitação por 8 horas. Logo após este período um precipitado preto foi recolhido por filtração lavado com acetona gelada e seco a vácuo. Rendimento: 85%

3.4.2 Síntese dos complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺, [Ru(dppz)Ant]²⁺ e [Ru(Ant)₃]²⁺

Em um balão de 100 mL dissolveu-se 100 mg de *cis*-Ru(bpy)(dppz)Cl₂ com o ligante mbpy-L (onde L = Naf ou Ant) em relação estequiométrica complexo precursor/ligante (1:1,5) em 30 mL de uma solução água/etanol (1:1). Manteve-se a reação sob refluxo e agitação por 8 horas. Ao final desse período, concentrou-se a solução por rotoevaporação para uma posterior purificação do complexo em coluna de sílica usando uma mistura de metanol/DMF (1:1 v/v) como eluente. As frações resultantes foram analisadas por espectroscopia de absorção eletrônica, sendo aquelas com espectros semelhantes concentradas a quase *secura*. Posteriormente adicionou-se gotas de solução saturada de PF₆ para precipitação. Em seguida, o precipitado foi recolhido por filtração, lavado com água e seco a vácuo. Rendimento: [Ru(dppz)Naf]²⁺ 60 % e [Ru(dppz)Ant]²⁺ 65%. A síntese do complexo [Ru(Ant)₃]²⁺ foi realizada pela mesma rota do complexo *cis*-Ru(bpy)(dppz)Cl₂. A purificação foi realizada via coluna de exclusão, Sephadex LH 20, com eluição em metanol. Rendimento: 73%.

3.5 Estudos de interação e fotoclivagem com DNA

Para determinar a constante intrínseca de ligação com DNA (K_b), foi realizado titulação espectrofotométrica por absorção na região do UV-vis. As medidas foram realizadas com concentrações constantes de complexo (10 μmol L⁻¹) e sucessivas adições de CT DNA (0-40 μmol L⁻¹) em 10 mmol L⁻¹ de tampão tris-HCl pH = 7,4. Após a adição de DNA à solução contendo complexo, permitiu-se atingir o equilíbrio por 5 min à 25 °C. Após esse tempo, os

espectros de absorção na faixa do UV-vis foram registrados. As equações utilizadas para o cálculo de K_b foram:

$$(\varepsilon_a - \varepsilon_f) / (\varepsilon_b - \varepsilon_f) = [b - (b^2 - 2K_b^2[Ru][DNA]/s)1/2] / 2K_b[Ru] \quad (5)$$

$$[DNA] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [DNA] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f) + 1 / K_b (\varepsilon_a - \varepsilon_f) \quad (6)$$

sendo que $b = 1 + K_b[Ru] + K_b[DNA]/2s$, ε_a , ε_f e ε_b são os coeficientes de absorvidade aparente, livre e do complexo totalmente ligado ao DNA, respectivamente. O tamanho do sítio de ligação é representado por s , $[Ru]$ e $[DNA]$ são as concentrações molares do complexo e DNA, respectivamente. A equação 5 é baseada num modelo não competitivo de sítio único de interação e gera valores mais exatos para moléculas intercalantes ($K_b > 10^6$)³³. O outro modelo (equação 6) geralmente se ajusta com maior precisão para interações mais moderadas. Para o estudo com oligonucleotídeos utilizou-se a sequência de DNA telomérico de fita única (ss-DNA/ HTG21: 5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'), uma sequência de fita única ssDNA(5'-ATCACACCGAACACTCC-3'), sua sequência complementar (3'-TAGTGTGGCTTGTGAGG-5') e sua fita não-complementar (CC-mismatch: 3'-TAGTGTGCCTTGTGAGG-5'). Todas as sequências foram obtidas comercialmente pela IDT. A formação da forma G-quadruplex (G4-DNA) se deu pelo aquecimento a 90°C da forma HTG21 em solução tampão Tris-HCl 10mmol L⁻¹ e KCl 100 mmol L⁻¹. Em seguida, deixou-se esfriar a solução até 4°C para então armazená-la em freezer.

O estudo de competição por sulco foi realizado utilizando brometo de etídio (EB), *methyl green* e o reagente Hoechst, contra os complexos metálicos como concorrentes, em 10 mmol L⁻¹ de tris-HCl (pH 7,4) a 22 °C. As soluções aquosas continham CT DNA a 10 µmol L⁻¹ juntamente com 5 µmol L⁻¹ de EB, *methyl green* ou Hoechst. Os complexos metálicos foram titulados e monitorados por espectroscopia de fluorescência. Todos os dados foram coletados pelo menos em duplicata e se encaixam em uma única equação, da qual obteve-se uma constante de dissociação aparente ($^{app}K_d^L$) foi obtida. O $^{app}K_d^L$ para complexos metálicos foi usado para estimar K_d (K_d^L) usando a equação 7, considerando uma competição simples, onde L é a concentração do agente de ligação ao DNA (complexo, EB, *methyl green* ou Hoechst) e K_d^L , a constante de dissociação relatada da literatura. Os controles sem DNA foram tratados conforme descrito acima para avaliar qualquer evento de supressão com EB, *methyl green* e Hoechst.

$$^{app}K_d^L = K_d^L (1 + L / K_d^L) \quad (7)$$

O estudo de fotoclivagem foi realizado empregando a técnica de eletroforese em gel de agarose. As soluções dos complexos foram adicionadas à solução contendo o DNA superenovelado plasmidial pBR322 (21 µmol L⁻¹ pares de base) em tampão tris-HCl, pH = 8, onde foram incubados para serem irradiados ou mantidos no escuro. O padrão de bandas foi

verificado em gel de agarose (0,8 %) com tampão TAE pH = 8,0, coradas com brometo de etídio (EtBr, 1 µg/mL, 1h) e analisado usando o fotodocumentador Gel Doc™ XR + System (Biorad). O experimento de irradiação foi feito com LED's (Basetech Conrand, 1.7 W) em diferentes comprimentos de onda: azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$), verde ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$) e amarelo ($\lambda_{\text{máx}} = 592 \text{ nm}$) a uma distancia de 17 cm da cubeta.

3.6 Atividade antibacteriana

Local: Todas essas medidas foram realizadas pelo grupo do professor Edson Holanda do Laboratório Integrado de Biomoléculas, Departamento de Patologia e Medicina Legal – Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.6.1 *Microorganismos e condições de cultura*

As bactérias utilizadas nesse estudo foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Escherichia coli* ATCC 11303. Essas cepas foram armazenadas em Tryptic Soy Broth (TSB) com 20% (v/v) de glicerol a -80 °C. Eles foram inoculados em placas de Tryptic Soy Broth (TSA) e incubados em condições aeróbicas a 37°C durante 24 h. Após o crescimento em placas de ágar, as colônias individuais foram removidas e inoculadas em 10 mL de meio de TSB fresco e incubadas durante 24h a 37°C sob agitação constante. Antes de cada ensaio antibacteriano, a concentração celular final foi ajustada para 1×10^6 unidades formadoras de colônias (cfu) mL⁻¹.

3.6.2 *Ensaio antibacteriano*

A susceptibilidade das bactérias aos complexos de rutênio foi avaliada pela concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) dos complexos. Os valores de MIC foram determinados de acordo com o Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico M7-A6 (NCCLS, 2003), com algumas modificações. Os compostos foram diluídos em água estéril ultrapura em concentrações variando de 3,9 a 500 µg/ml. Em seguida, foram distribuídos em placas de 96 poços com cada suspensão bacteriana (1×10^6 cfu mL⁻¹) em TSB. Essas placas foram submetidas a irradiação com LED azul por 1 hora ou mantidas no escuro, depois incubadas durante a noite a 37 ° C. Os valores de MIC foram determinados como a menor concentração de composto que inibiu completamente o

crescimento bacteriano observável. Para a medição de MBC, foram removidos 10 μL de cada poço onde nenhum crescimento bacteriano visível foi observado e plaqueado em placas TSA para ser incubado a 37 ° C. O MBC foi considerado a menor concentração antibacteriana do composto onde o crescimento bacteriano não foi observado.

3.7 Estudo computacional

Todos os cálculos de DFT (do inglês *density functional theory*) desse estudo foram realizados usando o pacote do programa Gaussian 09, revisão A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT)⁵⁰. As geometrias dos complexos foram otimizadas no nível da DFT por meio do funcional B3LYP⁵¹⁻⁵³. O conjunto de base de 6-31G (d) foi usado para átomos de C, H, O e N. Para o átomo de rutênio, o conjunto de núcleo efetivo relativista LANL2DZ. As geometrias otimizadas em um mínimo da energia potencial foram confirmadas pela ausência de qualquer frequência imaginária em cálculos de análise vibratória.

Com base nas geometrias otimizadas, o DFT dependente do tempo (TD-DFT) foi aplicado para investigar as propriedades eletrônicas dos complexos e simular os espectros de absorção. Os cálculos TD-DFT foram realizados em campos de solventes de acetonitrila por meio do modelo do contínuo polarizável (PCM)⁵⁴. A composição orbital molecular, os espectros de UV-Vis e a atribuição de transições principais foram extraídas utilizando os programas Multiwfn22 e GaussSum 3.023, respectivamente.

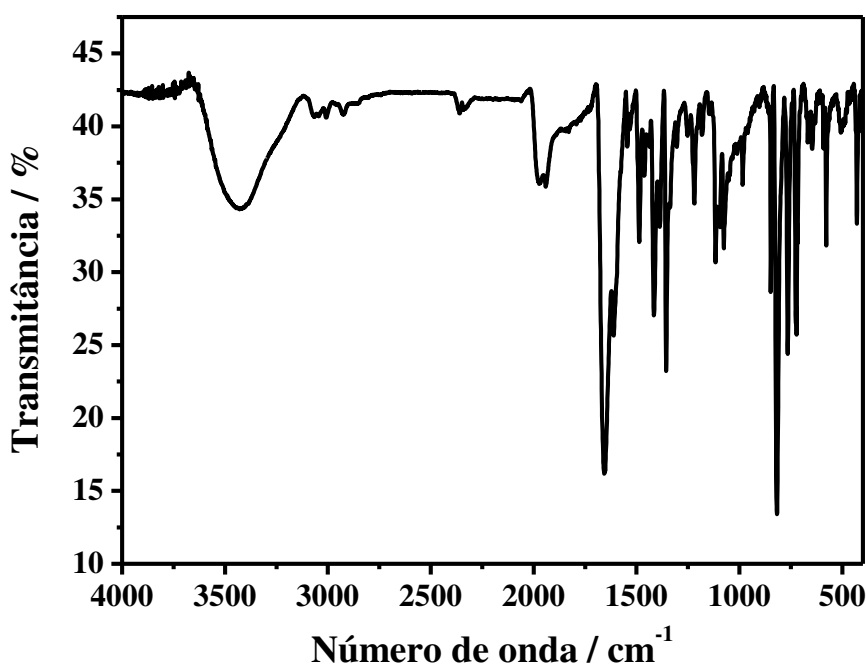
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistematis-heteroléptico [Ru(dppz)L]²⁺

4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A caracterização do composto precursor dos complexos sintetizados, a molécula *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂], será discutida para fins comparativos. O espectro de IV do complexo *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂] em pastilha de KBr está ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂] em pastilha de KBr.

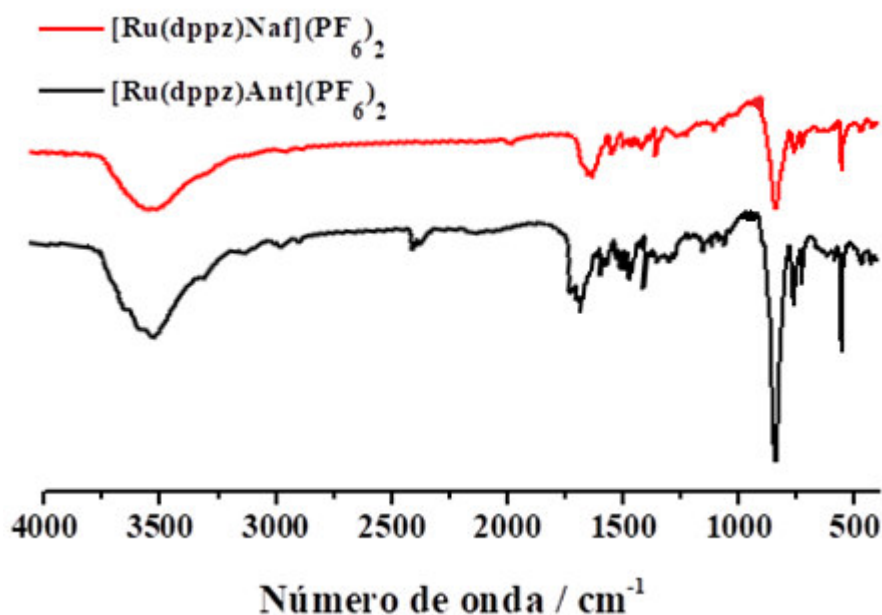


Fonte: Elaborado pelo autor.

As bandas de baixa intensidade entre 3064-2924 cm⁻¹ e a banda intensa em 764 cm⁻¹ são oriundas do estiramento C-H e sua deformação exterior ao plano dos anéis aromáticos, respectivamente^{55,56}. Os estiramentos em 1486 e 1415 cm⁻¹ são relativas às vibrações simétricas C=C e C=N dos anéis piridínicos, respectivamente^{55,56}.

Os estiramentos e deformações para os complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺ são mostrados no espectro da Figuras 14.

Figura 14 – Espectro vibracional na região do infravermelho dos compostos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}](\text{PF}_6)_2$ em pastilha de KBr.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Bandas características do grupamento amida são comuns aos três complexos. Em 3461 e 3413 cm^{-1} encontram-se bandas largas atribuídas ao estiramento da ligação N-H para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente. O estiramento amido C=O dos complexos foi detectado em torno de 1667 cm^{-1} .^{49,55,61} Para os anéis piridínicos, os estiramentos em 1466, 1462 e 1477 cm^{-1} são referentes à ligação C=C dos compostos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente^{49,55,60}; enquanto que o estiramento da ligação C=N encontra-se por volta de 1420 cm^{-1} .^{49,55,60} Bandas características de estiramentos C=C e C-H dos cromóforos naftil, antracênil e dos anéis aromáticos do ligante dppz encontram-se sobrepostos uns aos outros na região entre 1600-1640 cm^{-1} . As deformações angulares C-H de aromáticos relativas aos grupos naftil, antracênil, bipyridínicos e dppz também se sobrepõem entre 700-800 cm^{-1} .⁶⁰ O forte sinal em 840 cm^{-1} foi atribuído a deformação angular do contra-íon PF_6^- .⁶² Portanto, podemos inferir, com base nos espectros de espectroscopia vibracional no infravermelho, a coordenação dos ligantes mbpy-Naf e mbpy-Ant. A Tabela 1 sumariza as principais tentativas de atribuição.

Tabela 1 – Dados de infravermelho dos complexos sintetizados.

Número de onda (cm ⁻¹)			Tentativa de atribuição
<i>cis</i> - [Ru(dcbpy) ₂ Cl ₂]	[Ru(dppz)Naf](PF ₆) ₂	[Ru(dppz)Ant](PF ₆) ₂	
-	3461	3413	v (N-H)
-	2924	2921	v (C-H) do grupo metila
-	1667	1668	v (C=O) de amida
1600-1640	1600-1640	1600-1640	v (C=C) dos anéis aromáticos
1486	1466	1462	v (C=C) dos anéis piridínicos
1415	1420	1419	v (C=N) dos anéis piridínicos
-	840	840	δ PF ₆ ⁻
700-800	700-800	700-800	δ (C-H) dos anéis aromáticos

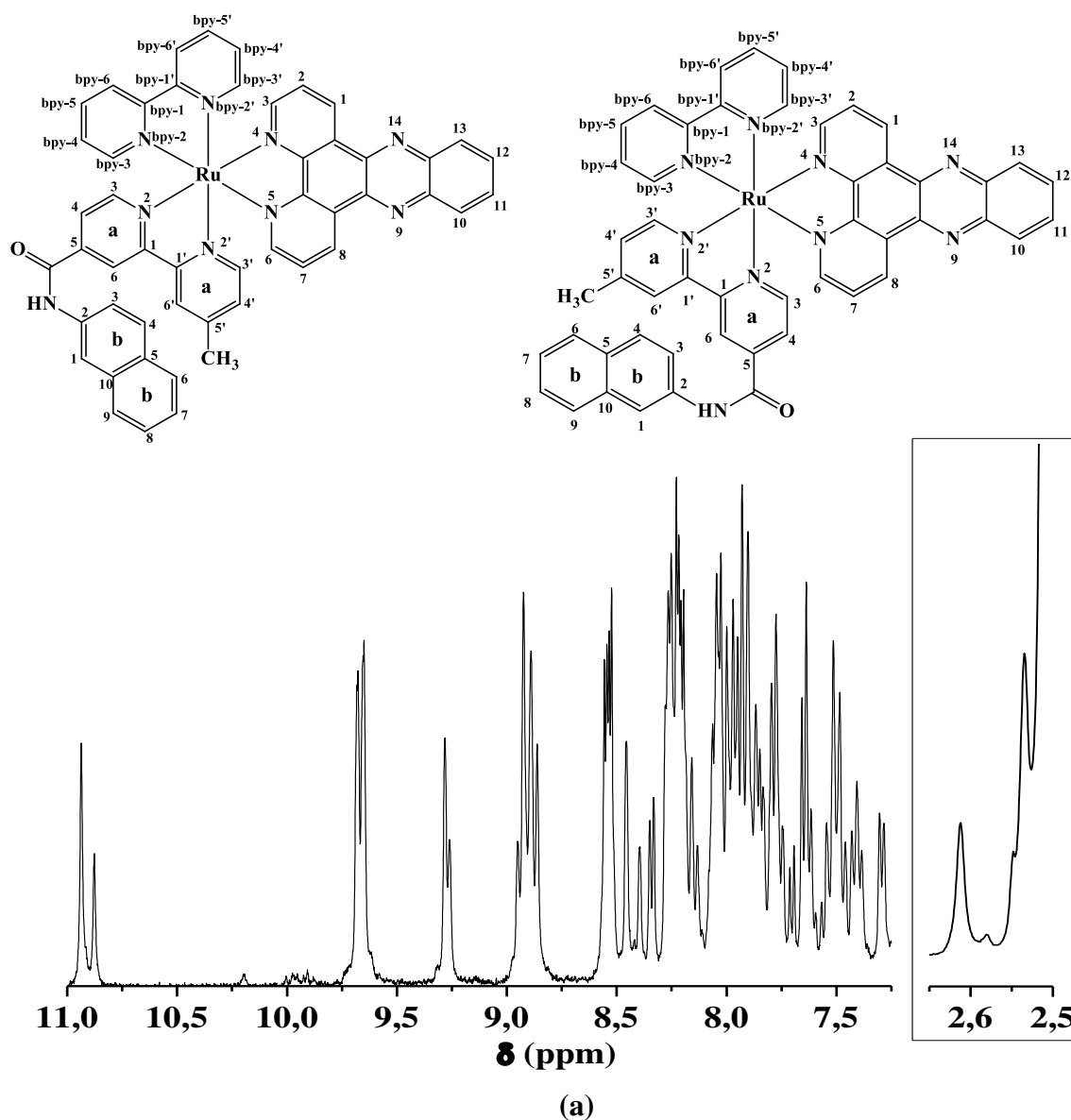
Fonte: Elaborada pelo autor.

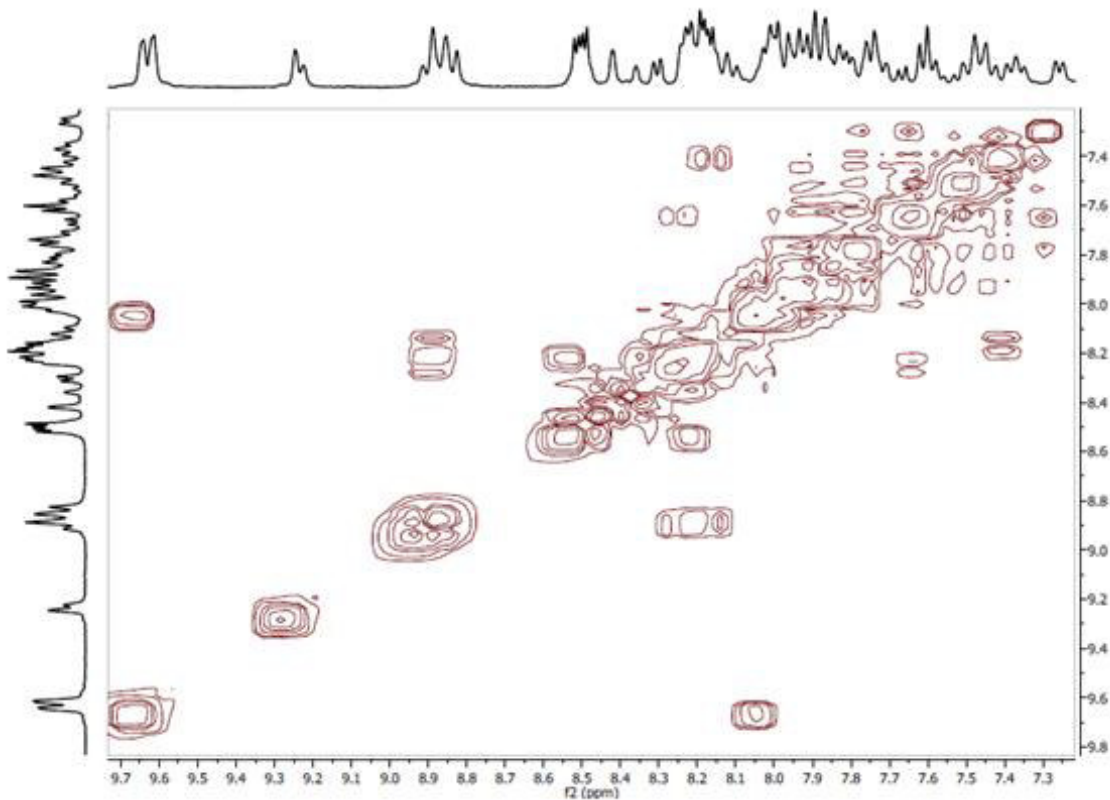
v_s= estiramento simétrico; δ= deformação angular

4.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H

Os espectros de RMN de ¹H dos complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺ estão ilustrados nas Figura 15 e 16, respectivamente. Devido a predominância de sinais sobrepostos referentes aos anéis aromáticos, foi empregada a técnica bidimensional COSY, na qual são detectados acoplamentos H-H até uma distância de 2 ligações.

Figura 15 – Espectro de ressonância magnética de ^1H dos isômeros geométricos do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ em DMSO deuterado (a); *inset*: sinal dos hidrogênios do grupo metila; (b) espectro de RMN de ^1H bidimensional COSY.





(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A natureza assimétrica dos ligantes funcionalizados com os grupamentos naftil e antracêniltorna provável a formação de dois isômeros geométricos para cada complexo. O dobro de sinais encontrados sugere uma mistura isomérica dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$.

Os espectros de próton de ressonância magnética nuclear dos complexos sugerem fortemente essa mistura isomérica dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. Três tipos de sinais fortemente sugerem essa possibilidade: os prótons de amida, os singletos 6a e 6'a e os hidrogênios alifáticos da metila.

O ligante dppz apresentou equivalência magnética para os hidrogênios $\text{H}_{3\text{dppz}}$ e $\text{H}_{6\text{dppz}}$ em torno de 9,6 ppm. Os mesmos apresentam correlação com os hidrogênios $\text{H}_{2\text{dppz}}$ e $\text{H}_{7\text{dppz}}$ por volta de 8,1 ppm, como visto nos espectros bidimensionais COSY (Figura 15 (b)). Os dois sinais $\text{H}_{1\text{dppz}}$ e $\text{H}_{8\text{dppz}}$ do ligante dppz, sobrepostos entre 8,24 e 8,29, também acoplam com $\text{H}_{1\text{dppz}}$ e $\text{H}_{8\text{dppz}}$. A correlação entre os hidrogênios equivalentes $\text{H}_{10\text{dppz}}$ e $\text{H}_{13\text{dppz}}$ (entre 8,50 e 8,58 ppm) e $\text{H}_{11\text{dppz}}$ e $\text{H}_{12\text{dppz}}$ (entre 8,24 e 8,27 ppm) também foi observada.

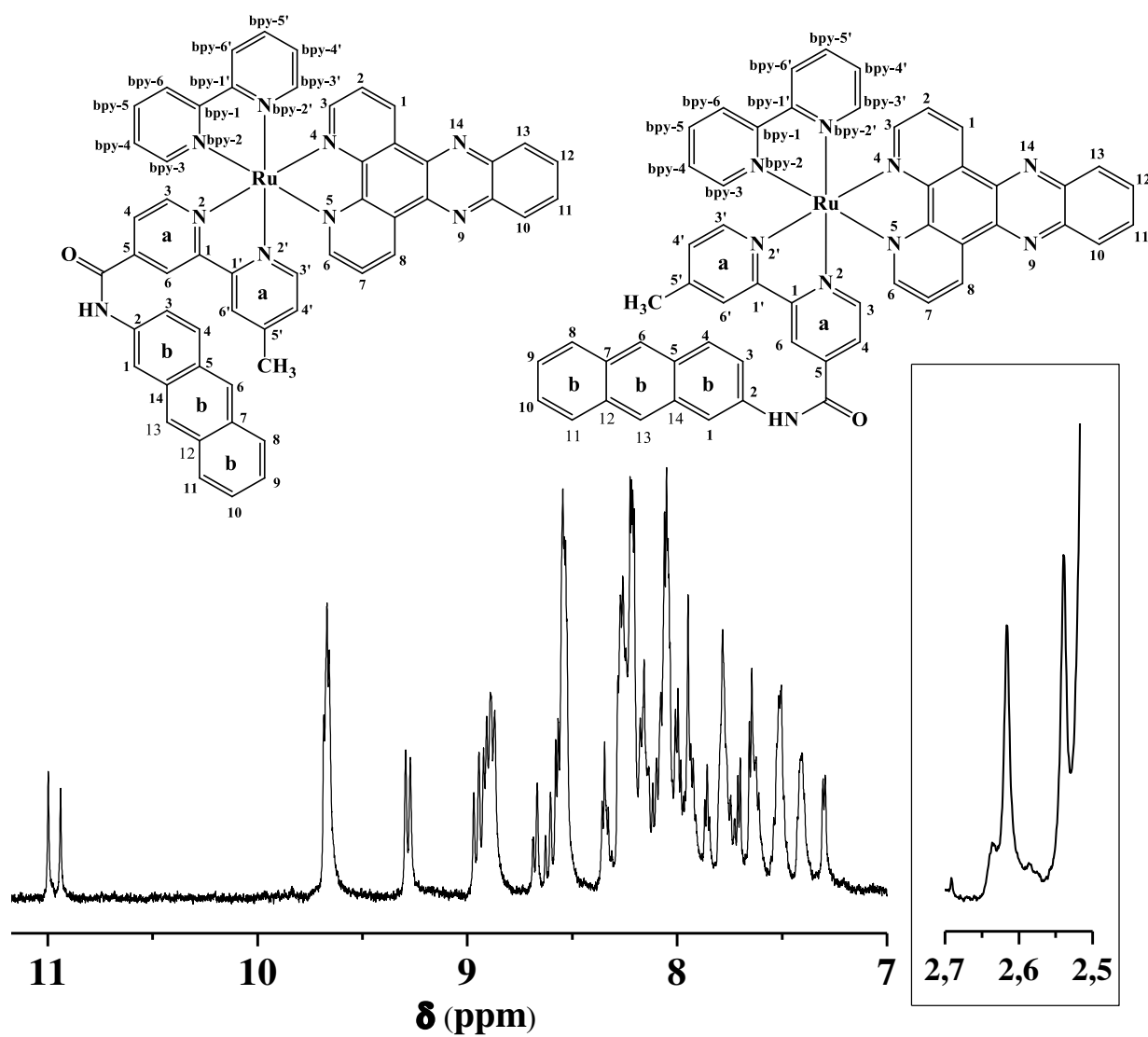
Os hidrogênios dos anéis da biperidina não se mostraram magneticamente equivalentes, provavelmente em função do caráter assimétrico da molécula. Em torno de 8,9 ppm estão contidos os deslocamentos referentes aos hidrogênios Hbpy-5' e Hbpy-4', os quais acoplam com o Hbpy-6' e Hbpy-3'. Os picos em aproximadamente 8,0, 7,9, 7,5 e 7,3 ppm estão correlacionados aos Hbpy-4, Hbpy-3, Hbpy-5 e Hbpy-6, respectivamente.

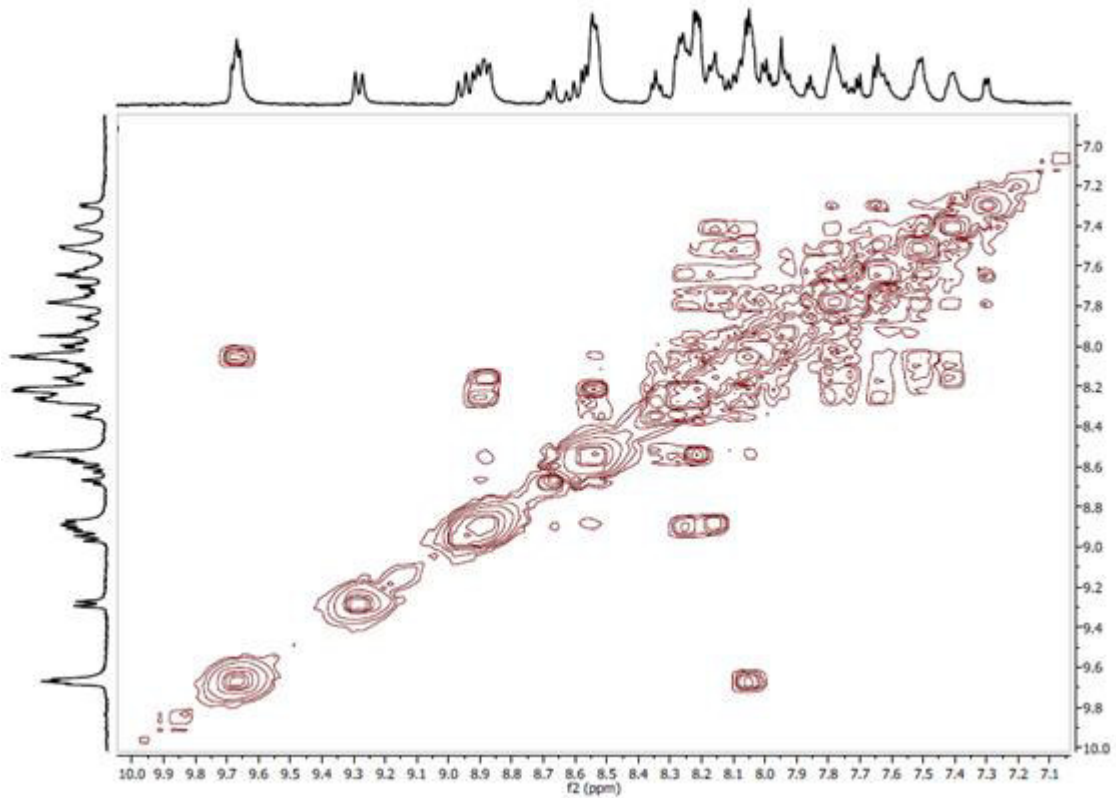
Quanto à biperidina funcionalizada, os hidrogênios 6a e 6a' atestam fortemente a mistura isomérica, cujos sinais aparecem em 9,24 e 9,30 ppm para 6a e 8,40 e 8,45 para 6'a. O sinal em 8,34 ppm associado ao hidrogênio 3'a acopla com 4'a em 8,15 ppm. O hidrogênio 5a por volta de 8,15 ppm correlaciona-se com 3a em 8,34 (sobreposto com 4). O sinal do próton de amida apresenta-se duplicado devido a mistura isomérica, e são vistos em 10,87 e 10,93 ppm.

Os sinais da porção naftil são: sinal em 8,02 ppm referente à 1b; hidrogênio 9b sobreposto a bpy-6 na faixa de 7,72-7,82 ppm; o hidrogênio 6b localizado na faixa entre 7,60 e 7,67 ppm. Os prótons sobrepostos na faixa de 7,44-7,55 ppm são referentes aos hidrogênios 7b e 8b. Por fim, os sinais correlacionados dos dois prótons 3b e 4b (7,82-7,95 ppm).

Na faixa de hidrogênio ligado a carbono alifático aparecem dois singletos associados aos hidrogênios do grupo metila (2,53 e 2,62 ppm, *inset* da figura 15).

Figura 16 – Espectro de ressonância magnética de ^1H dos isômeros geométricos do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em DMSO deuterado (a); *inset*: sinal dos hidrogênios do grupo metila; (b) espectro de RMN de ^1H bidimensional COSY.





(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A atribuição dos sinais de hidrogenio para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ é similar para o complexo com o ligante mbpy-Naf. Com exceção para alguns hidrogênios com sinais ligeiramente deslocados, o espectro de hidrogênio (Figura 16 (a)) apresentou deslocamentos químicos com valores próximos do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$. A Tabela 2 resume os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos de ambos os complexos.

Desta forma, podemos concluir que os espectros de RMN de ^1H indicam a coordenação dos ligantes funcionalizados a partir do complexo precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ com a formação de um par de isômeros geométricos para cada complexo.

Tabela 2 – Deslocamentos químicos de RMN¹H e atribuições para os complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺.

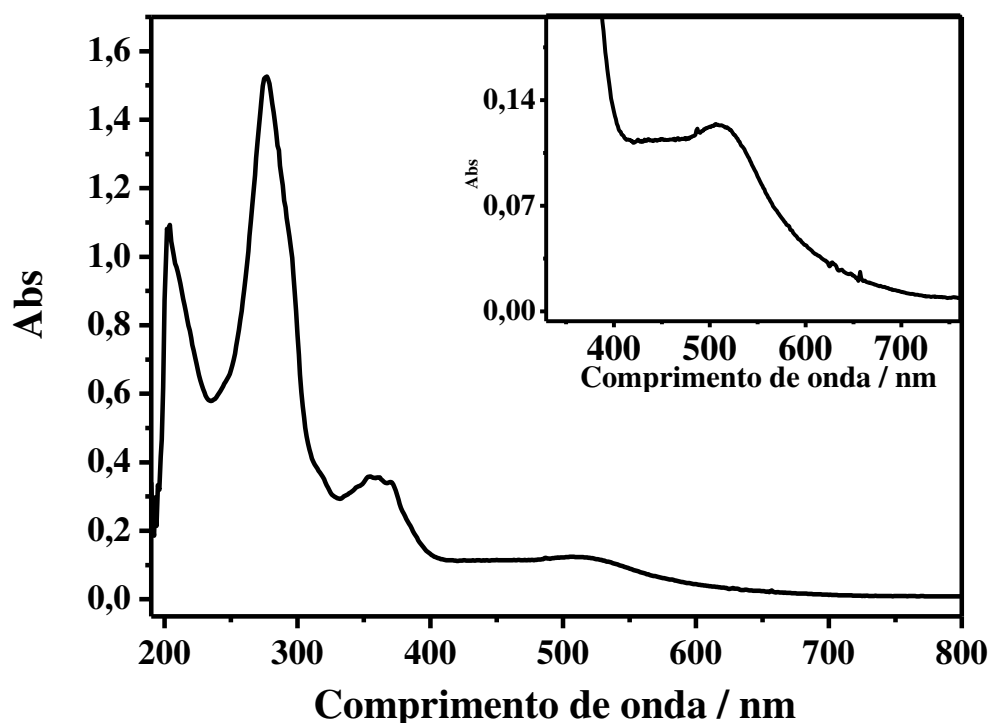
	(δ) / ppm		
	¹ H	[Ru(dppz)Naf] ²⁺	[Ru(dppz)Ant] ²⁺
Sistema dppz	3 e 6	9,67	9,63-9,70
	2 e 7	8,01-8,10	8,01-8,12
	1 e 8	8,24-8,29	8,23-8,28
	10 e 13	8,50-8,58	8,51-8,58
	11 e 12	8,17-8,24	8,18-8,23
Sistema bipyridil	bpy-3	7,30	7,30
	bpy-4	7,37-7,44	7,37-7,43
	bpy-5	7,95-8,01	7,46-7,55
	bpy-6	7,72-7,82	7,46-7,55
	bpy-3'	8,17-8,24	8,13-8,18
	bpy-4'	8,83-8,97	8,85-8,98
	bpy-5'	8,83-8,97	8,85-8,98
	bpy-6'	8,17-8,24	8,13-8,18
Sistema bipyridil funcionalizado	3a	7,96	8,67
	4a	7,33	8,61
	6a	9,24 e 9,30 (mistura isomérica)	9,27 e 9,29 (mistura isomérica)
	3'a	7,71	7,86
	4'a	7,58	7,70
	6'a	8,40 e 8,45 (mistura isomérica)	8,32 e 8,36 (mistura isomérica)
	1b	8,23	7,95
	3b	7,82-7,95	7,92
	4b	7,82-7,95	7,99
	6b	7,51-7,58	8,55
	7b	7,44-7,55	7,95
	8b	7,44-7,55	7,75-7,81
	9b	7,72-7,82	7,60-7,67
	10b	-	7,60-7,67
11b	-	7,75-7,81	
13b	-	8,05	
	δ(¹ H amida)	10,97 e 10,93	10,94 e 11,0
	δ(¹ H metila)	2,53 e 2,62	2,53 e 2,62

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Espectroscopia de absorção eletrônica

O espectro eletrônico (Figura 17) do complexo *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂], em metanol, apresenta duas bandas em 437 e 511 nm, originadas das transições de carga do metal para o ligante (MLCT) oriundas dos orbitais $d\pi$ (Ru^{II}) para os orbitais $\pi\pi^*$ dos ligantes bipyridínicos^{49,63}. A absorção das transições intraligantes ($\pi\pi^* \leftarrow \pi\pi$) do ligante dppz encontra-se por volta de 362 nm⁶⁴. Intensas bandas de alta energia em 203 e 276 nm correspondem às transições intraligante $\pi\pi^* \leftarrow \pi\pi$ dos ligantes bipyridínicos^{2,64}.

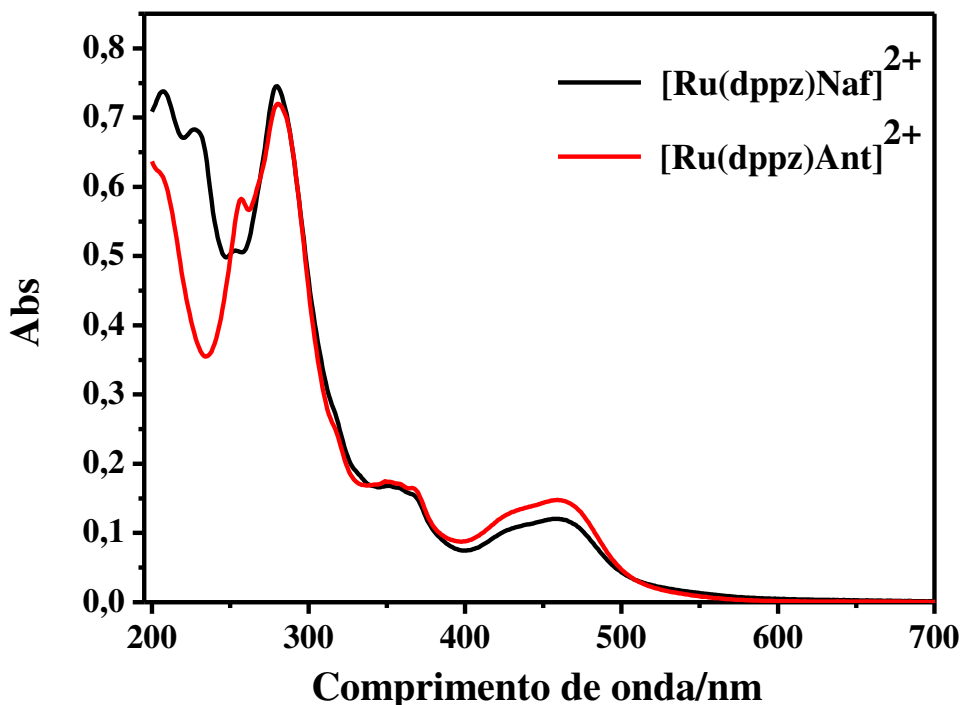
Figura 17 – Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível do complexo *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂] em metanol na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. *Inset*: expansão da região entre 400 e 750 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 18 ilustra os espectros de absorção eletrônica em acetonitrila dos complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺.

Figura 18 – Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em acetonitrila na concentração de $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os perfis espectrais dos dois compostos são bastantes similares. Existem bandas de baixa energia na região do visível ($\lambda_{\text{máx}} \sim 460 \text{ nm}$) atribuída à transferência de carga metal-ligante (MLCT), $p\pi^* \leftarrow d\pi$, do metal para os ligantes^{1,2,15,64-66} e transições intraligantes do tipo $p\pi^* \leftarrow p\pi$ oriundas dos ligantes bipiridínico e dppz⁶⁴.

As bandas de alta energia em 204 e 280 nm (transições intraligantes $p\pi^* \leftarrow p\pi$) dos anéis bipiridínicos são comuns a ambos os complexos¹. Entretanto, duas bandas podem ser diferenciadas nessa região – uma em 226 nm para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e outra em 257 nm para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ – ambas provavelmente oriundas de transições intraligantes dos grupos aromáticos naftil e antracênil⁶⁷.

As bandas no visível apresentam um deslocamento batocrômico comparado ao complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$, cuja absorção máxima ocorre em torno de 440 nm. A literatura reporta que, provavelmente, essa mudança espectral deva-se à efeitos eletrônicos indutivos nos substituintes da posição 4 e 4' do amidobipiridina^{2,65,66}. A Tabela 3 sumariza todas as transições e os respectivos coeficientes de absorvidade.

Tabela 3 – Dados de UV-Vis para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em acetonitrila.

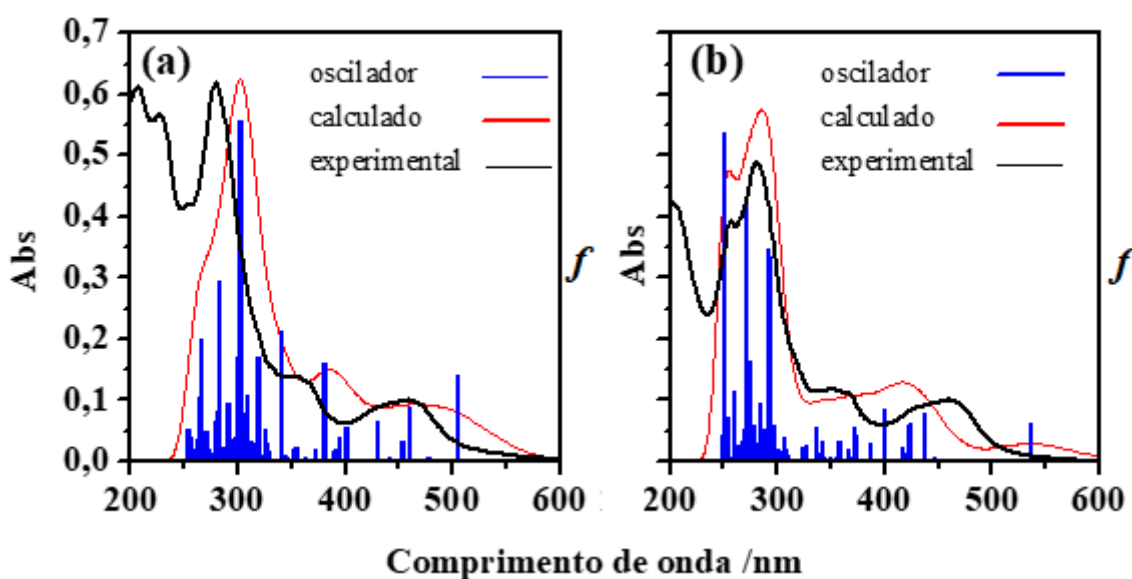
Complexos	$\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon \times 10^5 \text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Atribuição
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$	207 (1,5)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	226 (1,3)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	280 (1,5)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	350 (0,3)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	459 (0,2)	$p\pi^* \leftarrow d\pi$
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$	201 (1,3)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	254 (1,1)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	281 (1,4)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	352 (0,3)	$p\pi^* \leftarrow p\pi$
	460 (0,3)	$p\pi^* \leftarrow d\pi$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos computacionais também foram conduzidos para investigar as transições eletrônicas dos complexos, utilizando teoria funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT). Os resultados de TD-DFT sugeriram a contribuição de transições $^1\text{MLCT}$ e $^1\text{MLLCT}$ (transição de carga de metal-ligante para ligante) nas bandas de alta energia entre 200-350 nm, além das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (IL-intraligante e LLCT-ligante-ligante via transferência de carga) dentro dos ligantes aromáticos naftil e antracênil. Além disso, esses cálculos reforçaram a que a absorção de baixa energia é resultado principalmente de um estado MLCT.

Os espectros calculados via TD-DFT são apresentados na Figura 19. Faz-se razoável a concordância entre os espectros teóricos e experimentais em ambos os complexos. Desse modo, podemos interpretar as propriedades espectroscópicas dos complexos em termos de energia e distribuição espacial dos orbitais molecular com base na teoria.

Figura 19 – Espectros eletrônicos calculados dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) por TD-DFT com B3LYP.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As transições eletrônicas do tipo MLCT previstas teoricamente (Tabela 4) são predominantemente atribuídas a transferência de carga de orbitais do rutênio (HOMO-2 e HOMO-3) para orbitais dos ligantes bipyridina e dppz (LUMO).

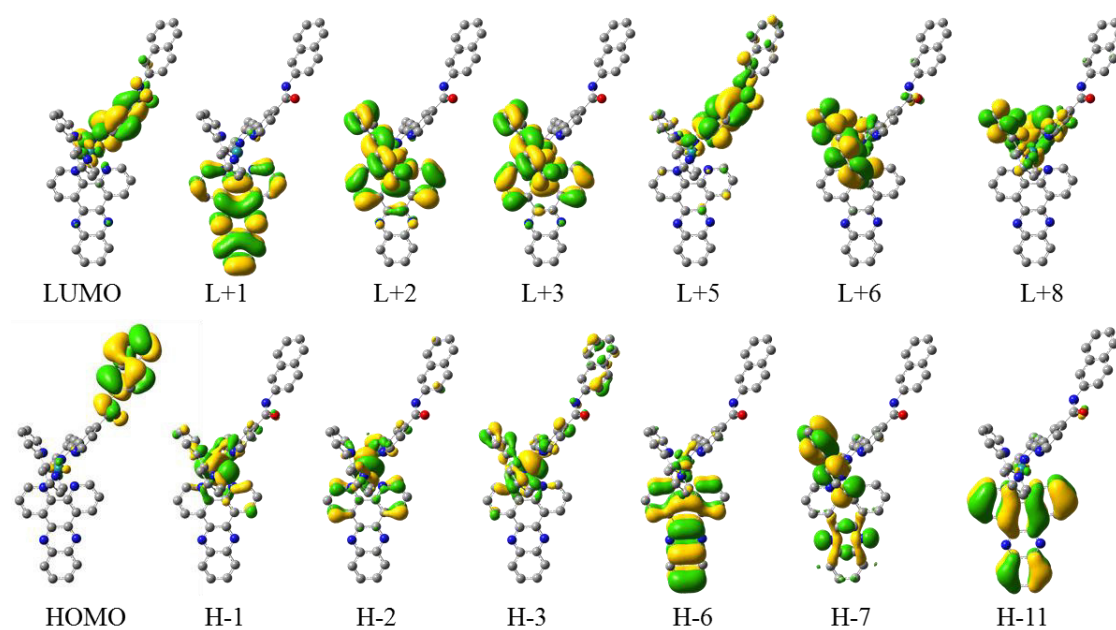
Tabela 4 – Transições calculadas de estado singlete para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$.

Complexo	$\lambda(\text{nm})$	f	Contribuição	Caráter	
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$	505	0,2406	HOMO \rightarrow LUMO (92%)	$d(\text{Ru})+\pi(\text{Naf}) \rightarrow \pi(\text{bpy-Naf})$	MLCT/IL
	459	0,1506	H-3 \rightarrow LUMO (40%) H-2 \rightarrow LUMO (29%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi(\text{bpy-Naf})$	MLCT
	429	0,1122	H-2 \rightarrow L+1 (69%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	MLCT
	380	0,2779	HOMO \rightarrow L+5 (58%)	$d(\text{Ru})+\pi(\text{Naf}) \rightarrow \pi(\text{bpy-Naf})$	MLCT/IL
	340	0,3640	H-6 \rightarrow L+1 (77%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	IL
	308	0,1849	H-1 \rightarrow L+8 (54%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	MLCT
	299	0,2905	H-3 \rightarrow L+6 (29%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	MLCT
	282	0,5032	H-7 \rightarrow L+3 (31%)	$\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	LLCT
	265	0,342	H-11 \rightarrow L+2 (27%)	$\pi(\text{bpy-Naf}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	IL
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$	535	0,1102	HOMO \rightarrow L+1 (96%)	$\pi(\text{Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	IL/LLCT
	437	0,1326	H-2 \rightarrow LUMO (74%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	MLCT
	398	0,147	H-3 \rightarrow L+2 (44%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz/bpy})$	MLCT
	370	0,0986	H-4 \rightarrow LUMO (39%) H-4 \rightarrow L+1 (48%)	$d(\text{Ru})+\pi(\text{Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$ $d(\text{Ru})+\pi(\text{Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	MLLCT MLCT/IL
	336	0,0983	H-7 \rightarrow LUMO (45%)	$d(\text{Ru})-\pi(\text{dppz}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	MLCT/IL
	290	0,5929	H-3 \rightarrow L+4 (35%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$	MLCT
	271	0,7229	HOMO \rightarrow L+12 (34%)	$\pi(\text{Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	IL
	249	0,9212	HOMO \rightarrow L+15 (25%) H-6 \rightarrow L+6 (20%)	$\pi(\text{Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	IL

Fonte: Elaborada pelo autor.

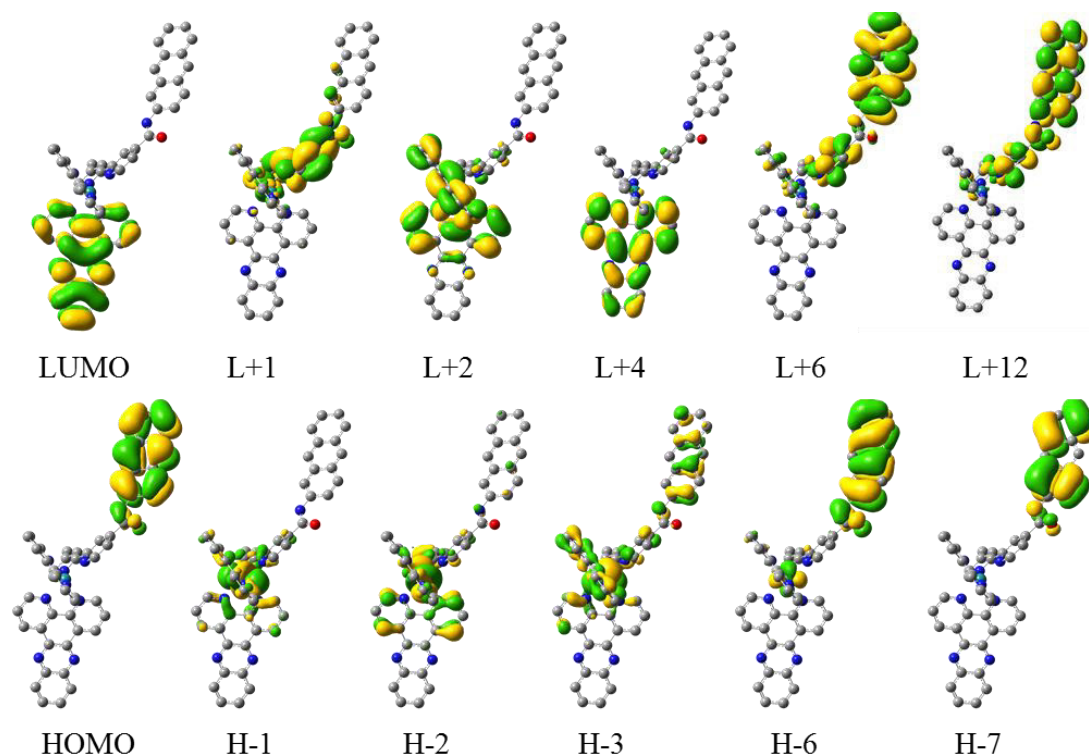
A fim de compreendermos acerca da distribuição espacial dos orbitais de fronteira dos complexos, calculou-se as superfícies de contorno orbital para os mesmos. Elas estão representadas nas Figuras 20 e 21 para os complexos $\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente. A energia de alguns desses orbitais estão calculadas no gráfico da Figura 22.

Figura 20 – Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ calculados por TD-DFT (hidrogênios omitidos para maior clareza da estrutura).



Fonte: Elaborada pelo autor.

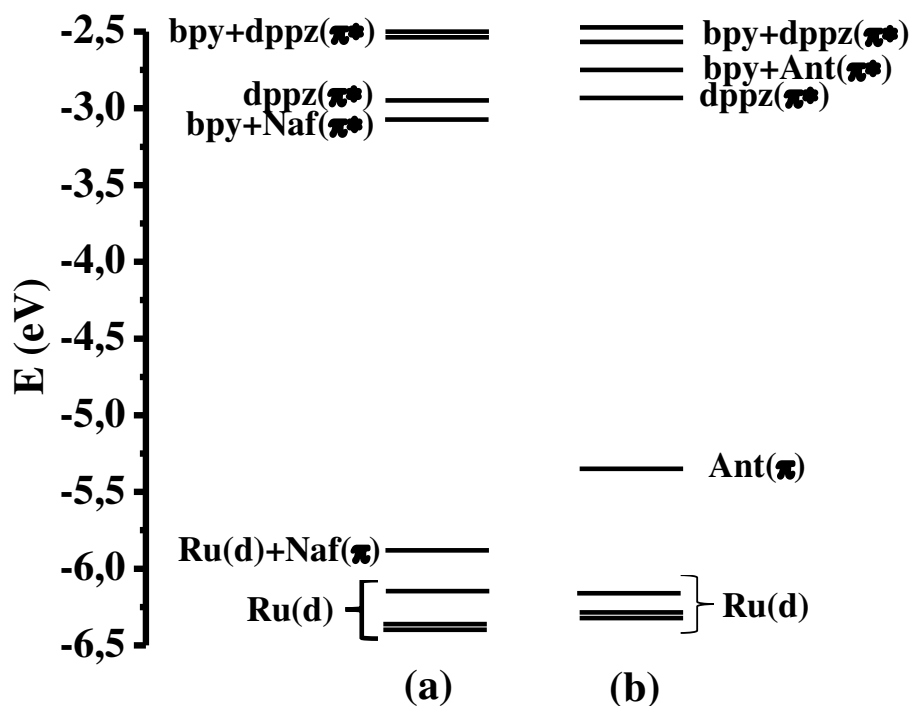
Figura 21 – Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ calculados por TD-DFT (hidrogênios omitidos para maior clareza da estrutura).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em ambos os complexos, o átomo de rutênio contribui majoritariamente com os orbitais HOMO-2 e HOMO-1, como observado nas Figuras 20 e 21. Comumente a literatura reporta orbitais HOMO com um caráter estritamente do metal em sistemas polipiridínicos. No entanto, os orbitais HOMO dos dois complexos possuem grande contribuição dos grupamentos naftil e antracênil. No complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ há uma mistura dos orbitais do rutênio com os anéis naftil (-5,88 eV) e um orbital molecular puramente pertencente ao grupo antracênil no complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (-5,39eV). A participação dos orbitais aril pode justificar o aparecimento das transições do tipo MLCT, IL e LLCT (Tabela 4) em torno de 500nm nos espectros teóricos. Essas bandas não foram detectadas experimentalmente por, provavelmente, serem de transição não permitida.

Figure 22 – Gráfico de energia calculada por TD-DFT dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ o orbital LUMO está distribuído sobre o ligante amida, enquanto que no complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ localiza-se sobre o ligante dppz. Os orbitais LUMO mais periféricos aos complexos distribuem-se sobre os ligantes bipyridínicos e dppz (Figuras 20 e 21).

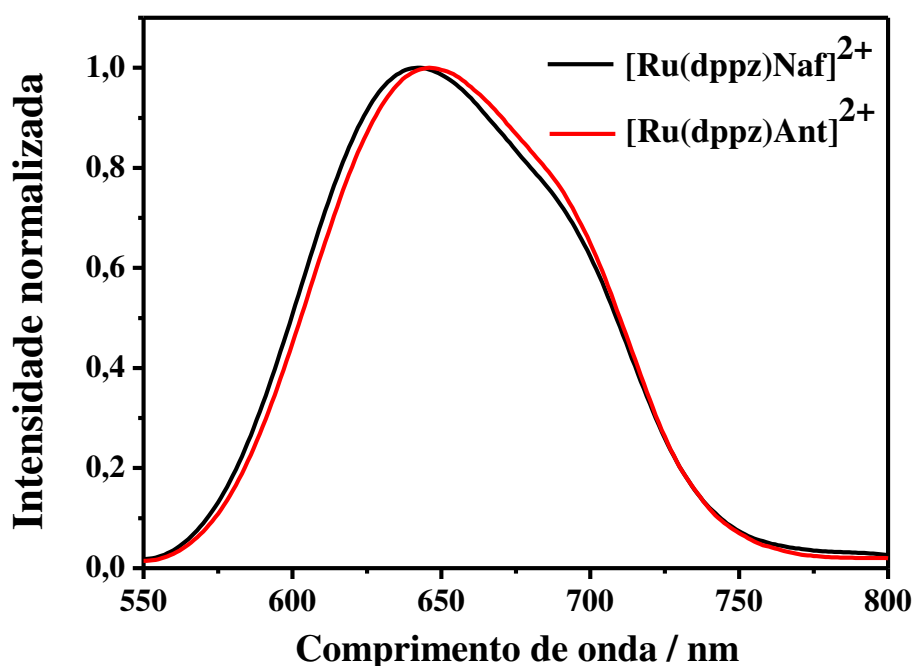
O estudo teórico, portanto, mapeou as energias e a distribuição dos orbitais moleculares de fronteira dos complexos, possibilitando o conhecimento da natureza e origem das transições eletrônicas de absorção observadas experimentalmente.

4.1.4 Espectroscopia de emissão

As propriedades luminescentes dos complexos foram estudadas, tanto no domínio da frequência quanto no tempo. Os espectros de emissão estacionária em acetonitrila para os dois complexos são apresentados na Figura 23. Quando os complexos em solução são excitados no máximo de absorção da banda de MLCT (~ 460 nm) verifica-se uma larga banda de emissão

em torno de 642 nm e 648 nm para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente. Tal perfil espectral é típico de sistemas polipiridínicos de rutênio (II) ^{2,65,66,68}, assim como para compostos com dppz em meio aprótico ^{1,15,14,69,16,10,64}. Os comprimentos de emissão máximo são deslocados para o vermelho com relação aos complexos $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (622nm) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (619 nm) no mesmo solvente ¹⁰. Semelhantemente ao comportamento observado nos espectros de absorção de UV-Vis, o deslocamento da energia de emissão poder ser racionalizado em termos da posição e natureza do substituinte nos anéis bipyridínicos (grupo amida). Estes, por sua vez, modulam a energia do estado ³MLCT e conseqüentemente, alteram o comprimento de onda de emissão ^{2,65,66}.

Figura 23 – Espectro de emissão normalizado (excitação de 460 nm) para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em acetonitrila, na concentração de $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C . $\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Determinou-se também os valores de rendimento quântico de emissão em solventes de diferentes polaridades. Os dados estão listados na Tabela 5.

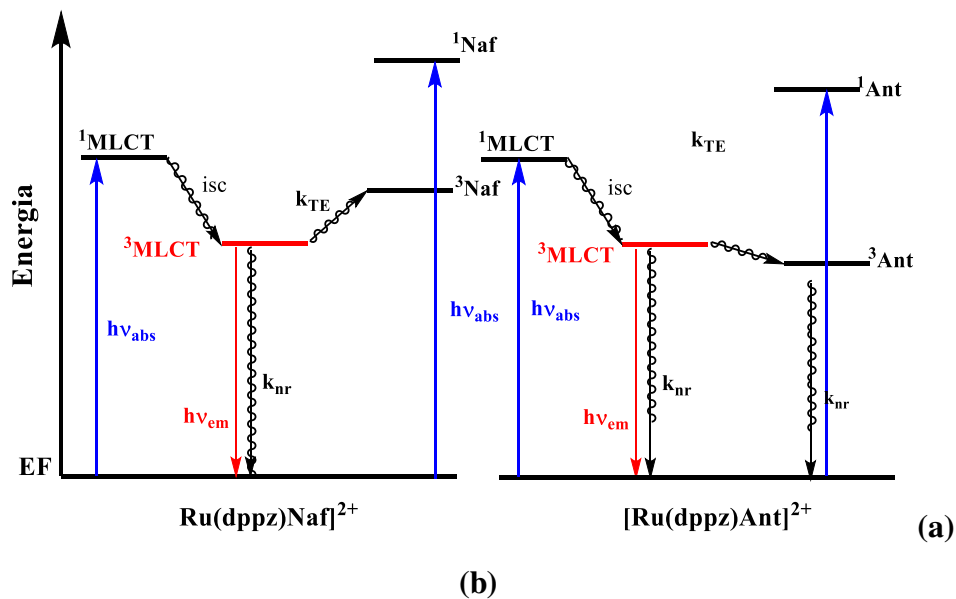
Tabela 5 – Rendimento quântico de emissão dos complexos em diferentes solventes.

Complexo	$\Phi_{em}(\lambda_{em}, nm)$				
	Água	Metanol	Acetonitrila	DMF	Diclorometano
[Ru(dppz)Naf] ²⁺	-	0,040 (645)	0,080 (642)	0,086 (655)	0,10 (615)
[Ru(dppz)Ant] ²⁺	-	0,0055 (655)	0,013 (648)	0,014 (660)	0,031 (627)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como é típico de complexos com ligante dppz, os compostos desse estudo não emitem a partir do estado ³MLCT em meio aquoso, devido a desativação desse estado via ligação de hidrogênio estabelecida entre o ligante dppz e água. Em metanol, observou-se emissão, entretanto, com rendimento quântico (Φ_{em}) menor do que nos solventes polares apróticos, como acetonitrila e dimetilformamida. Nota-se também que a luminescência apresenta efeito de solvatocromismo: à medida que a polaridade do solvente aumenta, um deslocamento batocrômico é observado. Em diclorometano, o solvente mais apolar da série, os valores de Φ_{em} são os mais elevados, indicando que os processos de desativação intramoleculares são minimizados². O complexo com o substituinte antracênil apresenta menor valor de Φ_{em} do que o complexo com naftil, pois o estado excitado tripleto do grupo antracênil (³Ant, 14900 cm⁻¹)⁶ encontra-se com energia inferior ao estado ³MLCT^{6,8,9,70}. Assim, essa significativa diferença nos rendimentos quânticos de emissão deve-se à maior população do estado ³Ant a partir do estado ³MLCT, uma vez que diferença de energia entre os dois é favorável a transferência de energia. A Figura 24 ilustra um diagrama de estados fundamentais e excitados, próprio de complexos de rutênio(II) bicromóforos^{6,8,9,65-70}.

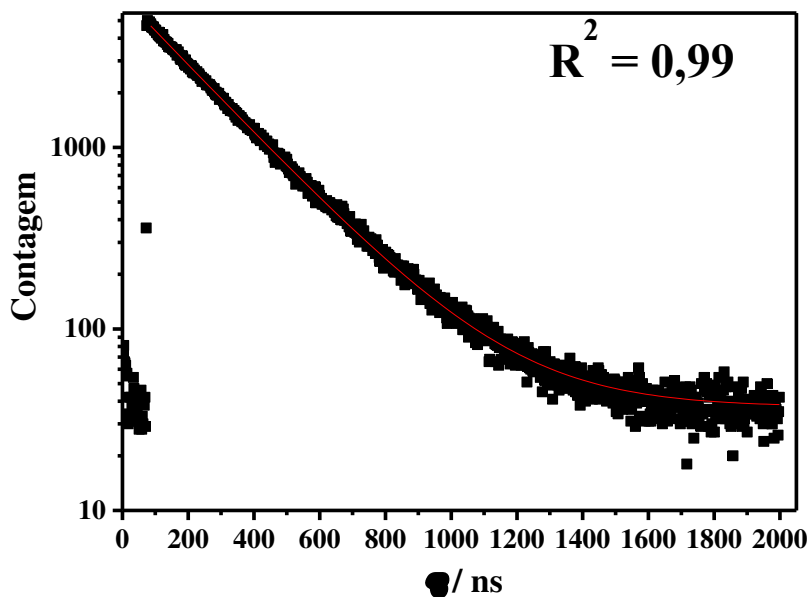
Figura 24 – Diagrama de níveis de energia para os bicromóforos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b). EF= Estado eletrônico fundamental.



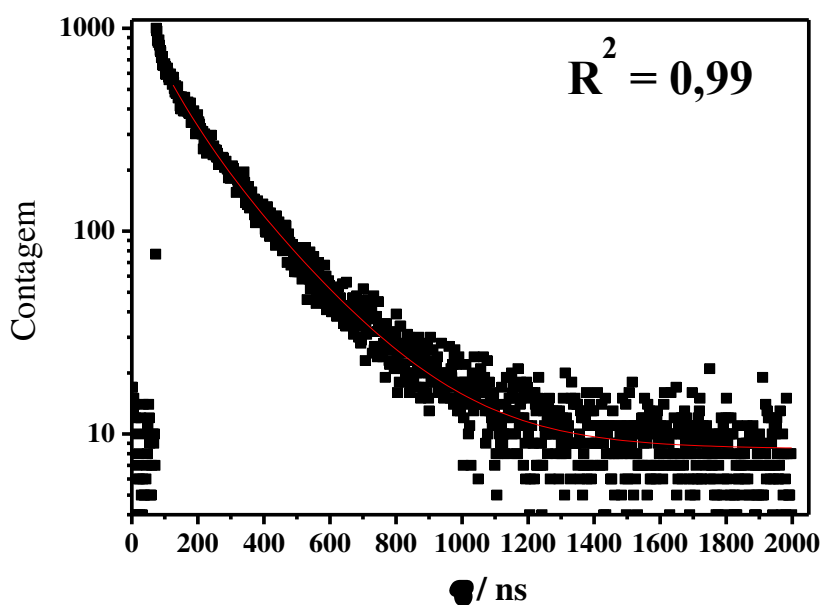
Fonte: Adaptado de WILSON, G. J.; SASSE, W.H.F.; MAU, A.W.-H. (51)

Os tempos de vida do estado excitado $^3\text{MLCT}$ em acetonitrila medidos pela técnica resolvida no tempo, foram de 229 e 225 ns para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente (Figura 25).

Figura 25 – Decaimento de luminescência dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução deareada de acetonitrila. $T = 298 \text{ K}$.



(a)



(b)

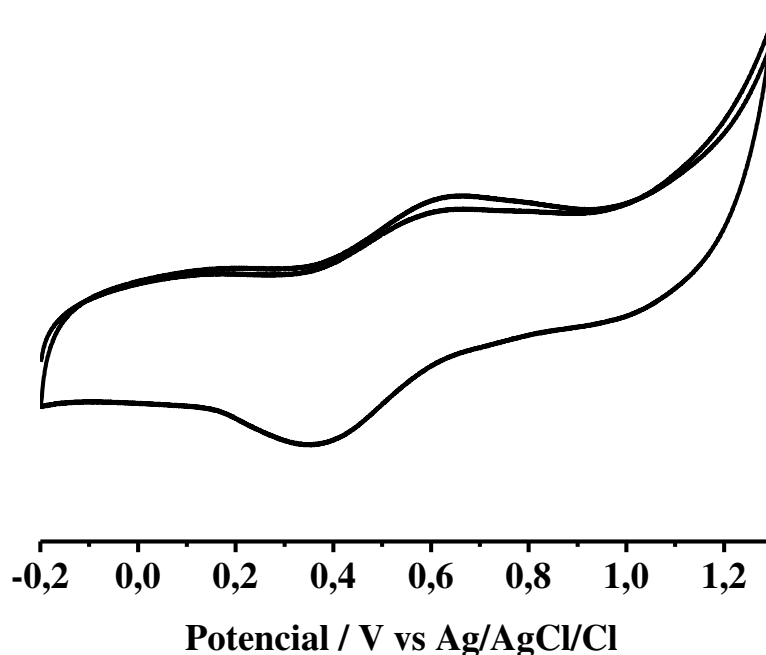
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os tempos de vida obtidos para os dois compostos são maiores do que para o $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ no mesmo solvente, cujo valor é igual 180 ns^{25} . O incremento desse tempo de vida pode ser explicado em termos de deslocalização do estado excitado eletrônico e redução da sobreposição dos estados vibracionais promovidos pelos grupamentos naftil e antracênil ^{65,71}.

4.1.5 Medidas eletroquímicas

O voltamograma cíclico em NaTFA 0,1 mol L⁻¹ em pH = 3,5 do precursor *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂] a 100 mV s⁻¹ está ilustrado na Figura 26. O processo associado ao par redox Ru^{III/II} mostrou-se *quasi*-reversível com E_{1/2} = 0,496 V vs Ag/AgCl. Esse valor é próximo do potencial de meia onda encontrado para o composto [Ru(bpy)₂Cl₂]⁴².

Figura 26 – Voltamograma cíclico a 100 mV s⁻¹ do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa contendo NaTFA 0,1mol L⁻¹, pH = 3,5, contendo o complexo *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂].

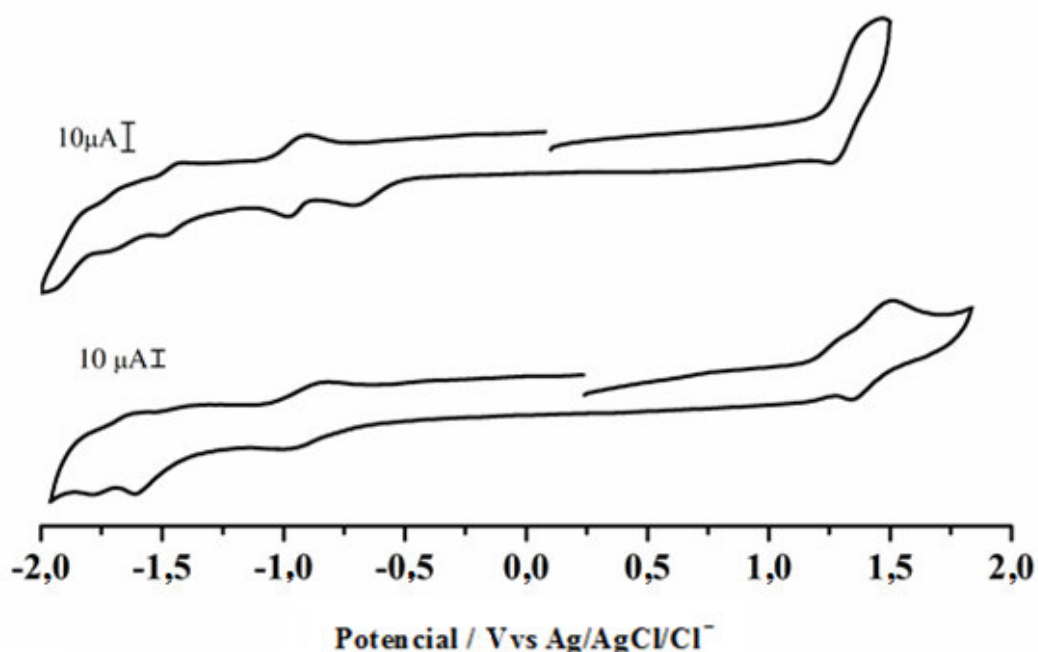


Fonte: Elaborada pelo autor.

Os potenciais de meia-onda do par redox Ru^{III/II} dos complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺ (Figura 27) são de +1,35 e +1,33 V, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os reportados na literatura para sistemas tris-bipiridínicos de rutênio(II)^{1,2,65,66}. O grande deslocamento de potencial ao complexo precursor ocorre devido a estabilização por retrodoação entre os orbitais π* antiligantes aceptores e os orbitais dπ do rutênio, após a coordenação do ligante bipiridínico modificado. Conseqüentemente, há uma grande deslocalização de densidade eletrônica do rutênio em direção aos ligantes^{2,66}, provocando deslocamento do potencial para valores mais positivos. É de se notar um processo de oxidação

adicional de caráter irreversível para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em +1,30 V. Um estudo de um sistema similar atribuiu esse processo à oxidação do ligante mbpy-Ant⁷². Além disso, o estudo de DFT realizado nesse trabalho aponta que o orbital HOMO do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ situa-se sobre a porção antracênica em -5,39 eV. Portanto, será mais provável a oxidação dos orbitais de caráter mbpy-Ant ocorrentes do processo referente ao par redox $\text{Ru}^{\text{III/II}}$, ao qual estão associados os orbitais HOMO-1 e HOMO-2.

Figura 27 – Voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo em solução de PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (topo) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (abaixo).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os processos redox relacionados a redução dos dois ligantes bipyridínicos e do dppz encontram-se na região do voltamograma de potenciais mais negativos. As reduções do ligante dppz por volta de -0,9 V, em ambos os complexos, corroboram com valores encontrados na literatura³⁰. É interessante notar que o complexo com o ligante mbpy-Naf apresenta um processo em -0,71 V, não presente no complexo com antraceno. Os resultados teóricos de DFT (Figuras 20, 21 e 22) apontam que o LUMO do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ reside no ligante mbpy-Naf (-3,02 eV), enquanto que no complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, no ligante dppz (-2,96 eV).

Os potenciais referentes aos processos redox do centro metálico e dos ligantes estão resumidos na Tabela 6.

Os dados voltamétricos são também fortes indicativos da coordenação dos ligantes mbpy-naf e mbpy-ant no complexo de partida, uma vez que houve um grande deslocamento do potencial redox. Podemos fazer uma correlação segura com os dados espectroscópicos ao considerar a mudança no valor do comprimento de onda de absorção máxima do complexo de partida *cis*-[Ru(bpy)(dppz)Cl₂] e o deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ para o azul nos complexos tris-bipiridínicos. Essa observação sugere fortemente a substituição dos dois ligantes Cl⁻ pelo terceiro ligante bipyridil (mbpy-Naf ou mbpy-Ant), fato refletido na alteração das propriedades espectroscópicas e redox dos produtos. Ademais, os dados experimentais voltamétricos corroboram em grande medida com o estudo de DFT.

Tabela 6 – Dados voltamétricos dos complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺.

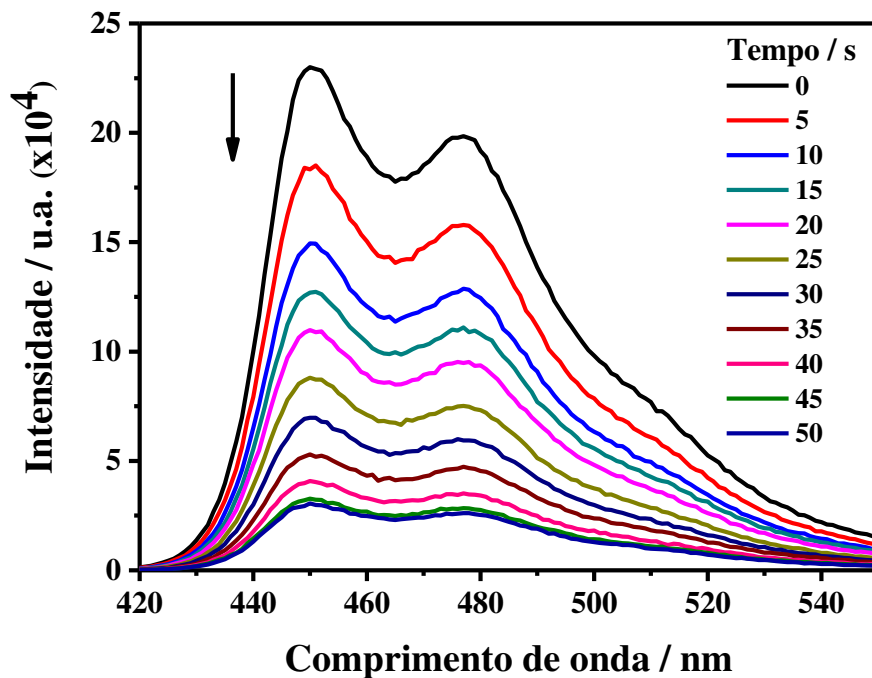
Complexo	mbpy-L ⁻	E _{1/2} / V vs Ag/AgCl/Cl	E _{1/2} / V vs Ag/AgCl/Cl			
			Ru ^{III/II}	Redução dos ligantes		
[Ru(dppz)Naf] ²⁺	-	+1,35	-0,71	-0,96	-1,45	-1,71
[Ru(dppz)Ant] ²⁺	+1,30	+1,33	-	-0,93	-1,54	-1,74

Fonte: Elaborada pelo autor.

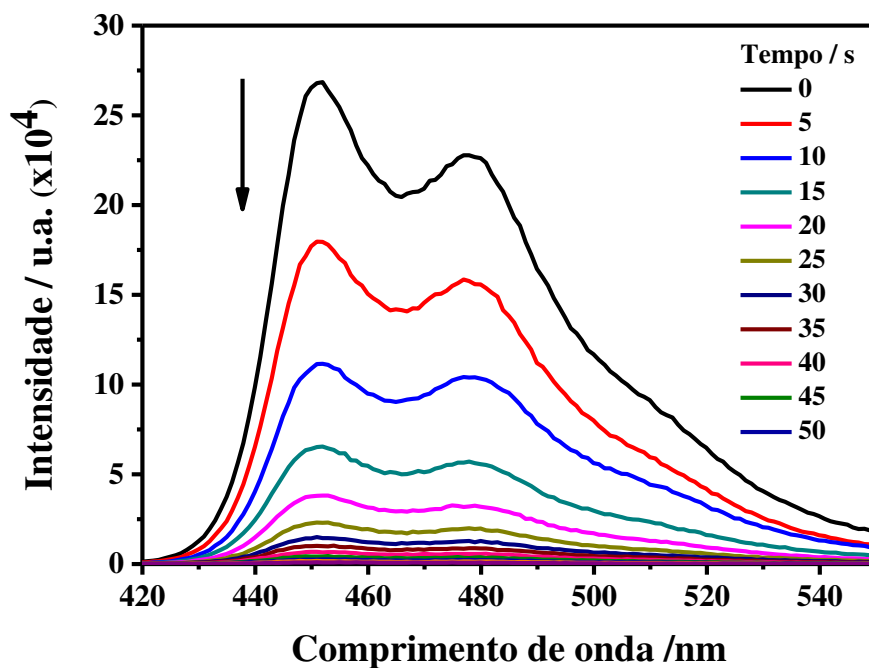
4.1.6 Geração de oxigênio singlete

A geração de oxigênio singlete (¹O₂) foi monitorada pela reação do composto 1,3 difenilbenzofurano (DPBF) com a possível geração da espécie ¹O₂ produzida pelos complexos sob irradiação. O consumo de DPBF pode ser quantificado pela diminuição da sua fluorescência, no máximo de emissão em 474,9 nm. Os espectros da fotodegradação do DPBF irradiado com LED azul são apresentados na Figura 28. As curvas cinéticas estão ilustradas na Figura 29. Para fins comparativos, utilizou-se o complexo [Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺ para verificar a influência dos grupos naftil e antracênil presentes nos complexos desse estudo.

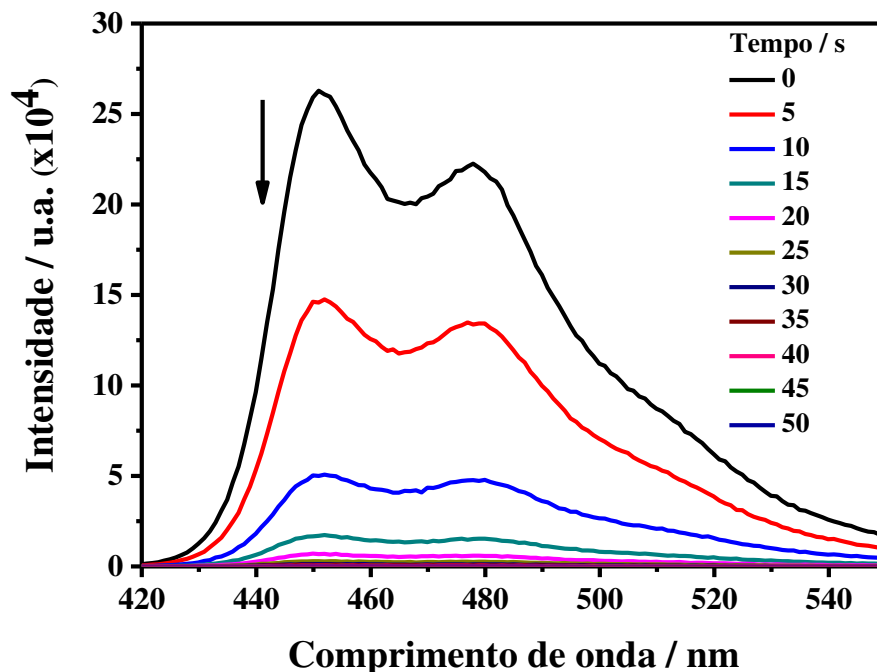
Figura 28 – Espectro de fluorescência relativo ao consumo de DPBF em etanol sob irradiação com LED azul na presença de $20\mu\text{mol.L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (a) , $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (b) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. $\lambda_{\text{exc}} = 410\text{ nm}$.



(a)



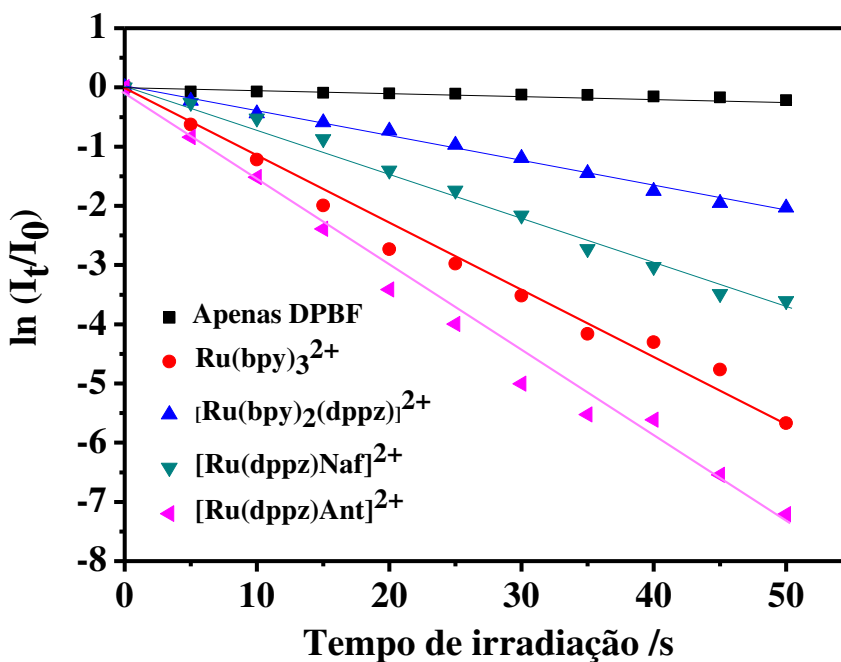
(b)



(c)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 – Curva cinética do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul).



Fonte: Elaborada pelo autor.

É bastante evidente a maior produção de $^1\text{O}_2$ com o tempo para os compostos funcionalizados quando comparados com o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (Figura 28). Os

valores de Φ_{Δ} são significativos ($>0,50$), especialmente para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ com maior valor de geração de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta} = 0,96$), provavelmente em função da participação do estado excitado tripleto ^3Ant (populado via estado $^3\text{MLCT}$) nos processos de transferência de energia intra e intermolecular (Figura 22). Esse estado propicia um eficiente canal de transferência de energia para excitar $^3\text{O}_2$ em função das proximidades de seus níveis energéticos^{6,70,9,73}. Baseado nos valores de Φ_{Δ} , pode-se afirmar que há influência dos conjugados aromáticos na formação de $^1\text{O}_2$. Comportamento similar já foi observado em complexos carboxilados com os mesmos ligantes amida¹¹. Todos os valores de Φ_{Δ} estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) sob irradiação no azul ($\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$).

Complexo	Φ_{Δ}
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$	0,29
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$	0,66
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$	0,96

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Estudo de interação com DNA

4.2.1 Constante de ligação (K_b) DNA-Complexo

A magnitude da interação entre os complexos metálicos e o DNA pode ser estimada através do cálculo das constantes intrínsecas de ligação (K_b). Estas, por sua vez, foram determinadas por titulação espectrofotométrica (absorção no UV-Vis) dos complexos com *calif thymus* DNA (CT DNA).

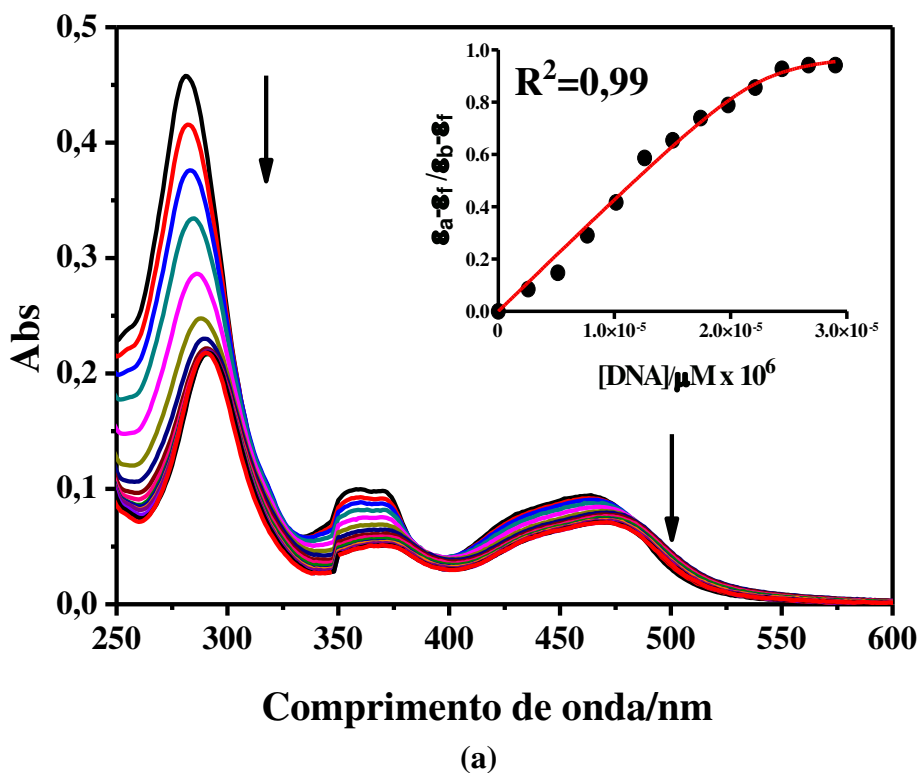
A adição de DNA provoca um forte hipocroísmo (ΔH) e um sutil deslocamento para o vermelho das bandas de absorção MLCT e intraligantes dos complexos (Figura 30). Os valores de hipocroísmo e deslocamento batocrômico foram de 23 % e 16 nm para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e 20 % e 15 nm para o $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. A obtenção dos valores de K_b , foi alcançada empregando-se a equação (5) para o ajuste dos dados experimentais³³.

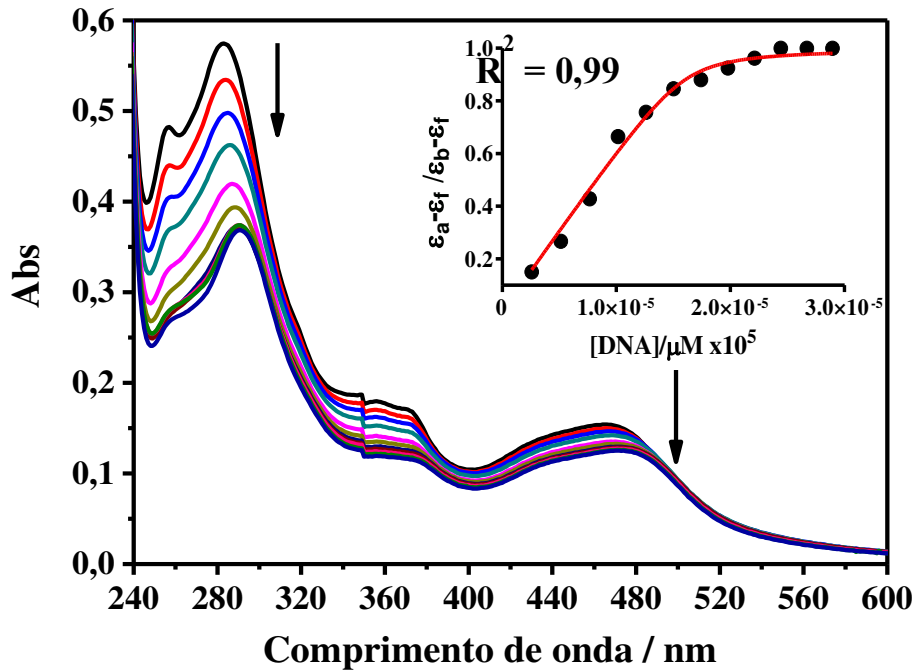
As constantes calculadas dos complexos foram de $6,83 (\pm 0,3) \times 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($s = 1,1$) e $6,04 (\pm 0,2) \times 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($s = 0,8$) para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$,

respectivamente. Esses resultados corroboram com os valores típicos encontrados para intercaladores ($K_b > 10^6$). Comparativamente aos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ($K_b = 3,2 \times 10^6$)⁷⁴ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ($K_b = 2,1 \times 10^6$)^{75,76}, as constantes de ligação mostraram-se um pouco maiores, provavelmente em função de uma interação π - π *stacking* mais efetiva, influenciada pelos grupos naftil e antracênil. Além disso, esses resultados sugerem que esses volumosos grupos aromáticos podem oferecer maior proteção aos nitrogênios fenazínicos do dppz em relação às moléculas de água, favorecendo as interações π no microambiente de bases nitrogenadas.

Figura 30 – Espectro de absorção dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) na presença de diferentes quantidades de CT DNA.

Inset: gráfico de $(\epsilon_a - \epsilon_f) / (\epsilon_b - \epsilon_f)$ vs [DNA].





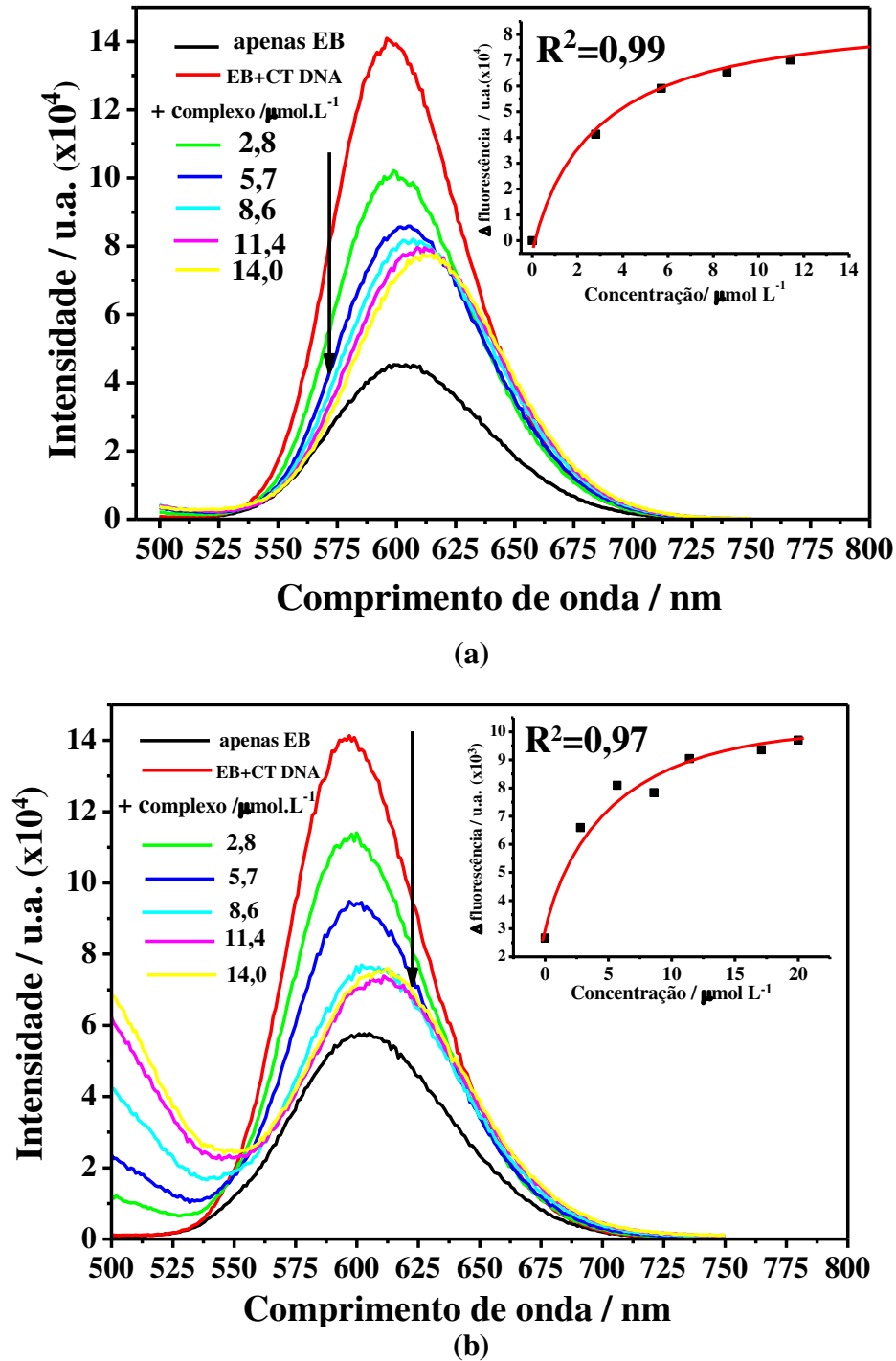
(b)

Fonte: Elaborad pelo autor.

4.2.2 Competição com brometo de etídio (EB)

Para confirmar a natureza de interação entre DNA e complexos, estudamos a capacidade competitiva dos complexos com o sistema EB-CT DNA (Figura 31). Brometo de etídio é um conhecido intercalador de DNA utilizado como competidor com agentes intercalantes. O EB apresenta baixa luminescência em solução aquosa, contudo, quando moléculas de EB intercalam em DNA, a intensidade luminescente aumenta significativamente. O deslocamento e intensidade da banda do aduto EB-CT DNA foi monitorado por titulação dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$.

Figura 31 – Espectro de fluorescência de EB ($\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$) na presença de DNA a diferentes concentrações de complexos ($0\text{-}14\mu\text{molL}^{-1}$). $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b), $[\text{EB}] = 3\mu\text{molL}^{-1}$. Inset: curvas de titulação experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A banda fluorescente em 600 nm corresponde apenas a luminescência do EB (linha preta) em solução aquosa. Todavia, quando DNA é adicionado a solução, essa banda desloca-se para 595 nm (linha vermelha) em decorrência da formação do aduto EB-DNA, aumentando também sua intensidade em aproximadamente 3 vezes. A banda do aduto é suprimida após adição dos complexos, indicando a ocorrência do fenômeno de competição entre bicromóforos de rutênio e EB pelos sítios de intercalação do DNA.

As constantes aparentes de dissociação (${}^{\text{app}}K_d^{\text{L}}$) relativas aos complexos foram determinadas a fim de obtermos as constantes reais de dissociação (K_d). Esses dados foram extraídos da equação 7, e os valores obtidos de K_d para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ foram, respectivamente, $0,106 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,177 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Esses resultados estão razoavelmente próximos daqueles obtidos por titulação em UV-vis, cuja as constantes de dissociação são $0,146 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,166 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente.

Devemos, no entanto, utilizar cautela ao analisarmos esses dados, uma vez que os dois compostos de rutênio emitem próximo ao máximo de emissão do EB em solução. Neste caso não é observado a diminuição total da intensidade da banda referente aduto, visto que a luminescência dos próprios complexos também pode contribuir para a emissão total dos espectros. Contudo, esses resultados obtidos por fluorescência, juntamente corroborados com os de UV-Vis, confirmam a natureza da interação intercalativa em DNA dos compostos em estudo.

4.2.3 Tempo de vida do estado excitado com DNA

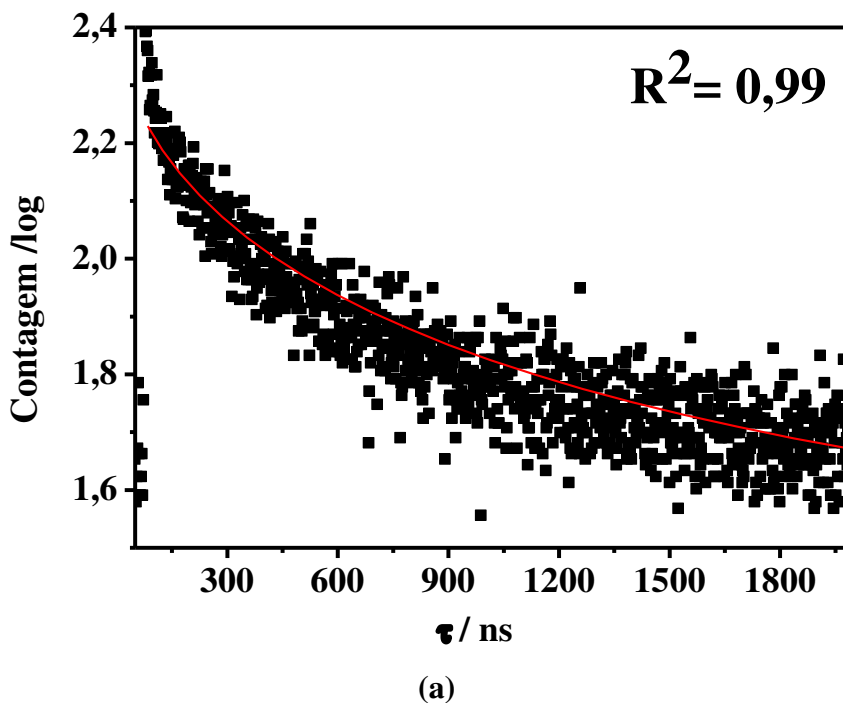
Já foi mencionado que complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ não emitem em água devido à enorme diminuição do tempo de vida do estado ${}^3\text{MLCT}^{15,14,16,64}$. Quando inseridos entre os pares de bases nitrogenadas ocorre a proteção dos nitrogênios fenazínicos do dppz, prolongando a existência do estado ${}^3\text{MLCT}$ e, conseqüentemente, emissão é observada.

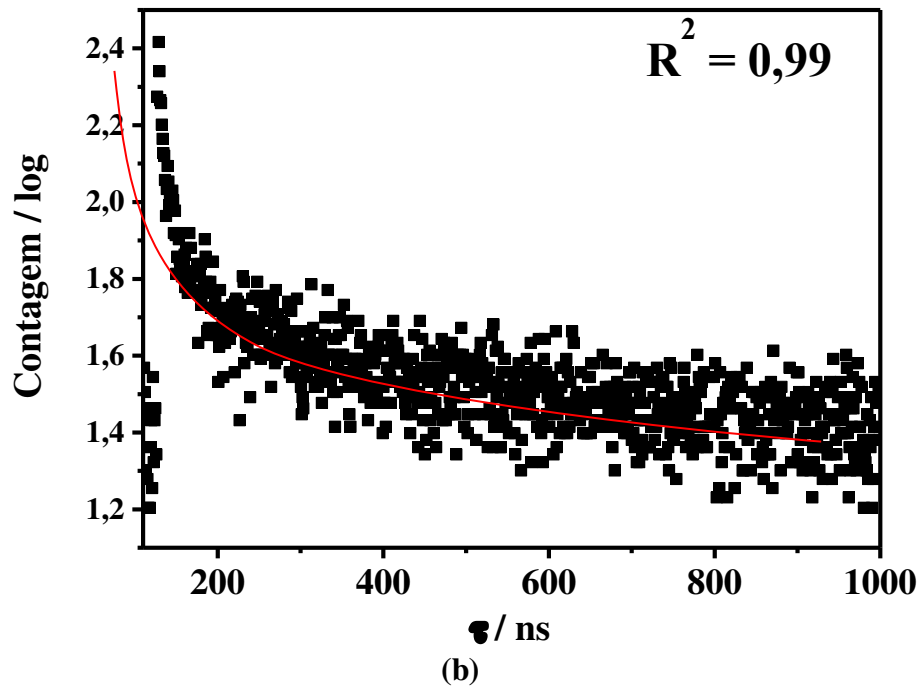
O complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ apresenta uma fraquíssima luminescência em água, contrariamente do complexo com antracênil que não é emissivo no mesmo solvente, assim como o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$. Quando CT DNA é adicionado, ocorre o aparecimento da banda de emissão, sendo possível detectar o tempo de vida do estado ${}^3\text{MLCT}$ por luminescência resolvida no tempo. Tal comportamento é típico de complexos polipiridínicos de rutênio (II) portando dppz ^{15,14,25}. Os decaimentos biexponenciais dos complexos com DNA

(Figura 32) são de 18 (τ_1) e 425 ns (τ_2) com o $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e 6 (τ_1) e 160 ns (τ_2) para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. A componente longa do decaimento é provavelmente decorrente de um interação frontal do dppz e os pares de base do DNA⁷⁷⁻⁷⁹. A componente curta é oriunda da interação lateral do dppz; esse modo favorece a exposição de um dos nitrogênios fenazínicos, permitindo que moléculas de água interajam com os nitrogênios, contribuindo significativamente para a supressão do estado ³MLCT.

Embora os diferentes valores de τ não corroborem com a tendência observada para os valores de K_b (provavelmente em função das significativas diferenças nos rendimentos quânticos de emissão entre os complexos), o aumento substancial do tempo de vida do ³MLCT reforça a intercalação como o modo predominante de ligação entre os complexos e DNA.

Figura 32 – Luminescência resolvida no tempo dos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) na presença de DNA em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. $[\text{Ru}] = 12 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CT DNA}] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pares de base.





Fonte: Elaborada pelo autor.

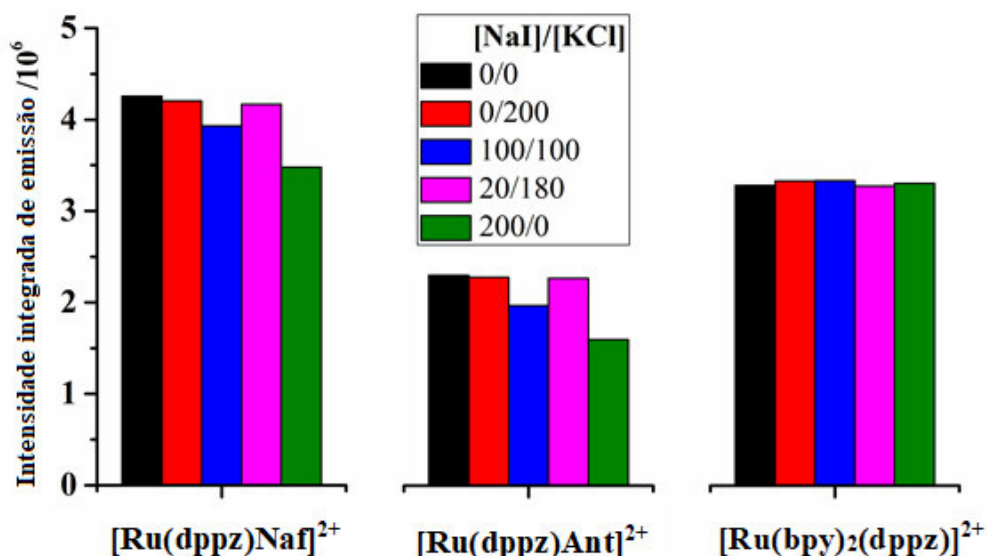
4.2.4 Estudo de interação por sulcos

Além do modo de interação por pares de base em DNA, os complexos polipidínicos de rutênio (II) também podem combinar essa interação com a entrada de suas moléculas nos sulcos do DNA^{28,12}. Para investigar a afinidade dos complexos pelos sulcos do DNA, foi utilizado iodeto de sódio e dois compostos seletivos de sulco maior (*methyl green*) e menor (reagente de Hoechst).

A utilização de ânions supressores de luminescência é um modo de explorar a ligação de moléculas aos sulcos de DNA. Íons iodeto podem suprimir a luminescência dos complexos de rutênio ligado ao DNA, fornecendo assim informação acerca do grau de proteção da cadeia aniônica da macromolécula ao complexo ligado²⁸.

O DNA do tipo B (B-DNA) apresenta regiões bastante distintas, onde o sulco maior é mais acessível do que o sulco menor. Espera-se, portanto, uma supressão mais eficiente por parte de I^- , caso o complexo interaja no sulco maior. Para avaliar também a força iônica, KCl, um sal não-supressor, também foi utilizado no experimento, juntamente com os complexos. A Figura 33 ilustra a intensidade integrada da luminescência dos complexos ligados a DNA e na presença iodeto e KCl em diferentes proporções.

Figura 33 – Intensidade integrada de emissão dos complexos na presença de CT DNA a diferentes concentrações de NaI e KCl. $[\text{Ru}] = 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{CT DNA}] = 200 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

É interessante observar que nenhuma alteração significativa na luminescência foi causada por KCl ou NaI. Este comportamento foi ainda validado usando $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ como um controle, onde também não houve alteração luminescente significativa. Notavelmente, esse comportamento foi diferente para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ como relatado em outros trabalhos, provavelmente devido à diferente sequência de DNA utilizada. Lim e colaboradores relataram este tipo de estudo para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ usando pequenas sequências de oligonucleotídeos²⁸. Recentemente, estudos espectroscópicos em solução evidenciaram que o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ se liga ao DNA via sulco menor²⁷. Essa constatação é sustentada por dados de estrutura de raios-X⁸⁰⁻⁸². Nossos resultados sugerem também que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ se liga ao sulco menor do DNA, onde uma menor acessibilidade do ânion I^- evitaria uma supressão maior de sua emissão em solução. Comparativamente, a emissão dos complexos funcionalizados tende a ser menor em maiores quantidades de iodeto, sugerindo que eles interagem com o DNA também através do sulco menor (Figura 33).

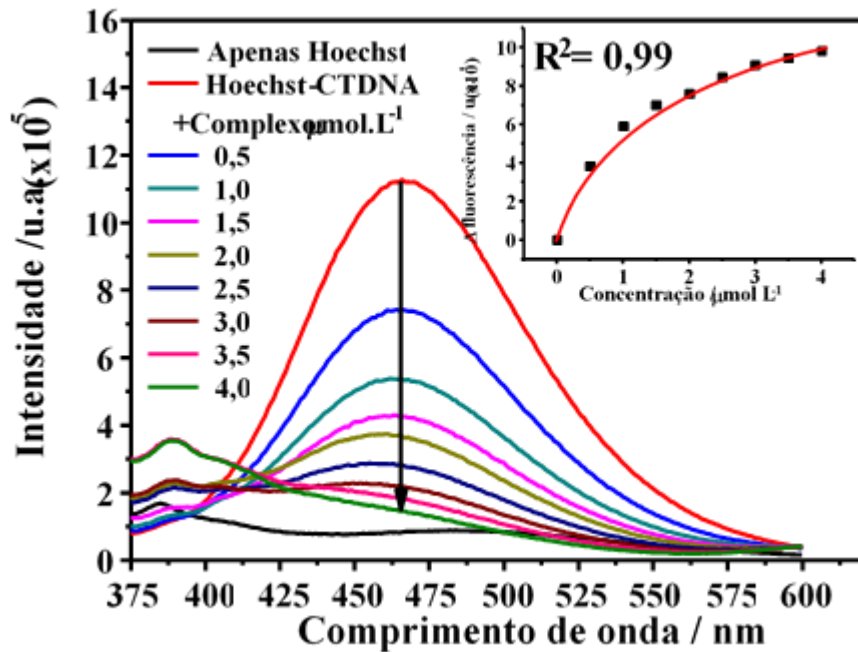
Para reforçar ainda a presença desse modo de ligação dos complexos ao DNA, testamos a capacidade de competição dos compostos *methyl green* e reagente de Hoechst como moléculas seletivas ao sulco maior e menor da molécula de DNA, respectivamente^{81,82}. A

intensidade de luminescência do composto Hoechst ligada ao CT DNA diminuiu significativamente após a adição dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (Figura 34), indicando a preferência de ambos os complexos pelo sulco menor, de acordo com o experimento anterior utilizando iodeto de sódio.

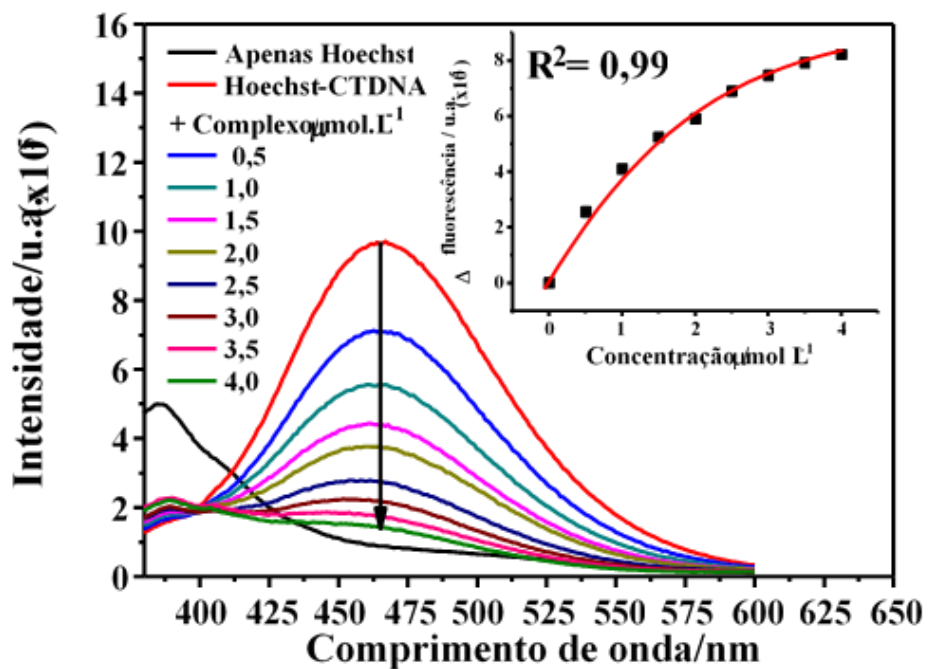
Os valores de ${}^{\text{app}}K_d$ aparente calculado para os complexos durante a competição com Hoechst foi $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente. Usando a equação 4 e a ligação de Hoechst ao CT-DNA (K_d igual a $0,140 \mu\text{mol L}^{-1}$), estimamos um K_d de $0,050 \mu\text{mol L}^{-1}$ para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e para o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ igual a $0,095 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esses resultados sugerem que o complexo funcionalizado com naftil compete ligeiramente melhor com Hoechst do que aquele com antracênil. Essas medidas corroboram com aquelas realizadas em UV-Vis, onde $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ liga-se ligeiramente com mais intensidade em CT DNA do que $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$.

Como experimento controle, o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ também foi empregado nesse experimento (Figura 34(c)) e apresentou também atividade competitiva com Hoechst. Essa observação reforça a ideia de que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ tende a se ligar entre as bases nitrogenadas preferencialmente pelo sulco menor, conforme já relatado na literatura^{28,12,79}. O K_d estimado nesse experimento foi de $0,72 \mu\text{mol.L}^{-1}$, indicando que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ estabelece-se no sulco menor menos fortemente do que os bicromóforos aqui estudados.

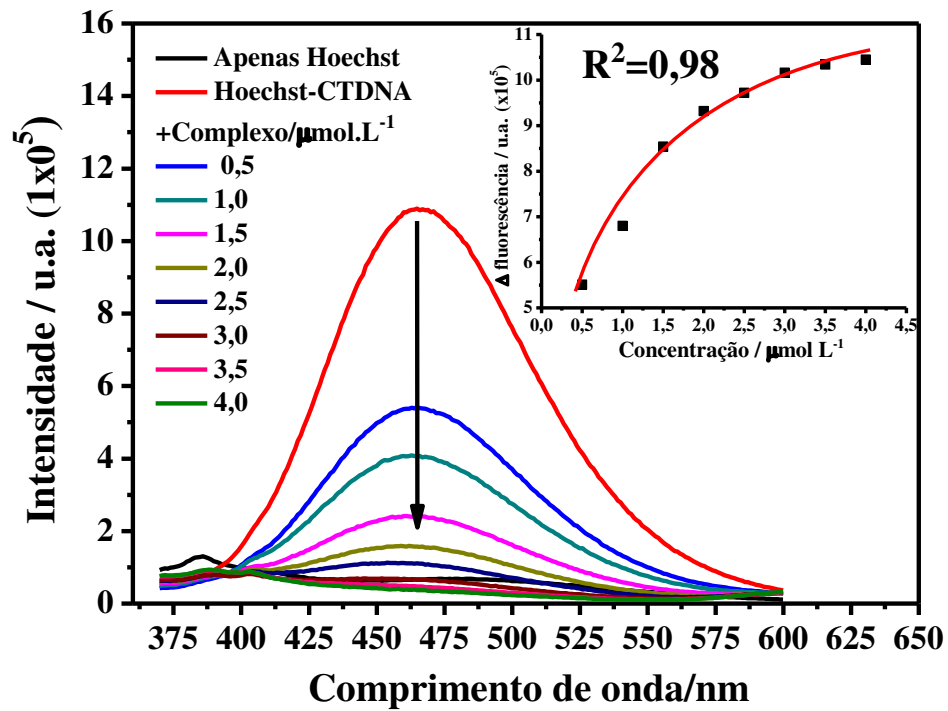
Figura 34 – Espectro de emissão do Hoechst na presença de CT DNA a diferentes concentrações de complexos ($0-4\mu\text{mol.L}^{-1}$), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (c). $[\text{Hoechst}] = 3\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{CT DNA}] = 10\mu\text{mol.L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 340\text{ nm}$.



(a)



(b)

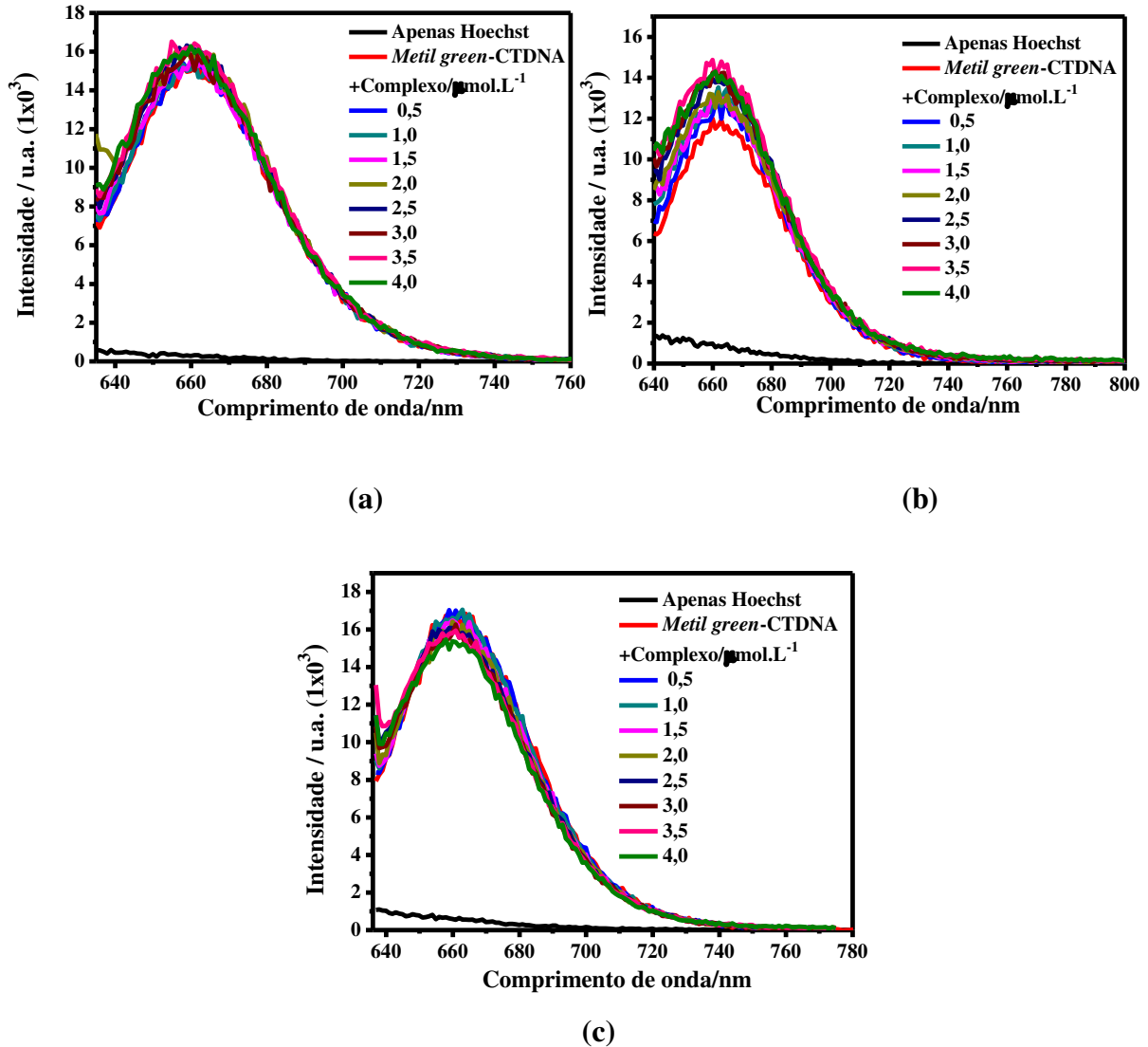


(c)

Fonte: Elaborada pelo autor.

O experimento com *methyl green* não evidenciou nenhuma interação por sulco maior para nenhum dos três complexos de rutênio (Figura 35), visto que as intensidades dos espectros das soluções contendo *methyl green* não sofreram mudanças significativas após a adição dos complexos.

Figura 35 – Espectro de emissão do *methyl green* na presença de CT DNA a diferentes concentrações de complexos ($0-3\mu\text{mol L}^{-1}$), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (c), $[\text{Methyl green}] = 3\mu\text{molL}^{-1}$ e $[\text{CT DNA}] = 10\mu\text{molL}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 340\text{ nm}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

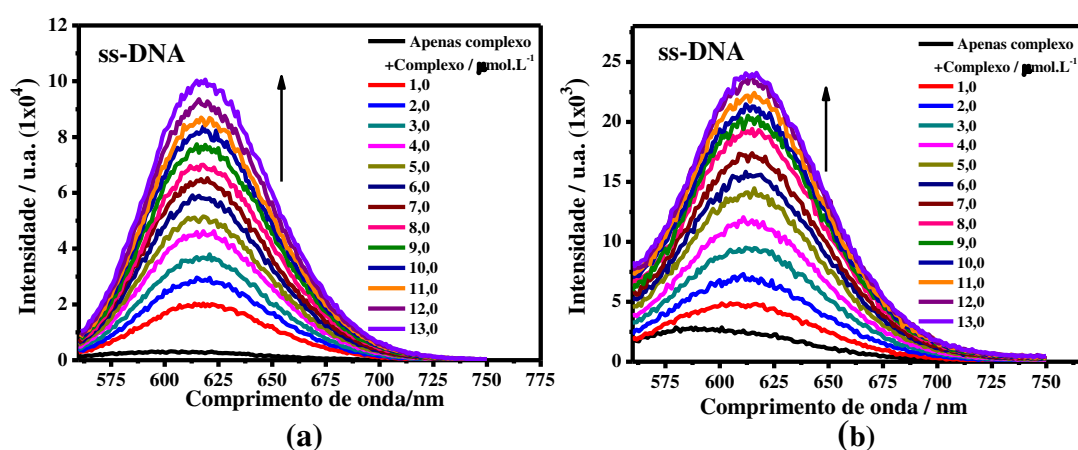
Em síntese, ficou evidente que os complexos funcionalizados intercalam, preferencialmente, via sulco menor, sendo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ melhores competidores do que o $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$, sugerindo que a presença de fragmentos aromáticos nos ligantes auxiliares pode, provavelmente, alterar sutilmente o modo e a intensidade das forças de interação entre DNA.

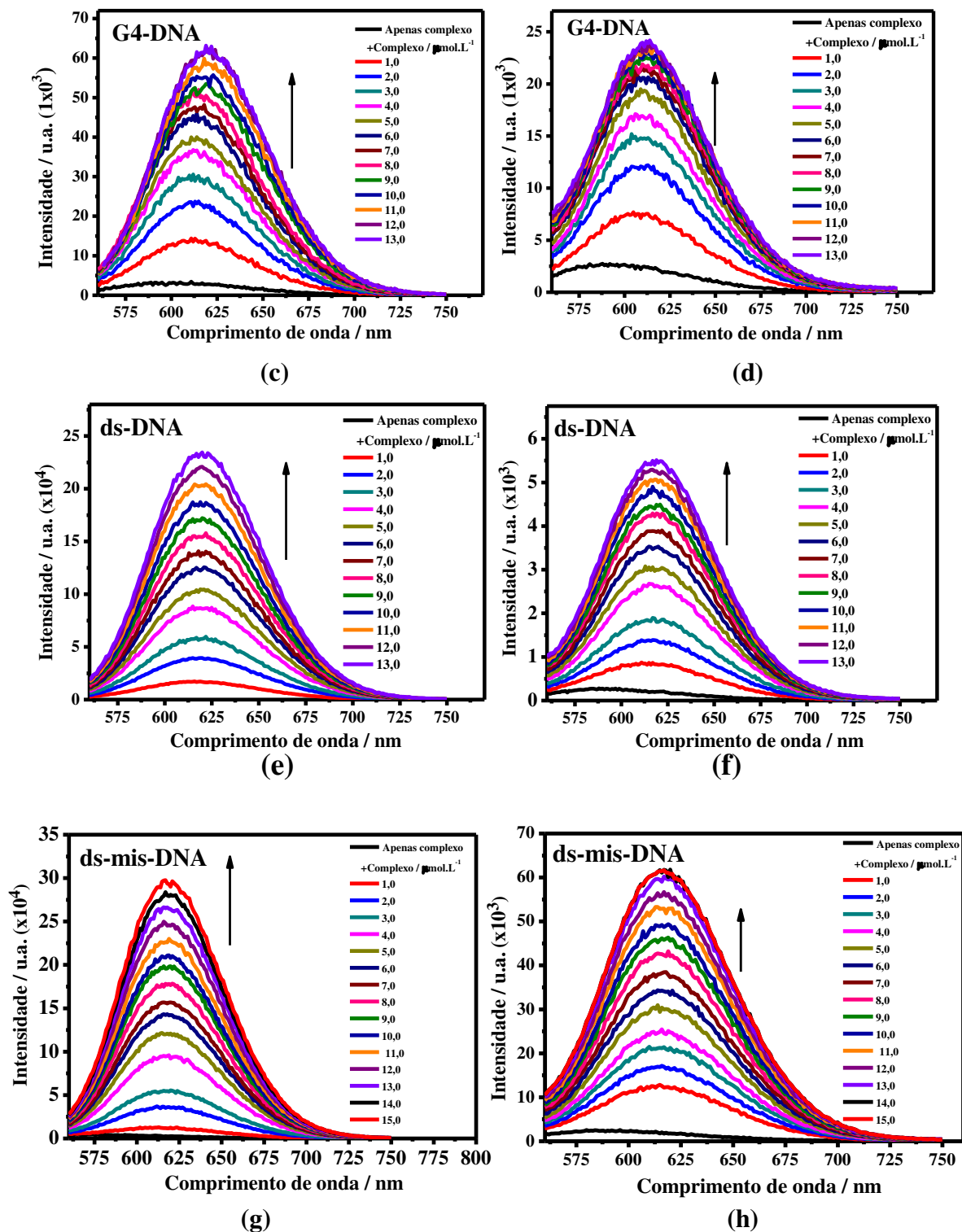
4.2.5 Estudo com G-quadruplex e oligonucleotídeos

G-quadruplex (G4-DNA) é um tipo de estrutura de DNA consistindo de quatro bases guaninas ligadas por pontes de Hoogsteen e estabilizadas por cátions monovalentes, tais como K^+ ou Na^+ . Mais de 400.000 sequências ricas em guanina foram identificadas no genoma humano como potenciais estruturas para formar G-quadruplexes^{13,83-86}. Mais de 85% das células cancerígenas dependem do alongamento do DNA telomérico para dividirem-se através da proteína telomerase^{13,83-86}. Uma molécula capaz de estabilizar esse tipo de estrutura presente nos telômeros, seria de grande valor diagnóstico e terapêutico contra câncer. A afinidade dos complexos preparados frente a esse tipo de DNA foi verificada por espectroscopia de emissão.

Além do G4-DNA, também foi investigado a interação dos complexos metálicos a forma precursora do quadruplex (HTG21:GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) e a um DNA de fita única (*single strand* DNA: ss-DNA). Além disso, utilizou-se também a sequência de fita única com pares de base não complementares (GGAGTGTTCCCGTGTGAT) para verificar a seletividade dos complexos a erros sequenciais. Para cada sequência de fita única foi preparada a respectiva forma de dupla hélice (*double stranded* DNA: ds-dna) complementar (ds-DNA) e não complementar (ds-mis-DNA). Para obtermos parâmetros quantitativos, os espectros foram obtidos através das titulações entre complexo e DNA, sendo os complexos adicionados à solução em concentrações progressivas e posteriormente subtraída emissão na ausência de DNA para cálculos de afinidade. Os espectros de luminescência dos complexos na presença dos oligonucleotídeos estão representados nas (Figura 36).

Figura 36 – Espectros de emissão dos complexos $[Ru(dppz)Naf]^{2+}$ (a),(c),(e),(g) e $[Ru(dppz)Ant]^{2+}$ (b),(d),(f),(h) na presença de diferentes oligonucleotídeos em tampão Tris-HCl 10 mmol.L^{-1} , H 7,4. $[Ru] = 0-13\ \mu\text{mol.L}^{-1}$, $[DNA] = 5\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pares de base.





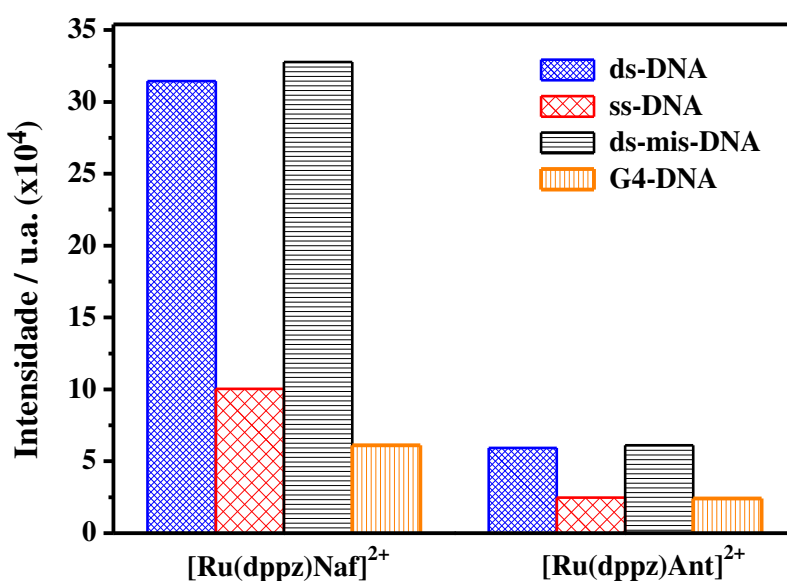
Fonte: Elaborada pelo autor.

Curiosamente, o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ mostrou uma luminescência mensurável, mesmo sem DNA, como mencionado anteriormente. Isso contrasta com outros complexos de rutênio contendo ligante dppz, frequentemente descritos como *light switches*⁶⁴. Por outro lado, o complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ não mostrou nenhuma emissão significativa na

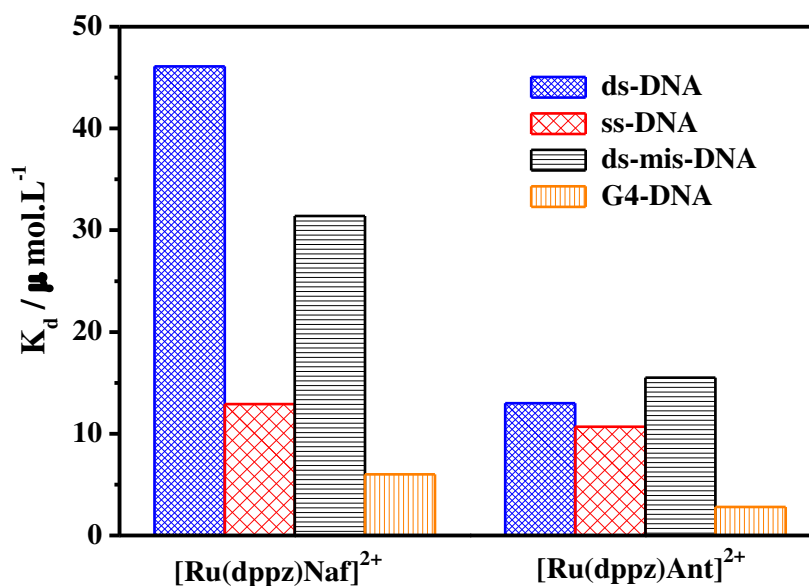
ausência de DNA, porém, exibiu uma forte emissão após adição de DNA. Para ambos os compostos a emissão relativa foi significativamente aumentada na presença das sequências de oligonucleotídeos estudadas. Em todos os casos, em comparação com o complexo antracênil, o $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ apresentou melhor emissão após adição de DNA (Figura 37(a)). Ambos os complexos apresentaram a seguinte tendência em relação à emissão máxima após adição de DNA: ds-DNA \sim ds-mis-DNA $>$ ss-DNA \sim G4-DNA.

É interessante ressaltar que para fins interpretativos K_d e K_b são inversamente proporcionais, ou seja, um elevado valor de K_d a uma determinada sequência, indica um valor baixo de K_b , indicando menos afinidade. Portanto, como demonstrado na Figura 37 (b), ambos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ apresentam menores valores de K_d frente ao G4-DNA do que ao ss-DNA (forma precursora do quadruplex), expressando por esses valores maior afinidade na interação com essas sequências, isto é, maiores valores de K_b .

Figura 37 - (a) Intensidade integrada dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ na presença de diferentes oligonucleotídeos. (b) Constantes de dissociação dos complexos na presença de diferentes oligonucleotídeos. Medidas realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 a 25°C.



(a)

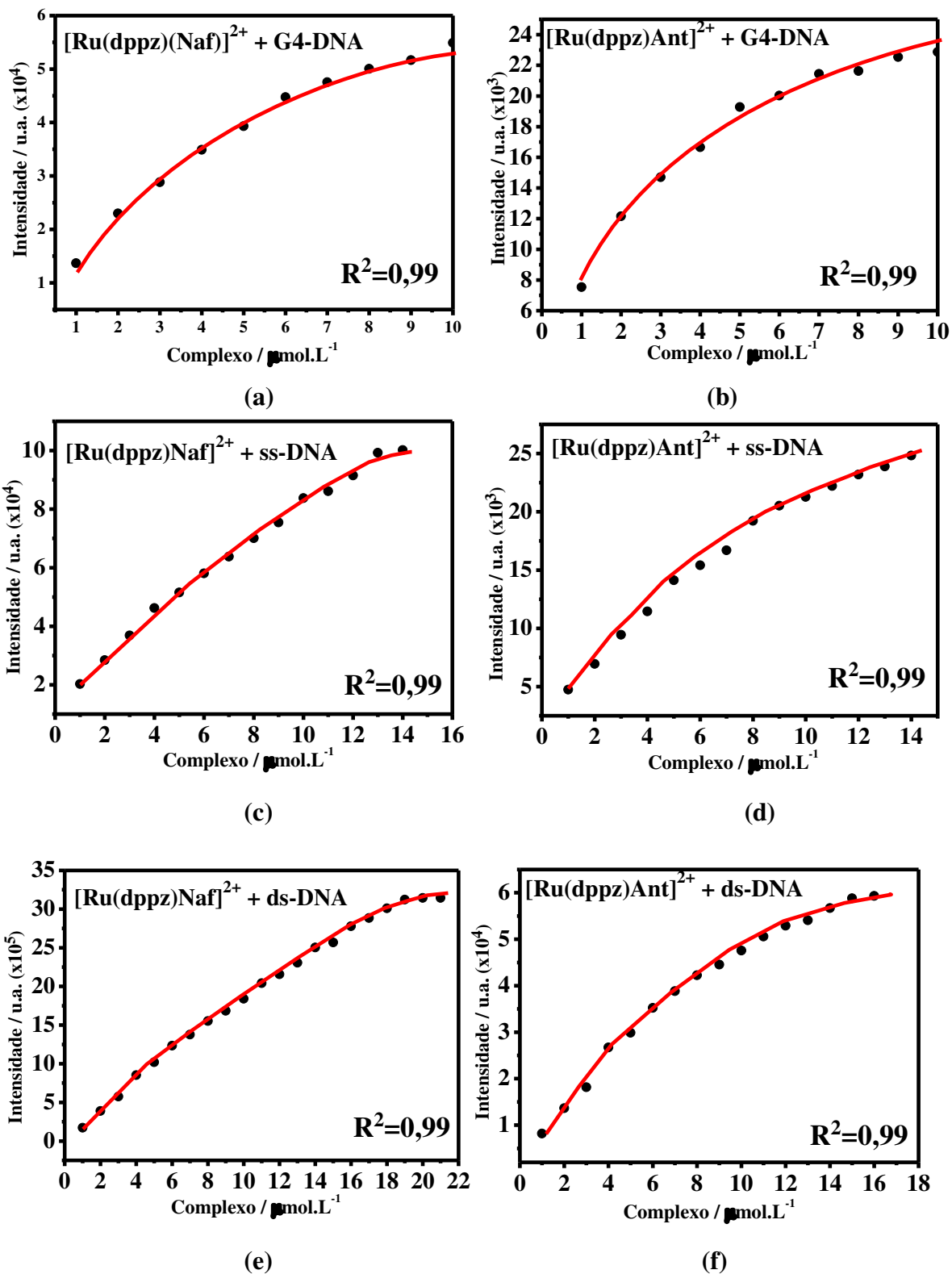


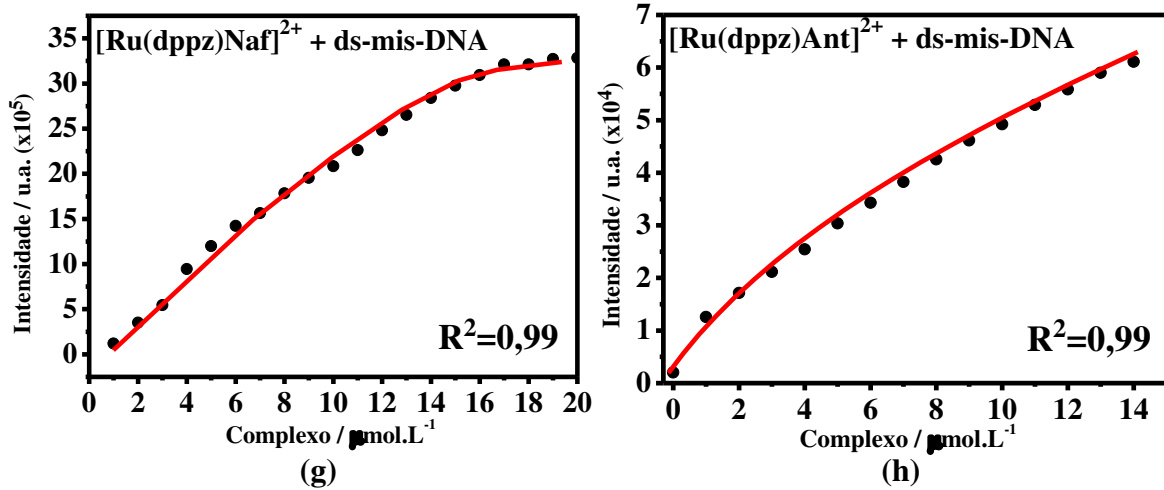
(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como observado, ds-DNA levou à emissão mais forte e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ emitiu aproximadamente 5 vezes mais do que $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. Aparentemente, ambos os compostos não conseguem distinguir a sequência que não apresenta erro de complementariedade na dupla fita (*GC match*, presente no ds-DNA) da sequência com erro de pareamento (*CC mismatch*, presente no ds-mis-DNA). Como dito anteriormente, a equação 7 foi utilizada para analisar as curvas de titulação afim de obtermos os valores de K_d dos complexos na presença dos diferentes tipos de DNA. As curvas de titulação são apresentadas na Figura 38 e os valores de K_d para os diferentes tipos de DNA estudados, estão reunidos na Tabela 8.

Figura 38 – Curvas de titulação para os oligonucleotídeos ($5\mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença dos complexos, em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4. Para G4-DNA (a)-(b), ss-DNA (c)-(d), ds-DNA (e)-(f) e ds-mis-DNA (g)-(h).





Fonte: Elaborada pelo autor.

É importante notar que a emissão máxima não pode ser usada diretamente como critério para uma estabilidade termodinâmica, uma vez que os valores de constante de dissociação (K_d) não são diretamente proporcionais aos valores máximos de emissão.

Tabela 8 – Constantes de dissociação para os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$.

Estrutura de DNA	K_d ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$
G-quadruplex (G4-DNA)	$6,0 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,1$
DNA de fita única (ss-DNA)	$12,9 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,1$
DNA de fita dupla (ds-DNA)	$46,1 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,2$
DNA de fita não-complementar (ds-mis-DNA)	$31,4 \pm 0,1$	$15,5 \pm 0,1$
<i>Calf thymus</i> (CT DNA)	$0,146^a$	$0,166^a$
	$0,106^b$	$0,177^b$
	$0,050^c$	$0,095^c$

Fonte: Elaborada pelo autor.

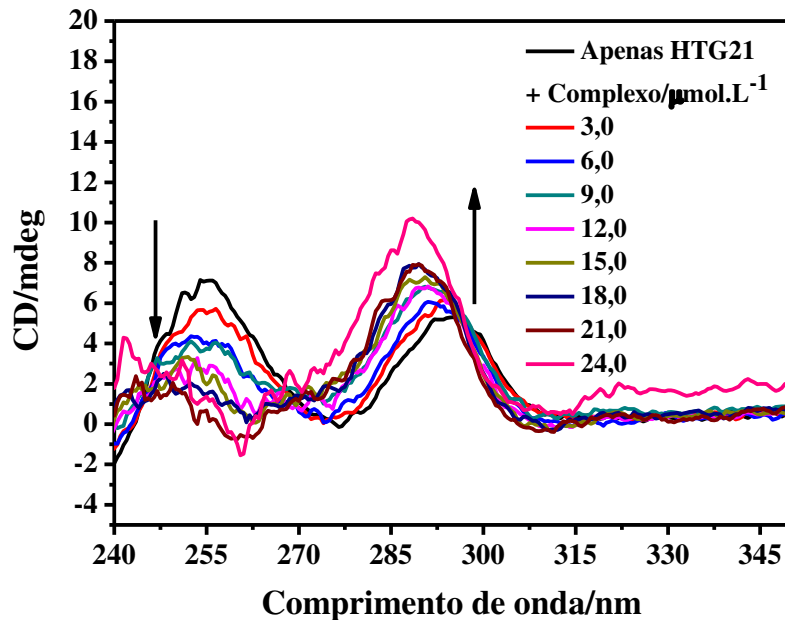
^aMedida em UV-vis; ^bmedida por luminescência da com brometo de etídio; ^cmedida por luminescência da competição com reagente Hoechst com brometo de etídio. Todas as medições foram repetidas pelo menos duas vezes e representam uma média ($\pm 0,2$). *Convém mencionar que esta constante de equilíbrio não tem unidade, sendo aqui empregada unidade de concentração devido ao seu uso comum em bioquímica.

Os complexos não apresentaram muita diferença nos valores de K_d , como seria de esperar devido as suas diferenças na emissão máxima (Figura 38, Tabela 8). Para G-quadruplex (G4-DNA), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ mostraram a ligação mais forte com K_d igual a

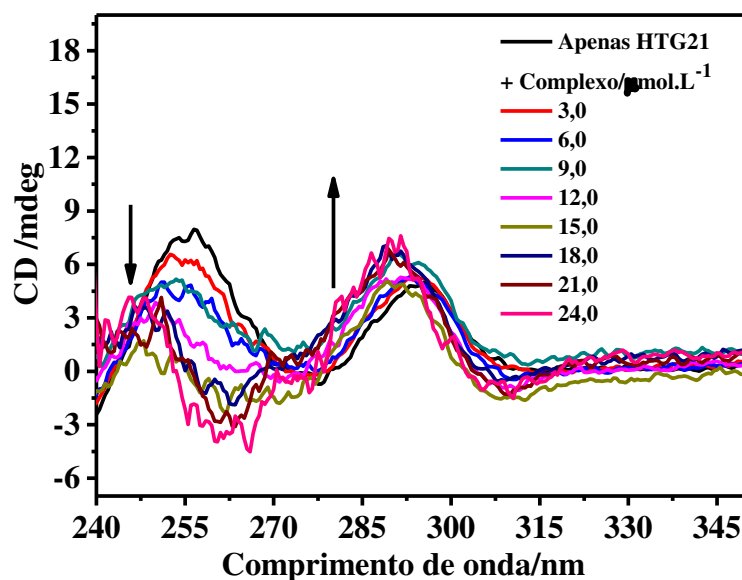
6,0 ($\pm 0,3$) $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 2,8 ($\pm 0,1$) $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Conforme revelado por essas constantes de dissociação, o complexo antracênil liga-se 2,2 vezes mais intensamente a G4-DNA do que $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$. Essa tendência também foi observada para a interação de ds-DNA (3,5 vezes) e ds-mis-DNA (2,0 vezes), enquanto que para a ligação dos complexos a DNA de fita única, os valores de K_d são praticamente idênticos (Tabela 8). O complexo naftil interage 7,7 vezes mais forte em G4-DNA do que em ds-DNA, apesar de ter uma emissão máxima 5 vezes menor após a interação. De um modo geral, a estrutura de G-quadruplex interagiu mais fortemente com $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. Uma vez que a diferença estrutural dos dois compostos de rutênio é de apenas um anel aromático dos cromóforos pendentes, as interações resultantes do empilhamento π - π podem induzir orientações estéricas favoráveis nos sítios de G4-DNA.

A formação da estrutura de G4-DNA a partir do HTG21 foi monitorada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) à temperatura ambiente. Entre cada medida esperou-se 5 minutos para o equilíbrio complexo-DNA ser atingido. Na Figuras 39 estão representados os espectros de CD em solução tamponada na presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente.

Figura 39 – Espectro de dicroísmo circular da titulação de HT21 pela adição do complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 à 25°C. $[\text{HT21}] = 2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



(a)



(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

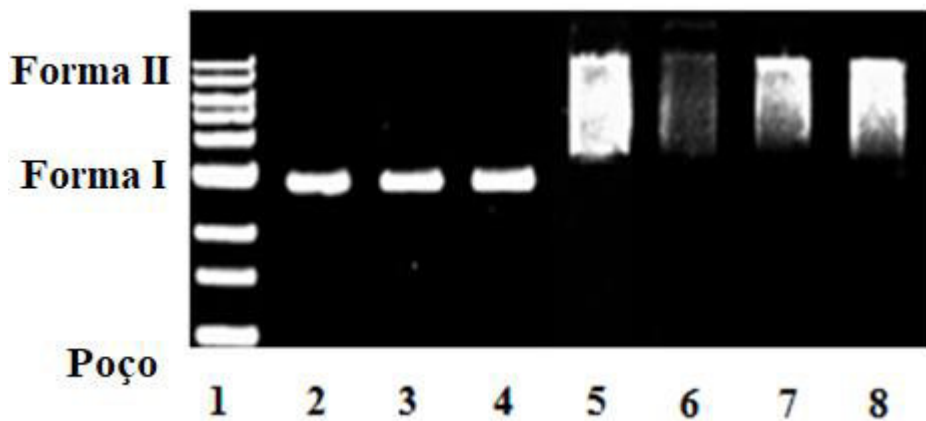
Na ausência de cátions, o espectro de CD da espécie HTG21, inicialmente em solução, apresenta bandas positivas em torno de 255 nm e 294 nm, características da forma enovelada aleatória em solução^{20,87}. A medida que os complexos foram adicionados (até 24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução aquosa, houve uma significativa mudança nos sinais espectrais. A banda presente em 255 nm gradualmente foi suprimida e deslocada até por volta de 247 nm. O sinal por volta de 294 nm intensificou-se e foi deslocado para um máximo de 288 nm. Essas mudanças, ocorridas após a adição dos compostos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, indicam que os mesmos induzem à formação de outra espécie estrutural de HTG21 em solução. Essas observações são consistentes com a formação da estrutura G4-DNA do tipo antiparalela como descrito na literatura^{20,85,87}. Comportamento similar já foi reportado para o sistema $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e compostos similares^{20,87}. Junto com as titulações por espectroscopia de emissão, o aparecimento dos sinais característicos da forma G-quadruplex é uma evidência adicional que sustenta a afinidade entre G4-DNA e os complexos investigados.

Resumidamente, esses estudos quantitativos sustentam que, embora os complexos se liguem fortemente às sequências curtas de ácidos nucleicos e G4-DNA, podem não funcionar como sondas luminescentes eficientes. Os resultados obtidos por espectroscopia de dicroísmo circular e luminescência apontam potencial promissor dos complexos na terapia contra câncer, dada sua eficiente interação e indução da formação de G-quadruplex sem a necessidade de íons K^+ .

4.2.6 Estudo de fotoclivagem de DNA

A fim de verificar a fotodegradação de DNA eventualmente causada por espécies oxigenadas reativas (ROS) geradas pelos complexos desse estudo, foi realizado o experimento de eletroforese em gel de agarose do DNA circular pBR322 irradiado em diferentes comprimentos de onda: azul $\lambda_{\text{irr}} = 463 \text{ nm}$, verde $\lambda_{\text{irr}} = 520 \text{ nm}$, amarelo $\lambda_{\text{irr}} = 592 \text{ nm}$ e vermelho $\lambda_{\text{irr}} \geq 632 \text{ nm}$, durante 60 minutos. Para fins comparativos também realizamos o ensaio de fotoclivagem do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ nas mesmas condições (Figura 40).

Figura 40 – Fotoclivagem do pBR322 na presença do $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ após 60 min de irradiação sob irradiação de diferentes comprimentos de onda. Poço 1: DNA marcador (ladder), Poços 2-4: apenas DNA com irradiação no azul, verde e amarelo, respectivamente. Poços 5: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ + pBR322 sem irradiação. Poços 6-8: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ + pBR322 com irradiação no azul, verde e amarelo, respectivamente. $[\text{pBR322}] = 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (em pares de base), $[\text{Ru}] = 15 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



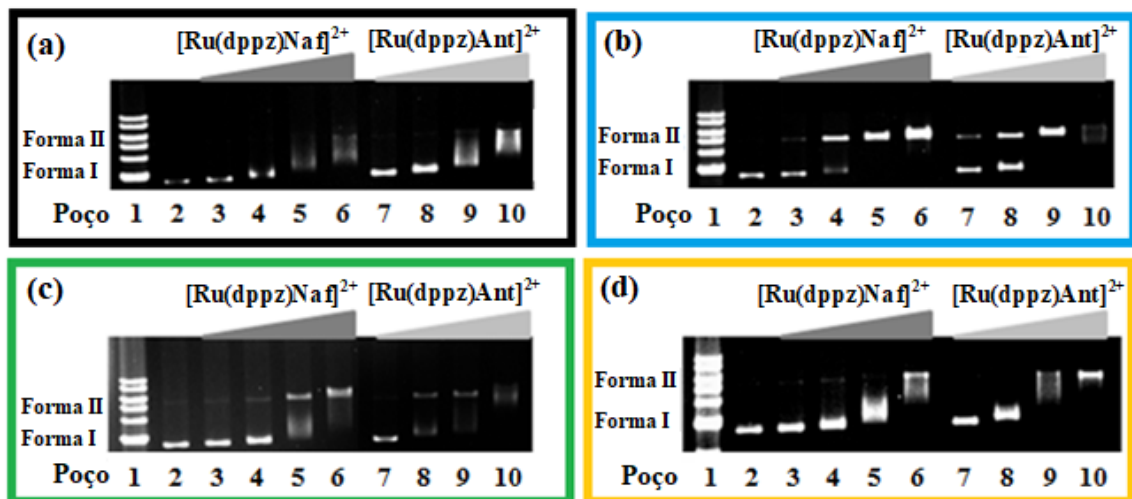
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados mostraram que quando apenas DNA plasmidal (poços 2-4, Figura 40) na sua forma nativa (superenovelada, forma I), é submetido à irradiação, nenhuma fotodegradação é observada. A adição do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ocasiona o aparecimento de bandas arrastadas das formas I e II, tanto na ausência quanto na presença de

irradiação (poços 5-8). Provavelmente, como reportado pela literatura, esse padrão decorre da variação de carga/massa originada de adutos intercalados.^{88,89}

Os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ quando incubados com DNA no escuro (poços 3 e 7, Figura 41(a)), não evidenciaram padrão de clivagem. Contudo, em maiores concentrações desses complexos, bandas arrastadas similares às apresentadas pelo complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ foram observadas. Em contraste, durante irradiação, ambos os complexos foram capazes apresentar um padrão muito distinto de clivagem no gel de agarose, quando comparados ao $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$.

Figura 41 – Fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pares de base) na presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ em diferentes concentrações no escuro e após 60 min de irradiação em diferentes LED's . Poços 1: DNA marcador (*ladder*). Poço 2: apenas DNA pBR322. Poços 3-10: complexos + DNApBR322 nas seguintes concentrações 0,3, 3,0, 7,0 e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Em (a) as amostras foram mantidas no escuro, em (b), (c) e (d) no azul, verde e amarelo, respectivamente.



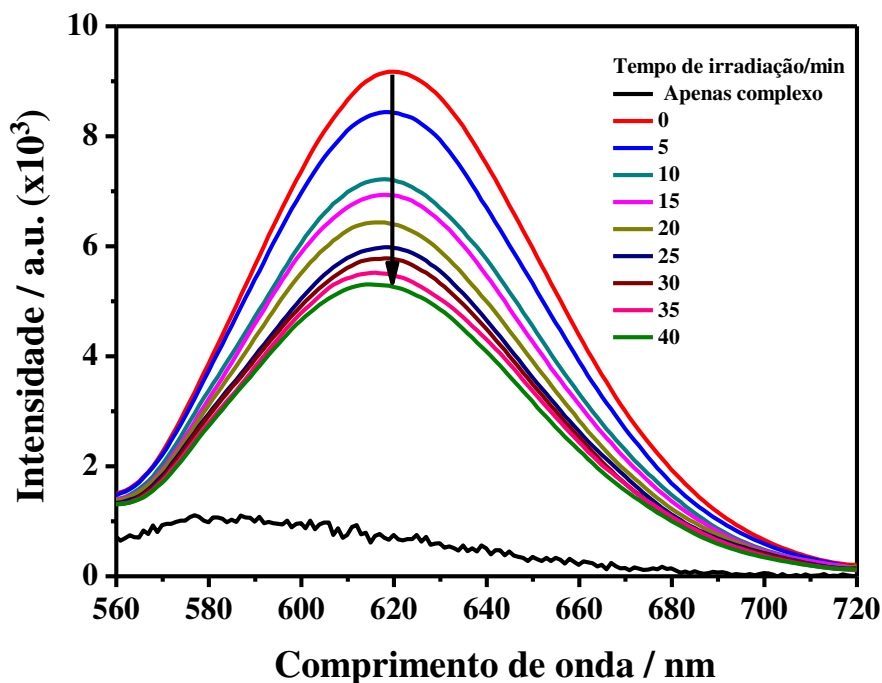
Fonte: Elaborada pelo autor.

A irradiação de luz azul e verde durante 60 minutos evidenciou o aparecimento da Forma II (forma clivada em uma única fita), indicando fotoclivagem do DNA (Figuras 41 (b)-(c)). A irradiação com LED amarelo originou somente uma moderada fotodegradação. Possivelmente a melhor fotoclivagem promovida pelos compostos metálicos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ pode ser explicada por: (i) eficiente interação complexo-DNA e (ii) maior rendimento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ambos os complexos,

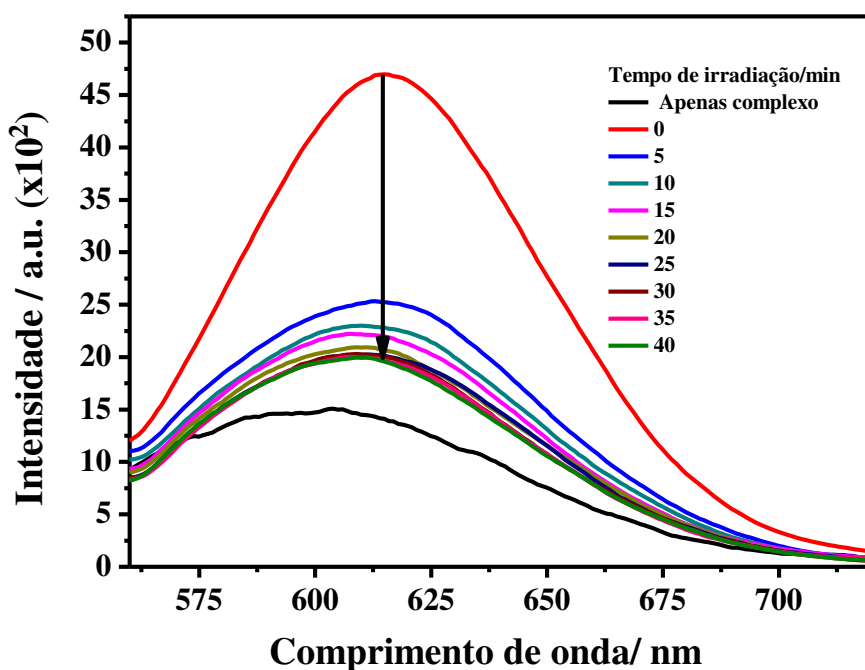
demonstraram uma intensificada produção de oxigênio singlete em comparação com $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (ver seção 4.1.6).

Outro experimento para investigar a capacidade dos complexos danificarem o plasmídeo pBR322 foi executado utilizando espectroscopia de emissão (Figura 42). Uma vez que o sinal de luminescência dos complexos de rutênio aumentou após a intercalação, como mostrado anteriormente, podemos também assumir que, após a irradiação, os complexos de DNA intercalados gerariam radicais que podem clivar o plasmídeo em solução. Após o dano ao DNA, o ligante dppz fica mais exposto às moléculas de água e, portanto, o sinal de luminescência deveria diminuir em diferentes tempos de irradiação. Portanto, é possível inferir que, ao usar esse experimento, é possível demonstrar a relação entre a capacidade dos complexos de produzir oxigênio singlete e a supressão do sinal de luminescência do sistema Ru-DNA após a irradiação (LED azul $\lambda_{\text{irr}} = 463 \text{ nm}$). Consequentemente, o complexo contendo o grupo antracênico apresentou a maior diminuição da luminescência durante a irradiação de luz azul. Logo, a luminescência diminuiu mais com o tempo na seguinte ordem $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, o que corrobora com o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ medido por DPBF, como demonstrado na seção 4.1.6

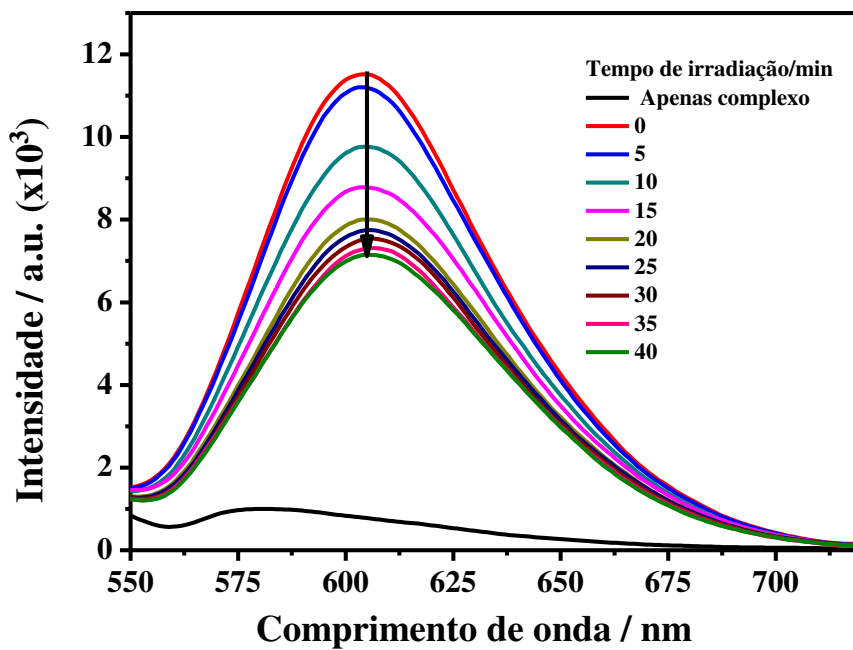
Figura 42 – Fotodegradação de pBR322 promovida pelos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, monitorado por fluorescência durante 40 minutos de irradiação no azul ($\lambda_{\text{irr}}=463\text{nm}$). Espectros de emissão dos complexos $\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (c). Em (d) a variação de luminescência com o tempo em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 a 25°C. $[\text{pBR322}]=5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $[\text{Ru}]=5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



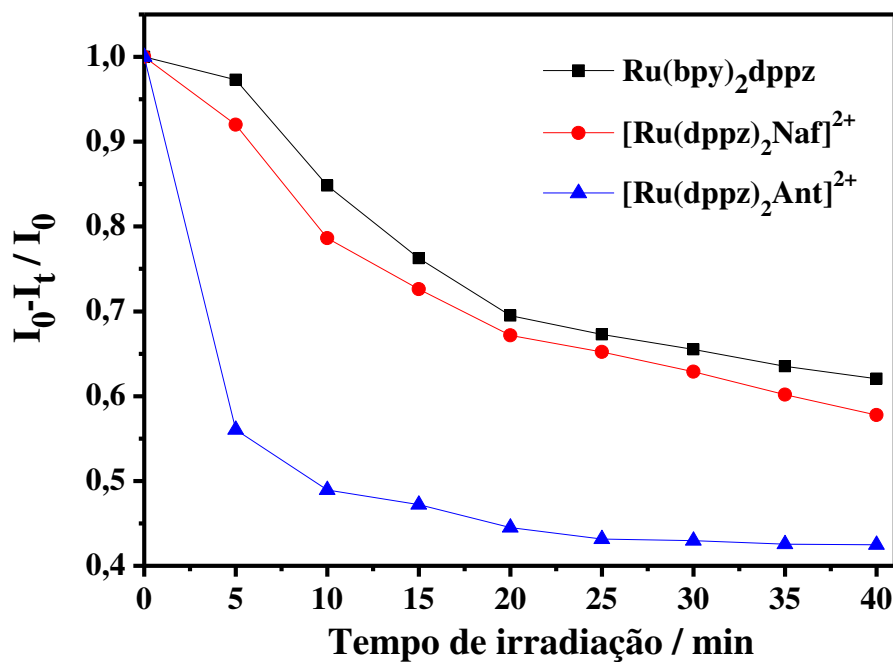
(a)



(b)



(c)



(d)

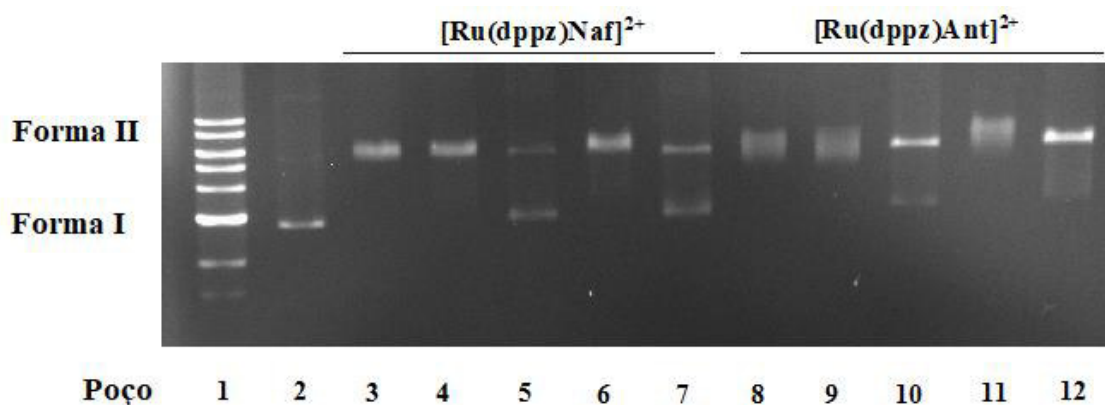
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados em gel de agarose, geração de oxigênio singleto medido por DBPF e o acompanhamento da fotodegradação do pBR322 sustentam a proposta de que os ligantes

amidas aqui empregados, tiveram realmente um papel fundamental na degradação de DNA na presença de luz.

Para investigarmos a natureza das espécies oxigenadas reativas geradas pelos complexos, realizamos o ensaio de eletroforese em gel de agarose (Figura 43) na presença de compostos seletivos à algumas espécies radicalares reativas (ROS): D-manitol (hidroxila radicalar), NaN_3 (oxigênio singlete), SOD (superóxido) e catalase (peróxido).

Figura 43 – Fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ (ambos a $7 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e detectores de ROS após 60 min de irradiação no azul. Poço 1: DNA marcador (ladder) Poço 2: apenas DNA. Poço 3: $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ + DNA. Poços 4-7: $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ +DNA+ os seguintes detectores de ROS (300 mmol.L^{-1}): D-manitol, NaN_3 , SOD (20 U) e catalase (20 U), respectivamente. Poço 8: $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ + DNA. Poços 9-12: $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ + DNA+os seguintes detectores de ROS (300 mmol.L^{-1}): D-manitol, NaN_3 , SOD (20 U) e catalase (20 U), respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Conforme mostrado na Figura 43 (poços 5 e 10), o NaN_3 teve um forte efeito protetor sobre a fotoclivagem de DNA causada pelos complexos, sugerindo que ambos os complexos danificam o plasmídeo produzindo $^1\text{O}_2$ como produto radicalar. Esses dados também estão de acordo a detecção de oxigênio singlete via DPBF (Figura 29). Particularmente para o complexo com o grupo naftil, a catalase também interferiu significativamente com a fotodegradação do DNA plasmídico (Figura 43, poço 7), indicando que o peróxido também pode ter um sutil envolvimento no processo de fotodegradação. Esses resultados apontam para um mecanismo que envolve principalmente oxigênio singlete^{89,90}, sugerindo mecanismos do tipo I e II para e tipo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e tipo II para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$. Em suma, esses resultados juntamente com as medidas do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, apoiam a ideia de que a degradação do DNA pode ser principalmente mediada por esse radical.

Podemos racionalizar a interação dos complexos desse estudo com DNA empregando dados teóricos obtidos por DFT⁹¹⁻⁹³. Muitos estudos demonstraram que a molécula de DNA se comporta como um doador eletrônico e os complexos intercaladores como aceptores de elétrons. A interação com DNA dependerá da energia dos orbitais dos ligantes, sendo que os orbitais LUMO geralmente estão confinados entre os ligantes auxiliares e intercalantes. Portanto, quanto menor o valor da energia de determinado orbital LUMO (e LUMO + x) maior a tendência do mesmo ser populado com elétrons dos pares de base nitrogenados do orbital HOMO (e HOMO +x) do DNA⁹¹⁻⁹³.

Nos complexos desse estudo, o ligante dppz é, provavelmente, o que mais contribui para a intercalação, e parte dos orbitais LUMO está distribuída sobre esse ligante em ambos os complexos. No entanto, para o $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ a bipyridina modificada também contribui com o orbital LUMO (-3,03 eV) para o complexo, enquanto que no complexo com grupo antracênil, é o LUMO+1 (-2,78 eV) está distribuído no ligante funcionalizado. A ligeira diferença de energia entre esses orbitais pode ser refletida nas sutis diferenças de valores entre as constantes intrínsecas de ligação (K_b) com DNA, determinado por espectroscopia. Outro aspecto importante a se considerar é a diferença de energia entre os orbitais de fronteira HOMO do DNA e LUMO dos compostos. Foi reportado um estudo onde as energias dos orbitais de fronteira dos pares de base de DNA⁶⁶ foram calculadas. Os autores obtiveram o valor de -1,27 eV para o orbital HOMO do par ligado GC/GC. Se considerarmos a energia dos orbitais LUMO dos complexos como sendo -3,03 e 3,16 eV para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, respectivamente, a diferença de energia do HOMO dos pares CG/CG e LUMO dos complexos será de -1,76eV ($[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$) e -1,89 eV($[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$). A Tabela 9 resume as energias de alguns orbitais de fronteira de ambos os complexos.

Tabela 9 – Algumas energias dos orbitais de fronteira dos complexos.

Complexo	LUMO+3	LUMO+2	LUMO+1	LUMO	HOMO	HOMO-1	HOMO-2	HOMO-3
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$	-2,50	-2,54	-2,96	-3,03	-5,88	-6,14	-6,40	-6,42
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$	-2,51	-2,57	-2,78	-3,16	-5,25	-6,22	-6,35	-6,38

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Atividade antibacteriana

A fim de se investigar o potencial uso dos compostos desse estudo em terapia antimicrobiana fotodinâmica (TFDA), foi realizado estudos da atividade antimicrobiana na ausência e na presença de luz. A concentração mínima inibidora (MIC) e a concentração

bactericida mínima (MBC) dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ foram determinadas contra populações bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, como resumido na Tabela 10. Essas bactérias também foram escolhidas como uma primeira tentativa de testar os compostos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Em geral, o efeito antibacteriano foi mais eficiente quando os compostos foram irradiados com luz azul durante 1 hora, antes das placas serem incubadas (Tabela 10). Curiosamente, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ apresentaram razoável atividade antimicrobiana mesmo sem irradiação, sugerindo que os ligantes funcionalizados podem trazer uma sutil atividade adicional. Provavelmente, como demonstrado anteriormente, a eficiente interação dos complexos com DNA, pode estar associada à atividade antibacteriana. Isto é particularmente interessante quando comparamos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, cuja atividade antimicrobiana não foi observado na ausência de luz. No entanto, os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ foram ainda nocivos às bactérias no escuro⁹⁴, indicando que os mesmos ainda podem atuar com metade da toxicidade nessa condição. Provavelmente, os complexos são hidrofóbicos o suficiente para atravessar a membrana celular bacteriana e alcançar o material genético e, assim, modificar o DNA, diminuindo a taxa de crescimento bacteriano.

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (valores em $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (continua)

Complexo	Irradiação		Gram-positiva		Gram-negativa	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$	SIM	MIC*	6,7	6,7	-	-
		MBC	6,7	6,7	-	-
	NÃO	MIC	13,3	6,7	-	-
		MBC	13,3	13,3	-	-
$[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$	SIM	MIC	6,4	25,6	-	-
		MBC	6,4	25,6	-	-
	NÃO	MIC	6,4	102	-	-
		MBC	12,8	102	-	-

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (valores em $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (conclusão)

[Ru(bpy) ₂ dppz] ²⁺	SIM	MIC	7,9	31,6	-	-
		MBC	7,9	31,6	-	-
	NÃO	MIC	-	-	-	-
		MBC	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

*MIC e MBC são expressos em $\mu\text{g/mL}$, (-). Atividade não detectada mesmo a altas concentrações, ([Ru(dppz)Naf]²⁺, $0,85 \mu\text{mol.L}^{-1} = 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; [Ru(dppz)Ant]²⁺, $0,82 \mu\text{mol.L}^{-1} = 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; [Ru(bpy)₂dppz]²⁺, $1,01 \mu\text{mol.L}^{-1} = 1,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Como já evidenciado, os complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺ quando irradiados no azul apresentam alta geração de ¹O₂, além de serem eficientes intercaladores. Interessantemente, os resultados antibacterianos sugerem uma possível relação com a geração ¹O₂, visto que o complexo [Ru(dppz)Naf]²⁺ apresentou menores valores de MIC e MBC do que [Ru(dppz)Ant]²⁺, seguido de [Ru(bpy)₂dppz]²⁺ com os menores valores de MIC e MBC da série. Além disso, os complexos [Ru(dppz)Naf]²⁺ e [Ru(dppz)Ant]²⁺ induziram dano ao DNA somente quando irradiados no azul (Figura 41). No total, esses resultados apoiam uma forte relação entre geração de oxigênio singlete, degradação do DNA e atividade antibacteriana dos complexos desse estudo.

Outra notória observação é a de que todos os compostos testados só foram eficazes contra bactérias Gram-positivas. A literatura reporta esse comportamento como uma tendência geral para muitos outros complexos de rutênio (II) utilizados em ensaios antimicrobianos⁹⁵⁻⁹⁸, Smith *et al.*,⁹⁶ mostraram que somente após irradiação de luz o complexo cis-[Ru(bpy)₂(INH)₂]²⁺ exibiu atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, mas foi inativa contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Bolhuis *et al* também relatou uma série de intercaladores de rutênio (II) com atividade somente em bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), mas nenhuma em Gram-negativa (*E. coli*)⁹⁴. Em contraste com esses resultados, Lei *et al.*, relatou excelente fotoatividade para [Ru(bpy)₂dppz]²⁺ contra a bactéria Gram-negativa *E.coli*⁹. No entanto, nem os complexos funcionalizados, nem [Ru(bpy)₂dppz]²⁺ apresentaram qualquer atividade antimicrobiana mensurável. Isso pode ser em parte devido a diferenças na sensibilidade das cepas de *E. coli* utilizadas pelos pesquisadores (*E. coli* JM109), que diferiram das nossas cepas.

De acordo com Li *et al.*,⁴¹, a atividade antibacteriana dos seus complexos de rutênio pode ser descrita como uma função da lipofilicidade, carga e a capacidade de separação de carga. As diferenças nas estruturas e composições das membranas e paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas também podem explicar nossos resultados. De fato, Malik *et al.*,⁹⁹ relataram que $^1\text{O}_2$ poderia ser eficaz na morte de bactérias, mas essa ação depende de uma estreita interação dos complexos com a membrana bacteriana. Assim, a membrana externa presente em bactérias Gram-negativas pode constituir uma barreira adicional que inibiu o efeito antibacteriano dos compostos, impedindo assim a morte celular.

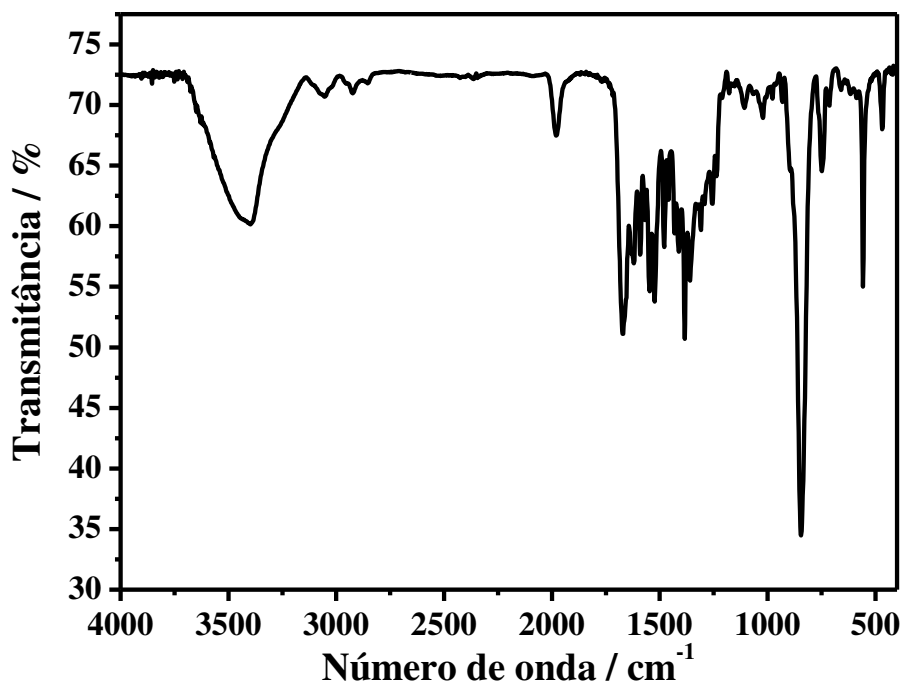
4.4 Complexo tris-homoléptico $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$

Além dos bicromóforos com dppz, foi conduzido o estudo com o complexo cujas três bipyridinas são funcionalizadas com o grupo antracênil. Pode ser interessante comparar o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (mais hidrofóbico) com o conhecido $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ e esclarecer se é possível melhorar interação com DNA e, ao mesmo tempo, melhorar a geração de oxigênio singleto.

4.4.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

As bandas na região do IV referente ao complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em pastilha de KBr está apresentado no espectro da Figura 44. Os valores de número de onda e suas respectivas tentativas de atribuição estão sumarizados na Tabela 11.

Figura 44 – Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em pastilha de KBr.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os estiramentos referentes a ligação C-H dos grupos metilas apresentam bandas de baixa intensidade entre 3144-2817 cm^{-1} e, em 747 cm^{-1} , é detectado a deformação exterior ao plano dos anéis aromáticos^{55,56}. Os estiramentos em 1479 e 1410 cm^{-1} provêm das vibrações simétricas C=C e C=N dos anéis piridínicos^{55,56}. O estiramento C=O do grupo amida aparece por volta de 1670 cm^{-1} ⁵⁵⁻⁶¹.

Tabela 11 – Dados de infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (continua)

Número de onda (cm^{-1})	Tentativa de atribuição
3144-2817	ν (C-H) do grupo metila
1670	ν (C=O) de amida
1479	ν (C=C) dos anéis aromáticos
1460	ν (C=C) dos anéis piridínicos
1410	ν (C=N) dos anéis piridínicos

Tabela 11 – Dados de infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (conclusão)

Número de onda (cm^{-1})	Tentativa de atribuição
841	δPF_6^-
747	δ (C-H) dos anéis aromáticos

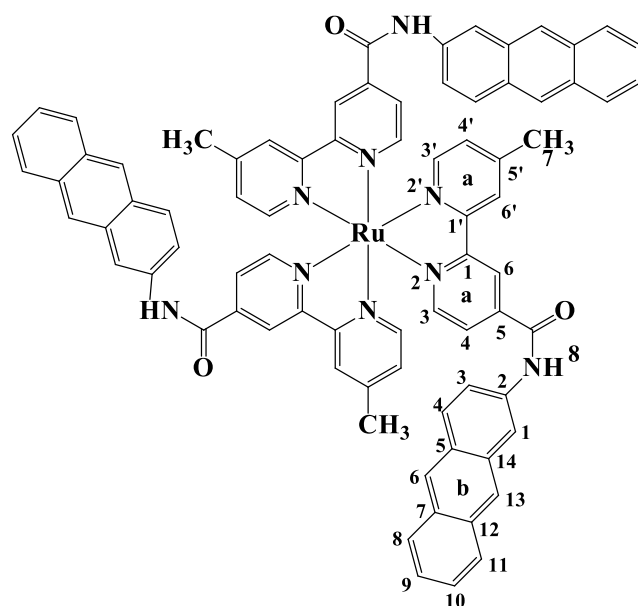
Fonte: Elaborada pelo autor.

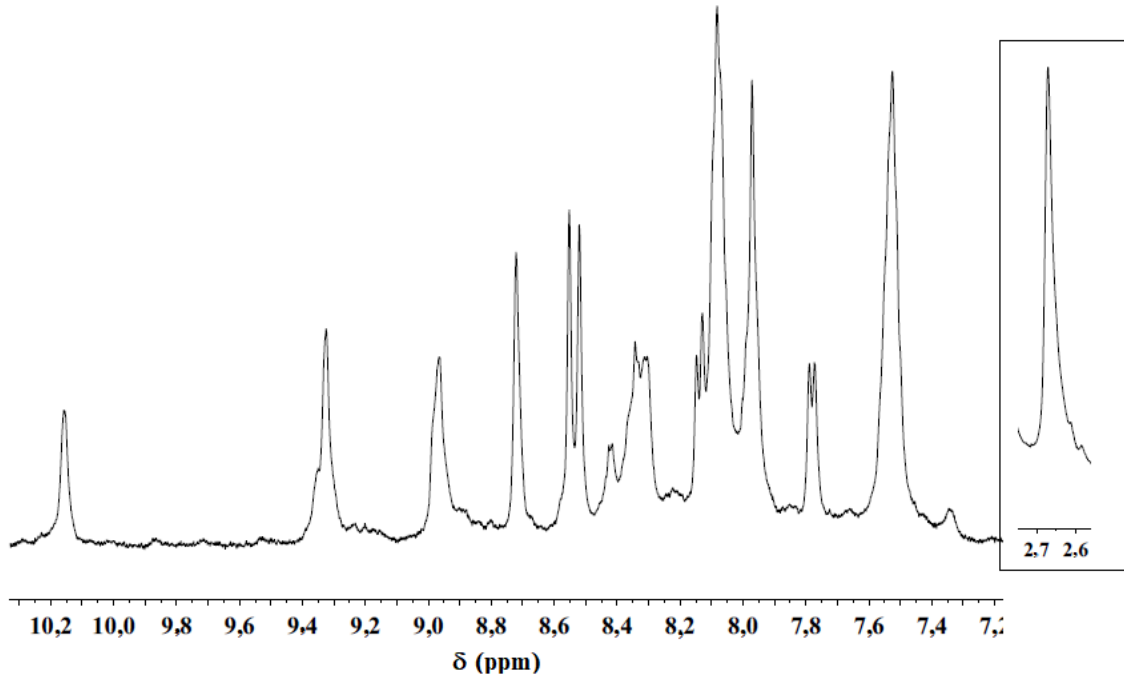
ν_s = estiramento simétrico; δ = deformação angular

4.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H

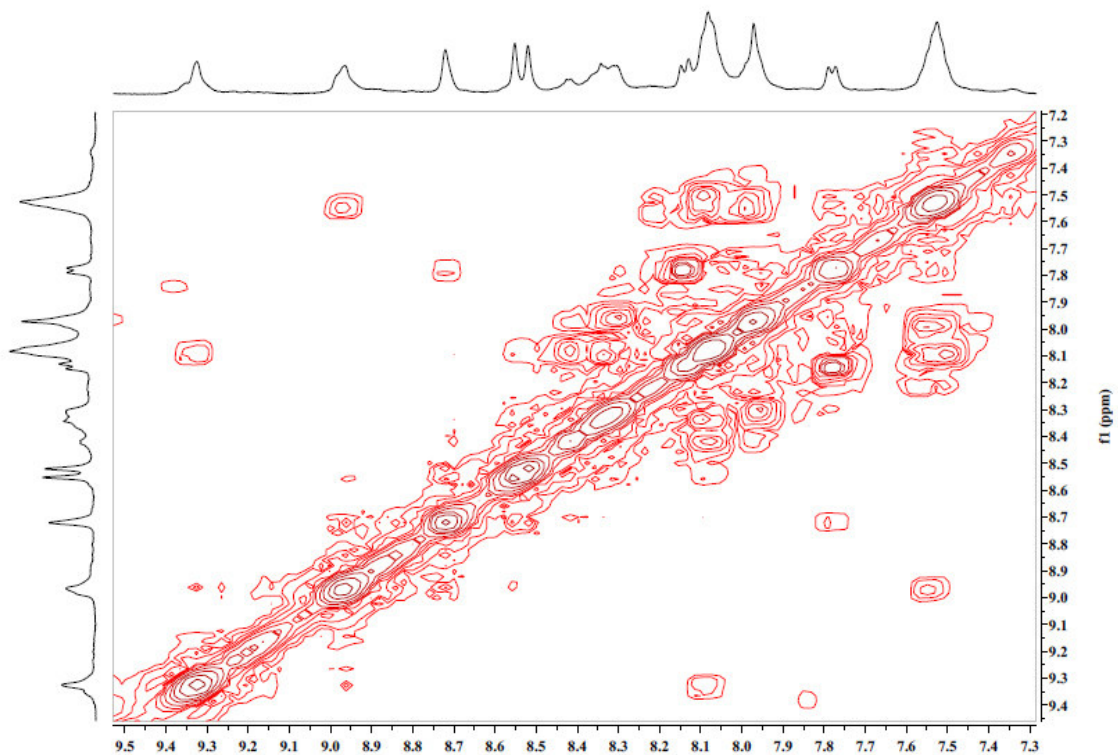
O espectro de RMN de próton do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, apresentado na Figura 50, majoritariamente é composto por sinais típicos de anéis aromáticos entre 7,4 e 9,4 ppm. Uma vez que os três ligantes são idênticos, provavelmente existe uma equivalência magnética dos hidrogênios entre os mesmos. Os sinais colapsados foram identificados e atribuídos com o auxílio da técnica bidimensional COSY (Figura 45).

Figura 45 – Espectro de ressonância magnética de ^1H do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetona deuterada (a), *inset*: sinal dos hidrogênios do grupo metila; e (b) espectro de RMN de ^1H bidimensional COSY.





(a)



(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os prótons da porção bipyridil 3'a(8,96 ppm) e 4'a(7,78 ppm) é observado um sinal de correlação no espectro de COSY da Figura 5. Os singletos em 8,71 e 8,33 são oriundos dos hidrogênios 6a e 6'a, respectivamente. Semelhantemente aos prótons 3'a e 4'a, observa-se

uma correlação dos hidrogênios adjacentes 3a (9,32 ppm) e 4a(8,13 ppm), Os hidrogênios 3b e 4b, pertencentes ao sistema aromático antracênico, e aparecem em 8,41 e 8,30 ppm, respectivamente; apresentando acoplamento no espectro bidimensional. Os sinais entre 7,42 e 7,60 ppm correspondem a multipletos dos prótons 9b e 10b (com singlete 1b sobreposto) e acoplam com os hidrogênios 8b (7,89-8,00 ppm) e 11b (8,01-8,10 ppm). Os demais sinais são os singletos 6b e 13b em 8,55 e 8,51 ppm, respectivamente. É observado também o próton trocável de amida em 10,15 ppm e o singlete correspondente ao grupo metila encontram-se em 2,66 ppm.

A partir dos espectros de RMN de ^1H podemos inferir fortemente a obtenção do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$. A Tabela 12 sumariza todos os sinais referentes aos hidrogênios do complexo.

Tabela 12 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e atribuições para o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$.

^1H	(δ) / ppm
3'a	8,96
4'a	7,78
6'a	8,33
3a	9,32
4a	8,13
6a	8,71
1b	7,42-7,60
3b	8,41
4b	8,30
6b	8,55
8b	7,89-8,00
9b	7,42-7,60
10b	7,42-7,60
11b	8,01-8,10
13b	8,51
amida	10,15
metila	2,66

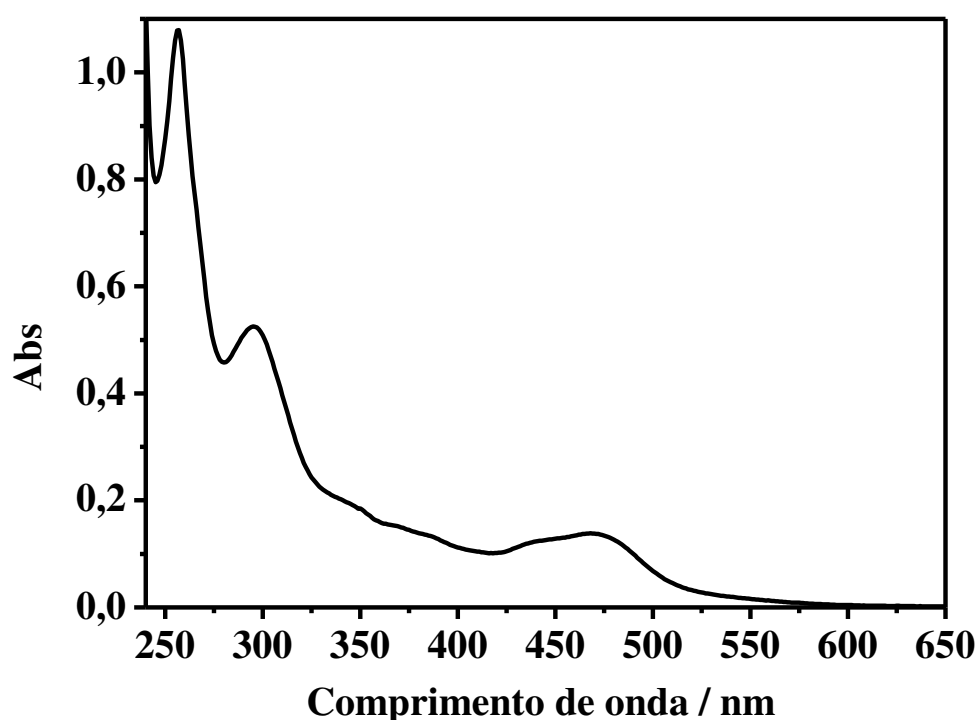
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.3 Espectroscopia de absorção eletrônica

Comparativamente ao complexo do outro sistema desse estudo, o perfil espectral de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ se assemelha ao dos sistemas polipiridínicos de Ru(II), cujos os espectros apresentam absorção na região do UV-Vis (Figura 46). Na região ultravioleta próximo, observa-se duas bandas de alta energia em 256 e 296 nm de natureza $p\pi^* \leftarrow p\pi$. A banda em 296 nm é oriunda das transições eletrônicas confinadas nos anéis bipyridínicos e, tal como para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, a absorção em 256 nm provém da excitação eletrônica dos aromáticos do grupo antracênico.

A larga absorção em 470 nm é semelhante em perfil àquela encontrada nos compostos com dppz desse estudo e as mesmas também surgem devido à do tipo transferência de carga metal-ligante (MLCT), $p\pi^* \leftarrow d\pi$ ^{1,2,15,64-66}.

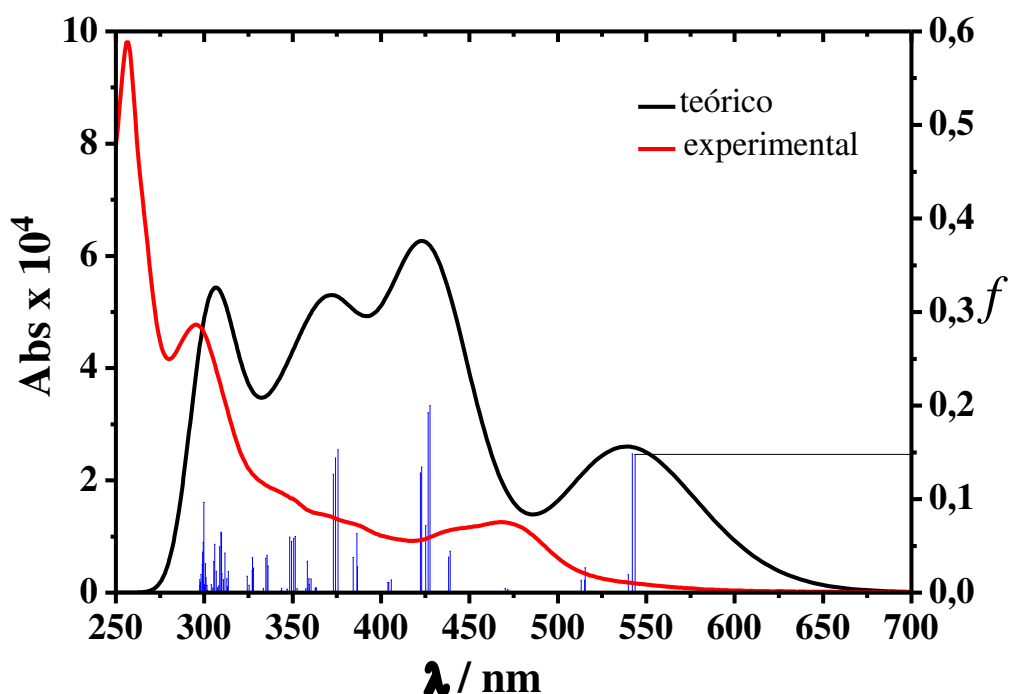
Figura 46 – Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetonitrila na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Utilizando experimentos de TD-DFT(Figura 47) foi possível sustentar teoricamente a origem das transições eletrônicas obtidas experimentalmente. Há uma razoável sobreposição entre os espectros teóricos e experimentais, possibilitando uma interpretação segura acerca da natureza das transições eletrônicas.

Figura 47 – Espectro eletrônico calculado do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ TD-DFT com B3LYP.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como apresentado na Tabela 4, a banda de menor energia é constituída por um conjunto de quatro transições do tipo MLCT em 472, 471 e 470 nm, todas surgindo a partir da transferência de carga de diferentes orbitais HOMO do rutênio para os orbitais LUMO da bipyridina funcionalizada.

Os orbitais moleculares associados às principais transições eletrônicas (Tabela 13) estão representados na Figuras 48. As energias calculadas de cada orbital estão resumidas na Tabela 14.

Tabela 13 – Transições calculadas do estado singlete para o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (continua)

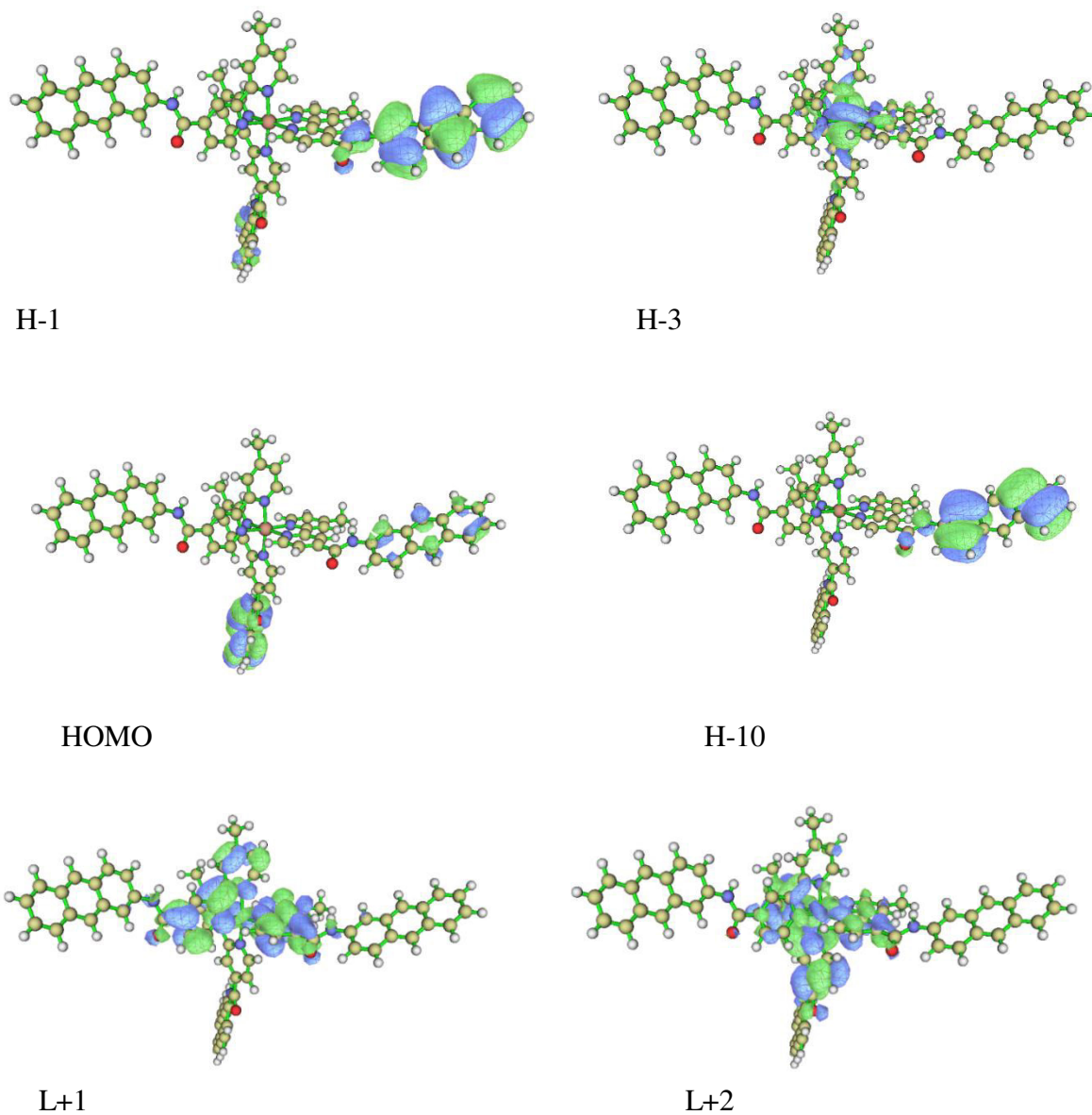
$\lambda(\text{nm})$	f	Contribuição	Caráter	
543	0,1477	H-1 \rightarrow LUMO (54%)	$\pi(\text{bpy-Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	IL
515	0,0269	H-1 \rightarrow L+1 (36%)	$\pi(\text{bpy-Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	IL

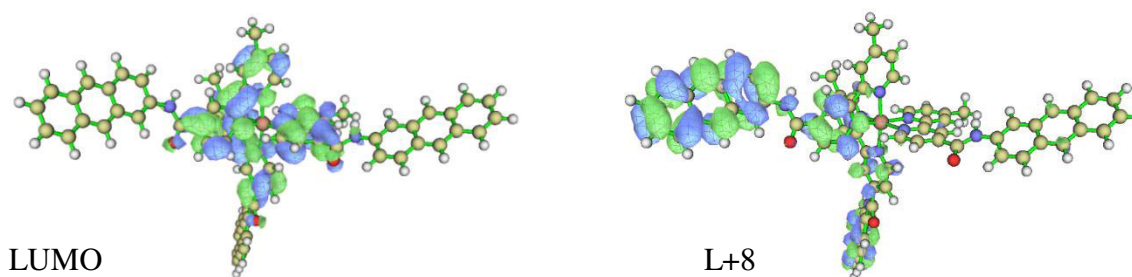
Tabela 13 – Transições calculadas do estado singlete para o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (conclusão)

$\lambda(\text{nm})$	f	Contribuição	Caráter	
472	0,0016	H-3 \rightarrow L+1 (71%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	MLCT
471	0,036	H-3 \rightarrow LUMO (49%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	MLCT
470	0,048	H-3 \rightarrow LUMO (40%)	$d(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$	MLCT
298	0,0111	H-10 \rightarrow L+2 (52%)	$\pi(\text{bpy-Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	IL
297	0,0141	H-3 \rightarrow L+8 (48%)	$\pi(\text{bpy-Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$	IL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 – Superfícies de contorno dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ calculados por TD-DFT (hidrogênios omitidos para maior clareza da estrutura).





Fonte: Elaborada pelo autor.

As isosuperfícies correspondentes aos orbitais HOMO, HOMO-1 e HOMO-10 localizados sobre o grupo antracênil, originam as transições intraligantes (IL) $\pi(\text{bpy-Ant}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy-Ant})$ de alta energia. Essa configuração assemelha-se ao $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, cuja o orbital HOMO distribui-se sobre os três anéis aromáticos do grupamento antracênil. O orbital H-3, deslocalizado sobre o átomo de rutênio (II), transfere carga para os orbitais LUMO e LUMO+1, caracterizando o conjunto de transições MLCT. Tal como observado para o complexo com dppz e Ant, o espectro de TD-DFT apresenta bandas em regiões de baixa energia (505 e 543 nm) não observadas experimentalmente. Elas decorrem da transferencia de carga confinada entre os orbitais H-2, H-1 e os orbitais LUMO e LUMO+1 e provavelmente são bandas de transição proibidas.

Tabela 14 – Energia calculada dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (continua)

Orbitais LUMO	Energia/ eV	Orbitais HOMO	Energia/ eV
LUMO	-2,82	HOMO	-5,40
+1	-2,73	-1	-5,40
+2	-2,72	-2	-5,41
+3	-2,18	-3	-6,25
+4	-2,08	-4	-6,38
+5	-2,07	-5	-6,39
+6	-1,84	-6	-6,47
+7	-1,79	-7	-6,49
+8	-1,78	-8	-6,50
+9	-1,55	-9	-7,10

Tabela 14 – Energia calculada dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (conclusão)

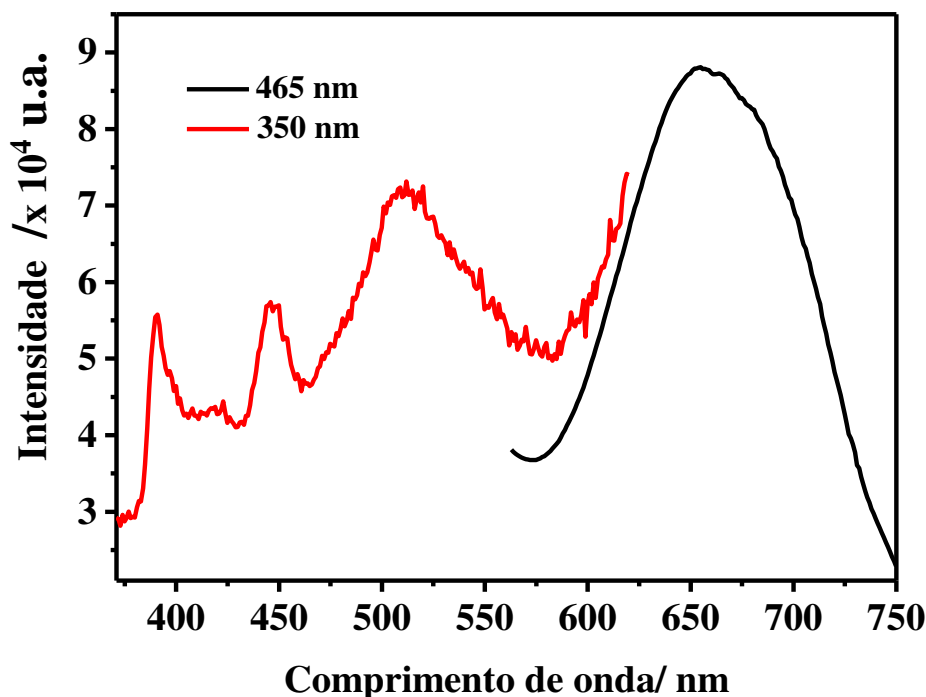
Orbitais LUMO	Energia/ eV	Orbitais HOMO	Energia/ eV
+10	-1,41	-10	-7,10

Em suma, os resultados de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis nos levam a concluir uma notória correspondência obtida entre os dados teóricos e experimentais da molécula $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, resultando numa melhor compreensão da estrutura eletrônica do composto.

4.4.4 Espectroscopia de emissão

As características luminescentes do complexo tris-homoléptico de rutênio são similares aos dos complexos com o intercalador dppz. A Figura 49 nos apresenta o espectro de emissão estacionário do $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetonitrila em diferentes comprimentos de onda de excitação. Uma característica banda larga em torno de 657 nm surge quando a solução contendo o complexo foi excitada em 465 nm^{2,65,66,68}. Um deslocamento batocrômico de 42 nm é observado com relação ao $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ no mesmo solvente¹⁰. A mudança espectral notada na energia de emissão é devido a presença de substituintes nos ligantes bipyridínicos, aos quais são atribuídos a variação da energia do estado excitado^{3MLCT}^{2,65,66}.

Figura 49 – Espectro de emissão em diferentes energias de excitação do complexos $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em acetonitrila, na concentração de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C .



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na região entre 390 – 509 nm surgem bandas estruturadas quando a excitação é realizada na região de absorção do cromóforo antracênil (350 nm). Esse conjunto de banda já foi observado em compostos similares⁷ e nos fornece a clara evidência da natureza do bicromóforo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, uma vez que essas bandas pertencem a luminescência da porção antracênil.

A investigação da capacidade emissiva, realizada pela determinação do rendimento quântico de emissão (Φ_{em}), em solventes de diferentes polaridades foi determinada para o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$. Independente do solvente, os baixos valores de rendimento quântico (Tabela 15) demonstram que a dinâmica entre os estados $^3\text{MLCT}$ e ^3Ant assemelha-se ao do composto $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, onde os processos radiativos são significativamente suprimidos.

Todas as informações inerentes as propriedades espectroscópicas do $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ estão reunidas na Tabela 15.

Tabela 15 – Dados espectroscópicos do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$.

$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon \times 10^5/\text{molL}^{-1}$) ^a	Φ_{em} ($\lambda_{\text{em}}, \text{nm}$)				
	H_2O	CH_3OH	CH_3CN	DMF	CH_2Cl_2
256 (5,1)					
296 (6,3)					
470 (0,4)	0,0015(642)	0,0018(650)	0,0021(646)	0,0025(658)	0,0032 (623)

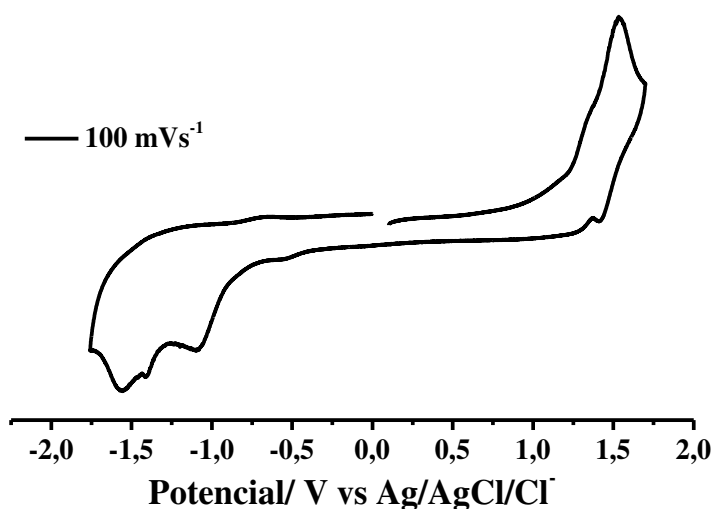
Fonte: Elaborada pelo autor.

a, espectro obtido em acetonitrila,

4.4.5 Medidas eletroquímicas

As propriedades eletroquímicas do $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ foram estudadas por voltametria cíclica em solução de acetonitrila PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O voltamograma da Figura 50 apresenta processos redox numa ampla faixa de potencial, todos característicos de sistemas polipiridínicos de Ru(II).

Figura 50 – Voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo em solução de PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

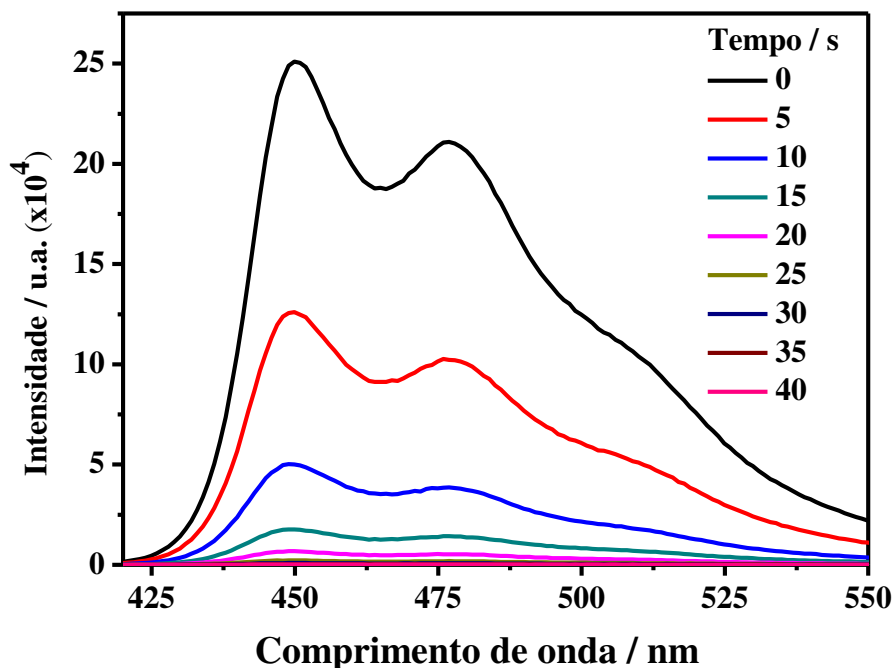
Na região positiva foram observados um processo *quasi*-reversível em +1,46V e outro irreversível, em +1,33 V. O primeiro advém da oxidação/redução do centro metálico, o par redox Ru^{III/II}, cujo valor está próximo ao encontrado para o complexo [Ru(dppz)Ant]²⁺ e outros sistemas semelhantes^{1,2,65,66}. O segundo processo deriva da oxidação do grupo aril antraceno, o qual já foi observado também no complexo com dppz. Na zona negativa de potenciais foram encontrados os processos que resultam da redução do complexo: -1,08, -1,40 e -1,56 V, todos associado aos três ligantes amida. É interessante ressaltar que o orbital de fronteira participante da oxidação dessa molécula, HOMO, também está localizado sobre um dos grupos antracênil. O estudo de TD-DFT confirma a proximidade dos valores de energia dos orbitais, -5,40 eV para [Ru(Ant)₃]²⁺ e -5,25 eV para [Ru(dppz)Ant]²⁺. Os dados de TD-DFT e voltamétricos também podem ser comparados ao [Ru(dppz)Ant]²⁺ quando verificarmos que a redução do complexo [Ru(Ant)₃]²⁺ ocorre nos orbitais LUMO (-2,82 eV), LUMO+1 (-2,73 eV) e LUMO+2 (-2,72 eV). A média calculada da energia desses orbitais é igual a -2,76 eV e corresponde a um valor muito próximo ao orbital LUMO+1 (2,78 eV) localizado sobre o fragmento bipyridinico do ligante mbpy-Ant no complexo [Ru(dppz)Ant]²⁺. Desse modo, podemos inferir que a redução do complexo [Ru(Ant)₃]²⁺ é predominante nos orbitais da fração bipyridinico do complexo.

Em resumo, o corroborar entre os dados teóricos e voltamétricos nos levam a compreender e confirmar a estrutura eletrônica do composto tris-homoléptico, bem como justificar a participação dos orbitais de fronteira na estabilidade da molécula.

4.4.6 Geração de oxigênio singlete

Semelhantemente ao sistema com dppz, o composto [Ru(Ant)₃]²⁺ também causou a fotodegradação do DPBF sob irradiada no azul, indicando que complexo produz oxigênio singlete. O espectro de fluorescência do DPBF e o gráfico cinético da reação de produção de ¹O₂ são apresentados nas Figuras 51 e 52, respectivamente.

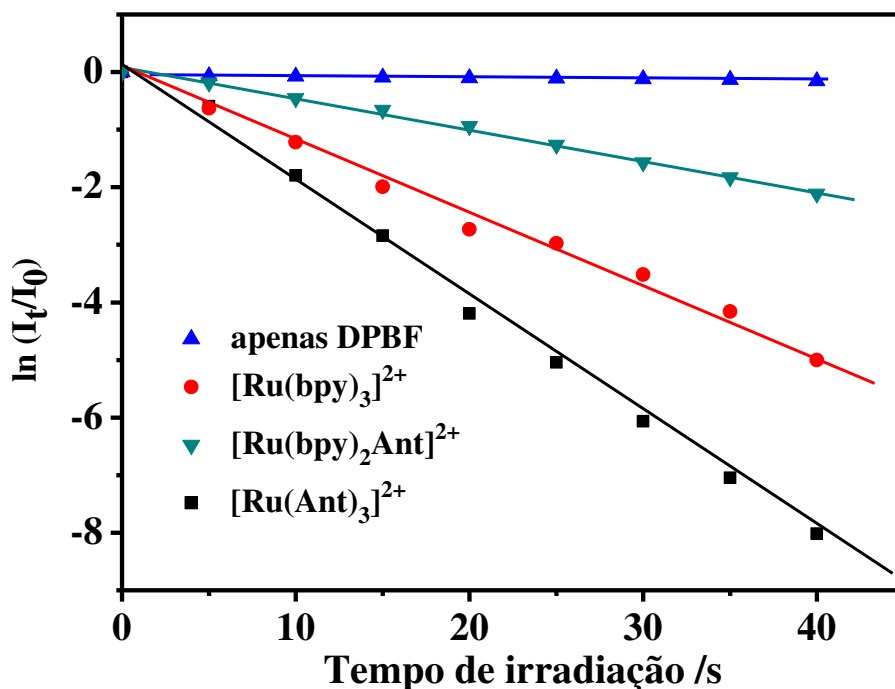
Figura 51 – Espectro de fluorescência relativo ao consumo de DPBF em etanol sob irradiação com LED azul na presença de $20\mu\text{ mol.L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410\text{ nm}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A intensa supressão das bandas em 450 e 477 nm do DPBF sugere uma alta produção de $^1\text{O}_2$ a partir do oxigênio molecular excitado por $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$. Para fins comparativos, foi determinado o valor de Φ_{Δ} para um complexo conhecido da literatura, o composto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Ant}]^{2+}$. O mesmo é funcionalizado em apenas uma posição na bipyridina, sendo possível verificarmos se o número de grupos antracênil pode alterar o valor de Φ_{Δ} .

Figura 52 – Curva cinética do consumo de DPBF em função do tempo de irradiação (LED azul) para o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O tempo de total degradação do DPBF na presença do $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ foi menor quando comparamos com os outros complexos desse estudo. Como apresentado na Figura 58, a reta correspondente ao complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ no gráfico $\ln(I_t/I_0)$ vs tempo de irradiação é mais inclinada do que àquela do padrão $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Como calculado para $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, o valor do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete é o maior encontrado dentre todos os compostos desse estudo, sendo Φ_Δ igual a 0,99. O valor de Φ_Δ para o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Ant}]^{2+}$ foi igual a 0,74, indicando que o composto tri-funcionalizado é mais eficiente na geração de $^1\text{O}_2$ do que o complexo mono-funcionalizado. Provavelmente a observação desse elevado valor deve-se a maior probabilidade de transferência de energia do estado excitado $^3\text{MLCT}$ para o oxigênio no estado fundamental^{6,70,9,73}, vem razão da funcionalização dos três ligantes bipyridínicos com fragmentos antracênico.

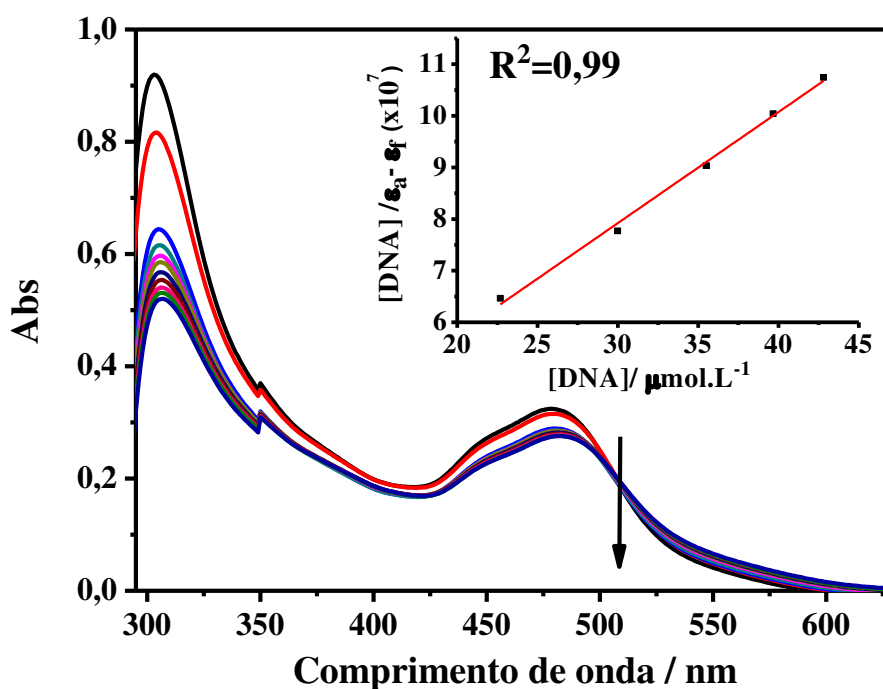
4.4.7 Estudo de interação com DNA

4.4.7.1 Constante de ligação (K_b) DNA-Complexo

A magnitude da interação entre o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ e DNA foi estimada através de titulação espectrofotométrica por absorção na região do UV-Vis e espectroscopia de emissão. Para este fim, utilizou-se ácidos nucleicos de diferentes naturezas: DNA genômico (CT DNA) e sequências menores de oligonucleotídeos, como ssDNA e G4-DNA.

O espectro de absorção no UV-Vis do $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (Figura 53) apresenta sutis mudanças após adição de CT-DNA, um hipocroismo de aproximadamente 15% e um discreto deslocamento batocrômico (~ 8 nm). Esses valores são bem menos expressivos que aqueles observados para os complexos contendo dppz, que foram ~ 15 nm. O valor da constante intrínseca de ligação (K_b) foi calculado a partir da equação 6.

Figura 53 – Espectro de absorção dos complexos $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ na presença de diferentes quantidades de CT DNA. *Inset*: gráfico de $(\epsilon_a - \epsilon_f) / (\epsilon_b - \epsilon_f)$ vs $[\text{DNA}]$.



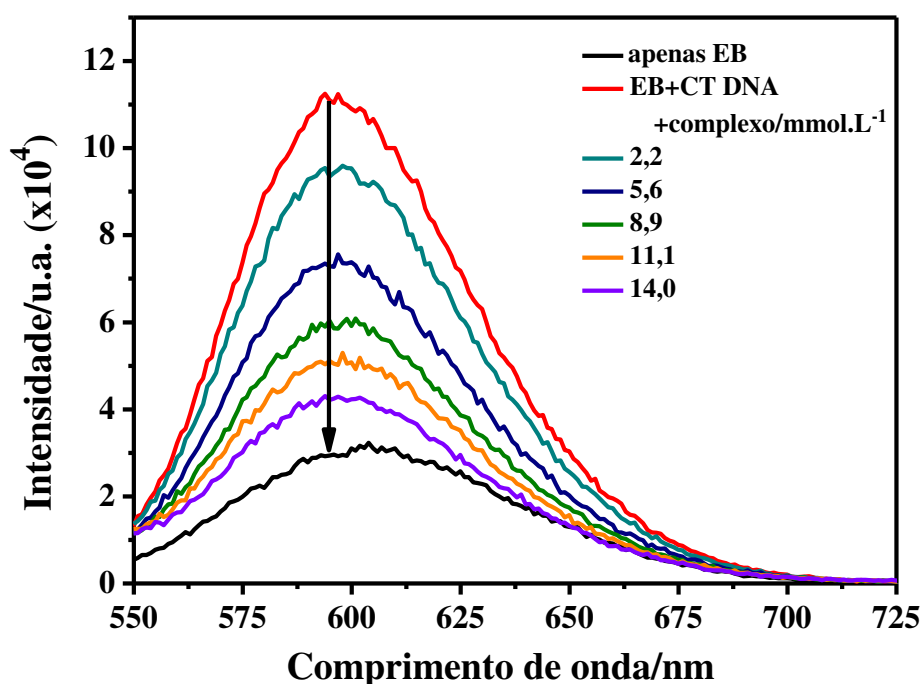
Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da equação 6 determinou-se K_b como sendo igual a $9,8 \times 10^4$. O valor obtido está distante daqueles típicos para agentes intercalantes ($K_b > 10^6$)^{12,13,32}, e concordante com moléculas que se ligam através dos sulcos e/ou eletrostaticamente ao DNA^{12,13}. Intuitivamente, a presença de três grupos antracênil, que são fragmentos de alta densidade eletrônica π , poderia favorecer uma forte interação com os pares de base nitrogenados da molécula de DNA. Entretanto, a interação não é tão apreciável, indicando que, provavelmente, a rotação dos grupos amido antracênil podem causar impedimento estérico no sítio de ligação entre os pares de base. Além disso, as mudanças espectrais (batocromismo e hipocromismo) são apreciavelmente menos significativas do que para aquelas observadas para o sistema $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{L}]^{2+}$, cujas moléculas possuem um ligante rígido e planar (dppz). Por outro lado, evidencia-se claramente a forte influência dos grupo aril dos três ligantes bipyridínicos na interação π - π *stacking* com DNA, especialmente quando comparamos com os valores de K_b de outros complexos, como $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($\sim 7 \times 10^2$) e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\sim 7,2 \times 10^3$). O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Ant})]^{2+}$ apresentou um valor de K_b comparável ao do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($\sim 10^2$), indicando que, aparentemente, apenas um grupo antracênil ainda não é suficiente pra uma melhor interação π - π *stacking* com DNA.

4.4.7.2 Competição com brometo de etídio (EB)

A adição de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ a solução contendo o sistema EB- CT DNA resultou em mudanças que sugerem competição do complexo pelos sítios de intercalação. Essa observação está ilustrada no espectro de luminescência da Figura 54.

Figura 54 – Espectro de fluorescência de EB ($\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$) na presença de DNA com diferentes quantidades de complexos (0-14 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). $[\text{EB}] = 3 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

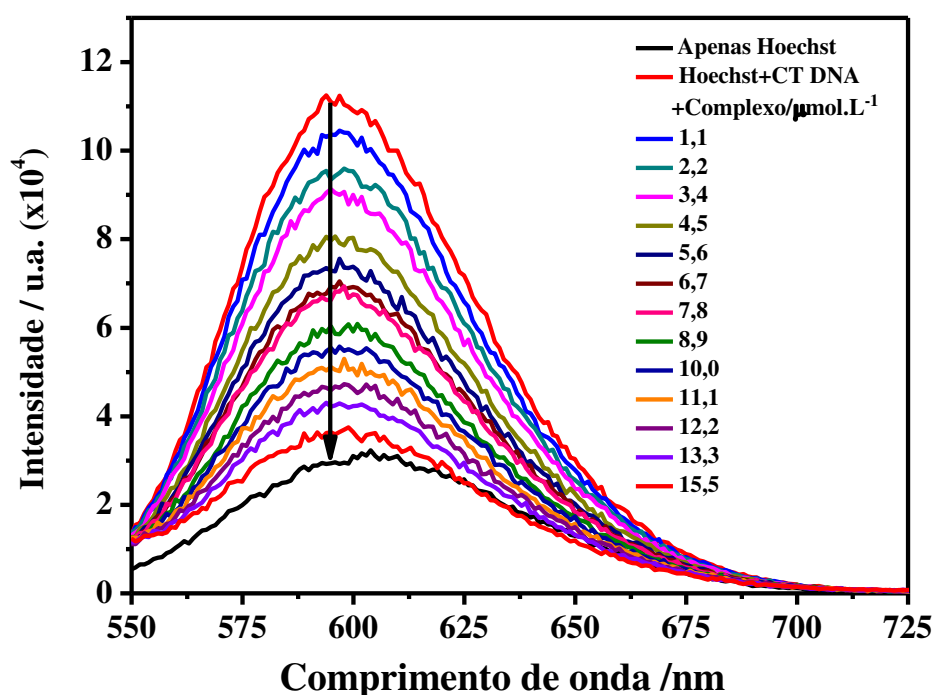
Tal como relatado anteriormente (ver seção 4.2.2), após a adição de DNA à solução contendo apenas EB, a banda em 600 nm (EB livre em solução) tende a deslocar-se para o azul (~ 6 nm). Ao passo que $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ é adicionado à solução, a banda em 595 nm começa a desaparecer, indicando que o complexo é capaz de deslocar moléculas de EB dos pares de base nitrogenados. Paralelamente aos compostos com dppz desse trabalho, podemos inferir que, aparentemente, o $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ também compete com EB pelos sítios de intercalação. Enquanto que na série $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{L}]^{2+}$ a queda de supressão fluorescente é mais intensa com a concentração (até 14 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), a adição sucessiva de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ não extingue o sinal tão bruscamente ao atingir a maior concentração de complexo.

Confrontando os resultados de UV-Vis e o ensaio de competição com EB, podemos deduzir que o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ provavelmente tem uma moderada tendência a intercalação com os pares de base do DNA.

4.4.7.3 Estudo de interação por sulcos

A possibilidade do complexo bicromóforo tris-funcionalizado interagir com o sulco menor de DNA também foi testada utilizando o reagente de Hoechst. O espectro de fluorescência do reagente de Hoechst, em diferentes concentrações de complexo, está representado na Figura 55.

Figura 55 – Espectro de emissão do Hoechst na presença de CT DNA a diferentes concentrações de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ (0-15,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). $[\text{Hoechst}] = 3\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{CT DNA}] = 10\mu\text{mol.L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 340\text{ nm}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

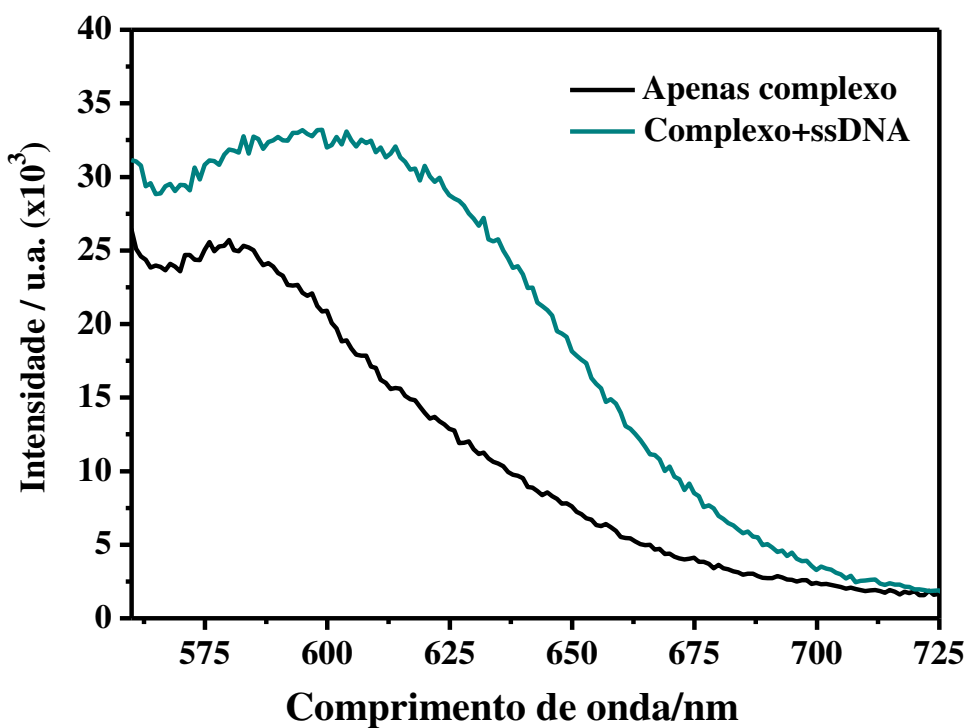
O acréscimo de $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ a solução, mesmo a concentrações superiores das utilizadas no outro grupo de compostos, não intensifica acentuadamente a supressão da luminescência do Hoechst. Enquanto que para o grupo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{L}]^{2+}$ aproximadamente 50% do sinal decresce a uma concentração de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de composto, é necessário adicionar cerca de 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ à solução para promover o mesmo efeito. À vista dessa observação é possível inferir que, provavelmente assim como os outros complexos estudados, $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ deva também interagir em DNA por sulco menor. Infelizmente, como não foi realizado o ensaio com

methyl green, não se deve descartar a possibilidade desse complexo interagir também por sulco maior.

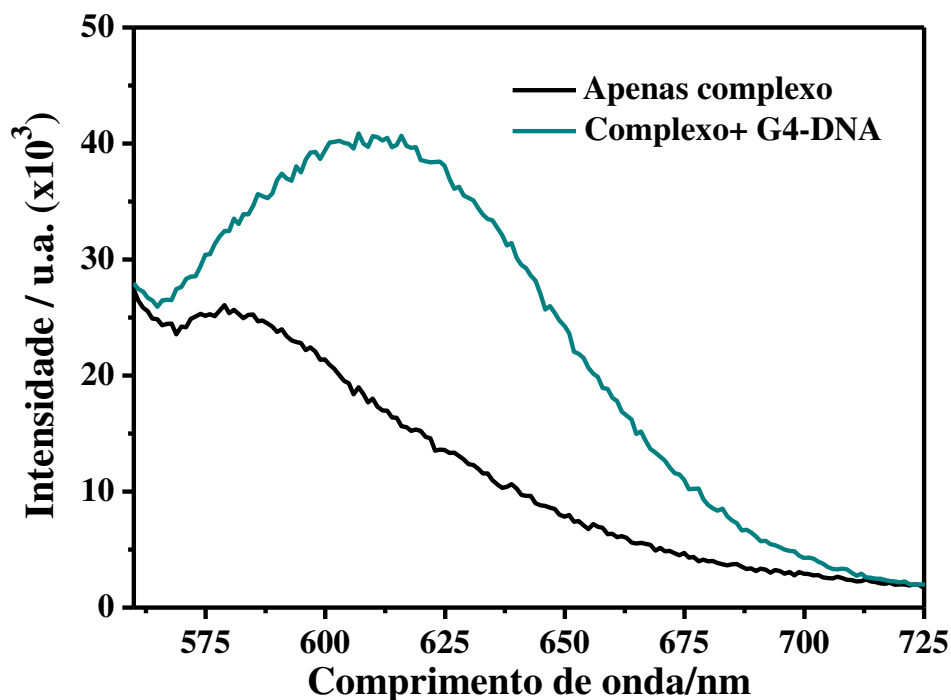
4.4.7.4 Estudo com G-quadruplex

O experimento de interação do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ com DNA de fita única (ss-DNA) e a forma quadruplex (G4-DNA) está ilustrado no espectro da Figuras 56.

Figura 56 – Espectros de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ na presença de (a) ss-DNA e (b) G4-DNA. Medidas realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4, $[\text{Ru}] = 30 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $[\text{oligo}] = 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pares de base.



(a)



(b)

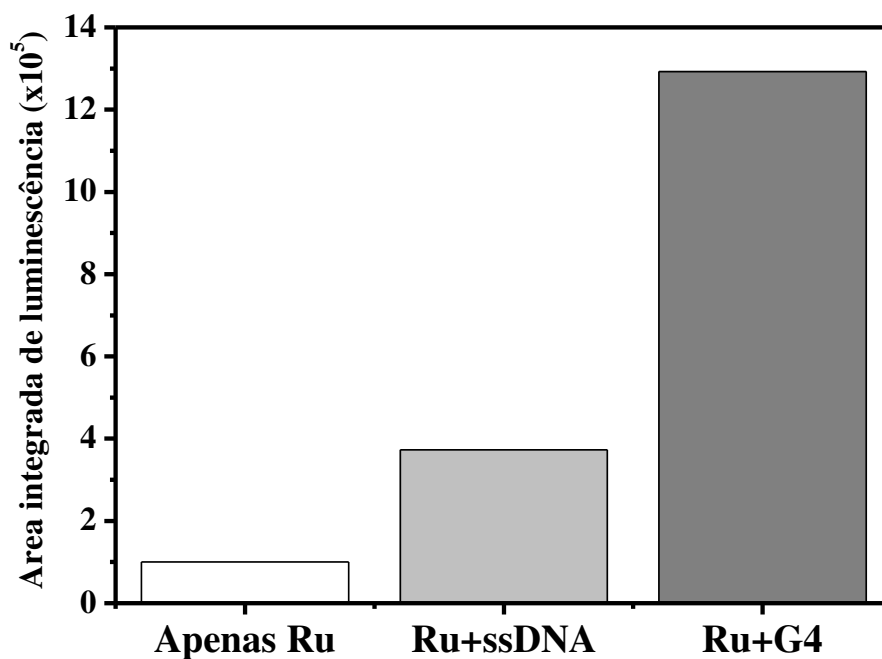
Fonte: Elaborada pelo autor.

É notório o acréscimo de intensidade das bandas quando os oligonucleotídeos são adicionados às soluções contendo o complexo. Uma visão mais clara dessas mudanças é melhor demonstrada na Figura 57. Tal como já descrito aqui, essa mudança espectral na intensidade da banda denota interação do complexo com DNA. Um acréscimo de 27% de intensidade de emissão do complexo é verificado na presença de ss-DNA. Em destaque, quando $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ encontra-se na presença da espécie G4-DNA o aumento é de 58% de intensidade. Portanto, é possível que a interação do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ com G-quadruplex seja mais intensa do que ss-DNA, sugerindo sua capacidade em diferenciar uma espécie da outra. Os grupos antracênil que rotacionam em torno dos ligantes bipyridínicos provavelmente propiciam um melhor ajuste na estrutura G-quadruplex. Nessa condição, o complexo se encontraria num ambiente mais hidrofóbico a possibilitar uma interação mais forte quando comparamos com o ambiente oferecido pela estrutura randômica e linear do DNA de fita única (ss-DNA).

Diferente dos outros dois complexos, o $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ leva um tempo significativamente maior para estabilizar a intensidade do sinal de luminescência. Para os complexos da outra série, levava-se cerca de um minuto até o sinal atingir sua estabilidade. Esperou-se 60 minutos para a intensidade da banda do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ atingir um

máximo e não mudar mais. Considerando esse fato, é provável que a interação seja, do ponto de vista cinético, desfavorável em direção à formação do sistema complexo-DNA.

Figura 57 – Intensidade de luminescência integrada do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ na presença de ssDNA e G4-DNA. Medidas realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 a 25°C.

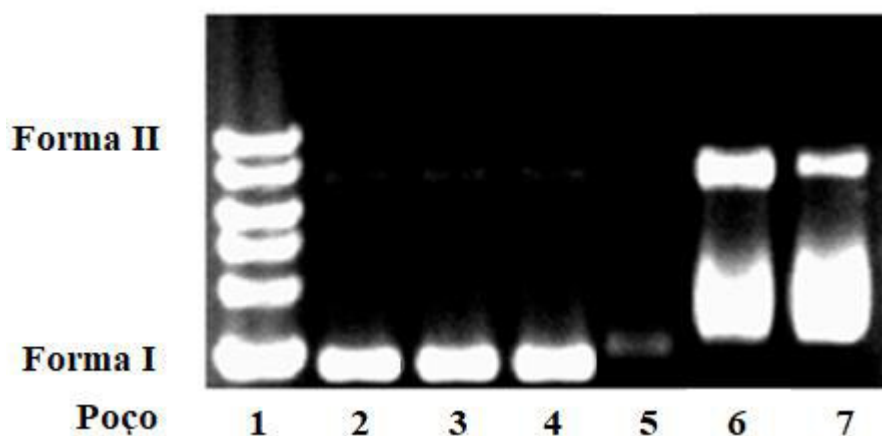


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.7.5 Eletroforese em gel de agarose

O experimento em gel de agarose (Figura 58) foi conduzido para investigar a capacidade do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ em clivar a forma nativa do DNA circular sob condições de iluminação (sob luz azul ou verde).

Figura 58 – Fotoclivagem do DNA pBR322 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença do complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ ($26 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro e após 60 min de irradiação em diferentes LED's. Poços 1: DNA marcador (ladder). Poços 2-4: apenas DNA pBR322 no escuro (2), irradiado no azul (3) e no verde (4). Poço 5: complexo a $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ + DNA pBR322 no escuro. Poços 6-7 complexo a $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ + DNA pBR322 a $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sob irradiação no azul (6) e no verde (7).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Não foi observado nenhum sinal de degradação nos poços que continham apenas pBR322, seja no escuro ou seja no claro, predominando apenas a forma nativa (forma I). Sob nenhuma irradiação a forma I desaparece quase por completo do DNA quando $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ está presente. É provável que o complexo, na concentração utilizada, já ocasione uma moderada degradação no DNA por outra via que não a fotogeração de espécies radicalares, como processos de clivagem hidrolítica na ausência de luz. Em contraste, nas condições de irradiação no azul e no verde, o aparecimento da forma II (poços 6 e 7) sugere que o complexo é capaz de clivar o plasmídeo na forma II. Nos poços irradiados 6 e 7, além do surgimento da forma II, é notória a presença de bandas arrastadas que remetem à sugestão da formação de fotoadutos a partir da forma I.

Dada a capacidade já evidenciada do $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ produzir oxigênio singlete (Figuras 52 e 53), é plausível relacioná-la com a observada clivagem plasmidal. Apesar do alto valor de Φ_{Δ} , os experimentos de titulação com DNA por UV-Vis e competição com EB sugeriram apenas uma interação moderada com DNA, fatores que, provavelmente, explicariam o total não desaparecimento da forma I; em contra-mão dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, cujas constantes intrínsecas de interação excedem o valor de 10^6 e, portanto, são capazes de se ligarem mais intensamente ao DNA. Apesar dos complexos com dppz clivarem o plasmídeo mais eficientemente numa determinada região do visível (λ_{irr} entre 463 a

632 nm), o complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ pode ainda ser relevante como potencial molécula no emprego em terapia fotodinâmica. Afinal, moléculas que atuem moderadamente e reversivelmente em DNA também são requeridas no campo de estudo da terapia fotodinâmica^{11, 12, 13, 16}.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os compostos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ foram totalmente caracterizados e suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas foram investigadas. A interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H são compatíveis com a estrutura proposta dos três complexos sintetizados. A análise dos sinais por COSY indicam fortemente a formação de uma mistura isomérica dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$.

O ensaio de geração de oxigênio singlete com DPBF explicitamente demonstrou que os valores de Φ_{Δ} seguem a tendência $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+} > [\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} > [\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, evidenciando a substancial importância dos cromóforos naftil e antracênil nos processos de formação de oxigênio singlete. Além disso, vale destacar que, aparentemente, o número de substituintes antracênil aumenta significativamente o valor de Φ_{Δ} comparado ao valor do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Ant}]^{2+}$ ($\Phi_{\Delta} = 0,74$).

Os valores das constantes de ligação (K_b) com CT DNA seguem a ordem $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$. A magnitude dos valores para $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ é equivalente a de moléculas intercalantes ($K_b \sim 10^6$), diferindo moderadamente do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$. O menor valor de K_b para $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ provavelmente justifica-se pela falta de geometria e rigidez estrutural para um eficiente encaixe no sítio de intercalação. Do mesmo modo que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, os três compostos interagem preferencialmente via sulco menor, como visto nos ensaios com Hoechst. Os resultados obtidos da interação com quadruplex indicam que os dois complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ interagem mais fortemente com a forma G-DNA do que a sua forma precursora (ss-DNA), sendo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ mais intenso na interação do que $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$. Os espectros de dicroísmo circular apontam que $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ tendem a induzir a formação de G-DNA. A interação de ss-DNA e G-DNA sugerem uma interação de caráter cinético mais lento com $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$, visto que o incremento do sinal após adição de DNA é muito superior aos dois outros complexos com dppz.

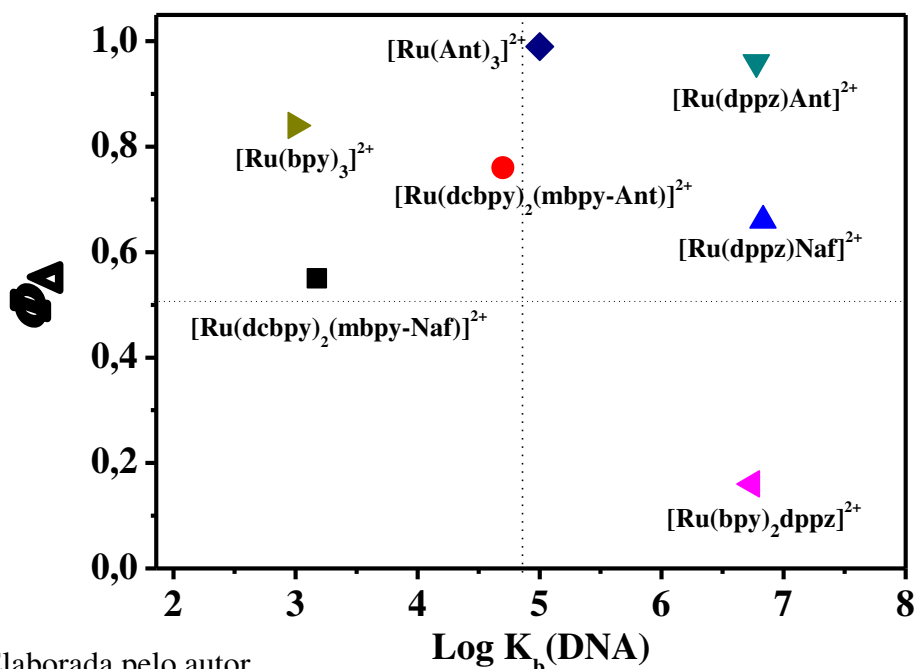
A fotoclivagem de pBR322 na presença dos complexos é, aparentemente, mais eficiente no azul, notadamente influenciada pela conjugação aromática dos cromóforos. O complexo $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ mostrou-se inferior na fotoclivagem plasmidial comparativamente aos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$, provavelmente devido ao seu moderado valor de K_b ($\sim 10^5$).

A atividade microbiana dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ na presença da bactéria *S. aureus* é superior ao do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, sendo

potencializada quase duas vezes sob irradiação no azul. O complexo $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ desempenhou melhor atividade bactericida do que $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, sendo possível corroborar com os respectivos valores de Φ_{Δ} dos complexos.

Um gráfico de correlação da geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) contra o logaritmo da constante de interação com DNA (Figura 59) demonstra que os complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ são aqueles que apresentam maiores de K_b e Φ_{Δ} , características que podem torná-las ferramentas úteis para o uso em TFD. O $[\text{Ru}(\text{Ant})_3]^{2+}$ aproxima-se das características dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{mbpy}-\text{Naf})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{mbpy}-\text{Ant})]^{2+}$, reportados na literatura¹¹. Estes foram inseridos na Figura 59 a título de comparação com os sistemas desse estudo.

Figura 59 – Correlação de geração de oxigênio singlete e constante de afinidade a DNA dos complexos $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Naf}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Ant}]^{2+}$ e outros sistemas polipiridínicos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em suma, os resultados obtidos nos ensaios de geração de oxigênio singlete, atividade microbiana e interação com DNA amplificam o potencial desses compostos como componentes úteis na terapia contra câncer e agentes bactericidas, cujos efeitos podem ser consideravelmente promissores sob ativação luz visível.

Como perspectiva de trabalho têm-se como objetivo a aplicação direta dos complexos aqui estudados em outras moléculas de interesse biológico, tal como proteínas, e

também em diferentes sistemas biológicos, tais como ensaios *in vitro* com células cancerígenas, bactérias e fungos.

REFERÊNCIAS

- 1 TROIAN-GAUTIER, Ludovic; MOUCHERON, Cecile. Ruthenium(II) complexes bearing fused polycyclic ligands: From fundamental aspects to potential applications. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5028-5087, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules19045028>. Acesso em: 17 jul. 2015.
- 2 JURIS, A. *et al.* Ru (II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 84, p. 85-277, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(88\)80032-8](https://doi.org/10.1016/0010-8545(88)80032-8). Acesso em: 6 nov. 2018.
- 3 BHASIKUTTAN, Achikanath C. *et al.* Ultrafast fluorescence detection in Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) complex in solution: relaxation dynamics involving higher excited states. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 28, p. 8398-8405, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja026135h>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- 4 DAMRAUER, Niels H. *et al.* Femtosecond dynamics of excited-state evolution in [Ru(bpy)3]2+. **Science**, v. 275, n. 5296, p. 54-57, 1997. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/275/5296/54>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- 5 YANG, Xiao-Juan *et al.* Heteroleptic 5, 5'-disubstituted-2, 2'-bipyridine complexes of ruthenium (II): spectral, electrochemical, and structural investigations. **Inorganica Chimica Acta**, v. 318, n. 1-2, p. 103-116, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00414-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00414-5). Acesso em: 10 jan. 2017.
- 6 WANG, Xian-yong; DEL GUERZO, Andre; SCHMEHL, Russell 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**, v. 5, n. 1, p. 55-77, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2004.01.002>. Acesso em: 21 jul. 2016.
- 7 DE CARVALHO, Idalina MM; DE SOUSA MOREIRA, Ícaro; GEHLEN, Marcelo H. Synthesis, characterization, and photophysical studies of new bichromophoric ruthenium (II) complexes. **Inorganic chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1525-1531, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic025831f>. Acesso em: 18 dez. 2017.
- 8 WILSON, G. J.; SASSE, W. H. F.; MAU, AW-H. Singlet and triplet energy transfer processes in ruthenium (II) bipyridine complexes containing covalently bound arenes. **Chemical physics letters**, v. 250, n. 5-6, p. 583-588, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(96\)00056-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(96)00056-5). Acesso em: 19 dez. 2016.
- 9 DING, Hui-Ying *et al.* Aryl-modified ruthenium bis (terpyridine) complexes: Quantum yield of 1O2 generation and photocleavage on DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 177, n. 2-3, p. 286-294, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.06.008>. Acesso em: 21 mar. 2017.
- 10 MARIAPPAN, Mariappan; MAIYA, Bhaskar G. Effects of Anthracene and Pyrene Units on the Interactions of Novel Polypyridylruthenium (II) Mixed-Ligand Complexes with

- DNA. **European journal of inorganic chemistry**, v. 2005, n. 11, p. 2164-2173, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejic.200400952>. Acesso em: 15 mai. 2018.
- 11 ABREU, Felipe Diógenes *et al.* Ruthenium (II) bipyridine complexes with pendant anthracenyl and naphthyl moieties: A strategy for a ROS generator with DNA binding selectivity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 439, p. 92-99, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.09.034>. Acesso em: 9 fev. 2017.
- 12 ZEGLIS, Brian M.; PIERRE, Valerie C.; BARTON, Jacqueline K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2007/cc/b710949k/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- 13 PAGES, Benjamin J. *et al.* Metal complex interactions with DNA. **Dalton transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/dt/c4dt02700k/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 30 nov. 2017.
- 14 SAUVAGE, Jean-Pierre; TURRO, Nicholas J. Molecular “Light Switch” for DNA R~(bpy)~(dppz)~. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 11, n. 2, p. 4960-4962, 1990. Disponível em: <http://nathan.instras.com/MyDocsDB/doc-502.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2017.
- 15 HARTSHORN, Richard M.; BARTON, Jacqueline K. Novel dipyrrophenazine complexes of ruthenium (II): exploring luminescent reporters of DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 15, p. 5919-5925, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00041a002>. Acesso em: 16 out. 2015.
- 16 KNOLL, Jessica D.; TURRO, Claudia. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination chemistry reviews**, v. 282, p. 110-126, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.018>. Acesso em: 4 abr. 2018.
- 17 OLSON, E. J. C. *et al.* First observation of the key intermediate in the “light-switch” mechanism of [Ru (phen) 2dppz] 2+. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 47, p. 11458-11467, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja971151d>. Acesso em: 26 out. 2015.
- 18 FUERTES, Miguel A. *et al.* Molecular Mechanisms for the B– Z Transition in the Example of Poly [d (G– C)⊖ d (G– C)] Polymers. A Critical Review. **Chemical reviews**, v. 106, n. 6, p. 2045-2064, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr050243f>. Acesso em: 12 mar. 2017.
- 19 AMATO, Jussara *et al.* Noncanonical DNA Secondary Structures as Drug Targets: the Prospect of the i-Motif. **ChemMedChem**, v. 9, n. 9, p. 2026-2030, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402153>. Acesso em: 8 jul. 2018.
- 20 SHI, Shuo *et al.* Interaction of [Ru (bpy) 2 (dppz)] 2+ with human telomeric DNA: Preferential binding to G-quadruplexes over i-motif. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 370-377, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.003>. Acesso em: 22 mai. 2018.

- 21 NEIDLE, S. Quadruplex nucleic acids as targets for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 41, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0041>. Acesso em: 29 jun. 2018.
- 22 SHADE, Chad M. *et al.* Duplex-Selective Ruthenium-Based DNA Intercalators. **Chemistry—A European Journal**, v. 21, n. 31, p. 10983-10987, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/chem.201502095>. Acesso em: 13 nov. 2017.
- 23 PLATELLA, Chiara *et al.* G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 5, p. 1429-1447, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.027>. Acesso em: 21 set. 2018.
- 24 ZHOU, Jun *et al.* Reevaluation of the stability of G-quadruplex structures under crowding conditions. **Biochimie**, v. 121, p. 204-208, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.12.012>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- 25 JENKINS, Yonchu *et al.* Characterization of dipyrrophenazine complexes of ruthenium (II): the light switch effect as a function of nucleic acid sequence and conformation. **Biochemistry**, v. 31, n. 44, p. 10809-10816, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00159a023>. Acesso em: 28 jun. 2017.
- 26 HIORT, Catharina; LINCOLN, Per; NORDÉN, Bengt. DNA binding of DELTA.-and LAMBDA.-[Ru (phen) 2DPPZ] 2+. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 9, p. 3448-3454, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00062a007>. Acesso em: 18 dez. 2018.
- 27 MCCONNELL, Anna J.; SONG, Hang; BARTON, Jacqueline K. Luminescence of [Ru (bpy) 2 (dppz)] 2+ bound to RNA mismatches. **Inorganic chemistry**, v. 52, n. 17, p. 10131-10136, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic401531r>. Acesso em: 17 jun. 2016.
- 28 LIM, Mi Hee *et al.* Sensitivity of Ru (bpy) 2dppz2+ luminescence to DNA defects. **Inorg. Chem**, v. 48, n. 12, p. 5392-5397, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic900407n>. Acesso em: 2 ago. 2017.
- 29 NAIR, Rajesh B. *et al.* Synthesis and DNA-binding properties of [Ru (NH3) 4dppz] 2+. **Inorganic chemistry**, v. 37, n. 1, p. 139-141, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic970432j>. Acesso em: 19 nov. 2015.
- 30 LIU, Jin-Gang *et al.* Synthesis, characterization and DNA-binding properties of novel dipyrrophenazine complex of ruthenium (II):[Ru (IP) 2 (DPPZ)] 2+. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 73, n. 1-2, p. 117-122, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00011-2). Acesso em: 6 out. 2017.
- 31 PATEL, Kirti K. *et al.* Aryl substituted ruthenium bis-terpyridine complexes: intercalation and groove binding with DNA. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 220-229, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00423-8](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00423-8). Acesso em: 28 mai. 2016.

- 32 TAN, Li-Feng; CHAO, Hui. DNA-binding and photocleavage studies of mixed polypyridyl ruthenium (II) complexes with calf thymus DNA. **Inorganica chimica acta**, v. 360, n. 6, p. 2016-2022, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.10.016>. Acesso em: 7 mai. 2018.
- 33 CHEN, Xing *et al.* Effect of ancillary ligands on the topoisomerases II and transcription inhibition activity of polypyridyl ruthenium (II) complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 104, n. 5, p. 576-582, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.01.010>. Acesso em: 18 ago. 2015.
- 34 LIU, Jin-gang *et al.* Interaction of [Ru (dmp) 2 (dppz)] 2+ and [Ru (dmb) 2 (dppz)] 2+ with DNA: effects of the ancillary ligands on the DNA-binding behaviors. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 19, p. 5045-5050, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic001124f>. Acesso em: 12 jul. 2016.
- 35 PASZKO, Edyta *et al.* Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 8, n. 1, p. 14-29, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>. Acesso em: 14 set. 2018.
- 36 SZACIŁOWSKI, Konrad *et al.* Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. **Chemical reviews**, v. 105, n. 6, p. 2647-2694, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr030707e>. Acesso em: 6 ago. 2016.
- 37 TANIELIAN, Charles; WOLFF, Christian; ESCH, Marc. Singlet oxygen production in water: aggregation and charge-transfer effects. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 16, p. 6555-6560, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp952107s>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- 38 BARRY, Nicolas PE; SADLER, Peter J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. **Chemical communications**, v. 49, n. 45, p. 5106-5131, 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/CC/c3cc41143e#!divAbstract>. Acesso em: 4 ago. 2018.
- 39 SOUSA, E. H. S.; VIEIRA, F. G. M.; BUTLER, J.S.; BASSO, L.A.; SANTIAGO, D.S.; DIÓGENES, I.C.N.; LOPES, L.G. F.; SADLER, P.J. [Fe(CN)₅(isoniazid)]³⁻: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **Journal of Inorganic Biochem.**, v. 140, p. 236-244, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.002>. Acesso em: 28 out. 2017.
- 40 RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. *et al.* Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of Mycobacterium tuberculosis infection. **International journal of antimicrobial agents**, v. 40, n. 2, p. 182-185, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.019>. Acesso em: 21 mai. 2016.
- 41 LI, Fangfei; COLLINS, J. Grant; KEENE, F. Richard. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 8, p. 2529-2542, 2015. Disponível em:

- <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/CS/C4CS00343H#!divAbstract>. Acesso em: 6 abr. 2017.
- 42 SPAGNUL, Cinzia; TURNER, Lauren C.; BOYLE, Ross W. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 11-30, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.021>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- 43 GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 65, p. 45-80, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>. Acesso em: 17 jun. 2016.
- 44 WILKINSON, Francis; HELMAN, W. Phillip; ROSS, Alberta B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. **Journal of physical and chemical reference data**, v. 22, n. 1, p. 113-262, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.555934>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- 45 ZHOU, Qian-Xiong *et al.* A new heteroleptic ruthenium (II) polypyridyl complex with long-wavelength absorption and high singlet-oxygen quantum yield. **Chemistry–A European Journal**, v. 16, n. 10, p. 3157-3165, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/chem.200902563>. Acesso em: 29 jul. 2018.
- 46 FOXON, Simon P. *et al.* Photophysical properties and singlet oxygen production by ruthenium (II) complexes of benzo [i] dipyrindo [3, 2-a: 2', 3'-c] phenazine: spectroscopic and TD-DFT study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 46, p. 12754-12762, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp906716g>. Acesso em: 21 dez. 2015.
- 47 MCCAFFERTY, Dewey G. *et al.* Synthesis of redox derivatives of lysine and their use in solid-phase synthesis of a light-harvesting peptide. **Tetrahedron**, v. 51, n. 4, p. 1093-1106, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(94\)01018-U](https://doi.org/10.1016/0040-4020(94)01018-U). Acesso em: 28 out. 2015.
- 48 DICKESON, J. E.; SUMMERS, L. A. Derivatives of 1, 10-Phenanthroline-5, 6-quinone. **Australian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1023-1027, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/CH9701023>. Acesso em: 7 jan. 2016.
- 49 LISKA, Paul *et al.* cis-Diaquabis (2, 2'-bipyridyl-4, 4'-dicarboxylate) ruthenium (II) sensitizes wide band gap oxide semiconductors very efficiently over a broad spectral range in the visible. **Journal of the american chemical society**, v. 110, n. 11, p. 3686-3687, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00219a068>. Acesso em: 4 jun. 2017.
50. FRISCH, M. J., *et.al.* **Gaussian 09**. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
- 51 STEPHENS, P. J. *et al.* Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 45, p. 11623-11627, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/j100096a001>. Acesso em: 15 jun. 2018.

- 52 BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **J. Chem. Phys.**, v. 98, p. 11623–11627, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.464913>. Acesso em: 7 nov. 2017.
- 53 LEE, Chengteh; YANG, Weitao; PARR, Robert G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical review B**, v. 37, n. 2, p. 785, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>. Acesso em: 21 out. 2015.
- 54 TOMASI, Jacopo; MENNUCCI, Benedetta; CAMMI, Roberto. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical reviews**, v. 105, n. 8, p. 2999-3094, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr9904009>. Acesso em: 6 mai. 2018.
- 55 PEARSON, P.; BOND, A. M.; DEACON, G. B.; FORSYTH, C.; SPICCIA, L. Synthesis and characterisation of bis(2,2'-bipyridine)(4-carboxy-4'-(pyrid-2-ylmethylamido)-2,2'-bipyridine)ruthenium(II) di(hexafluorophosphate): Comparison of spectroelectrochemical properties with related complexes. **Inorg. Chim. Acta**, v. 361, p. 601-612, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.03.031>. Acesso em: 30 fev. 2017.
- 56 ZAKEERUDDIN, S. M. *et al.* Stepwise assembly of tris-heteroleptic polypyridyl complexes of ruthenium (II). **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 20, p. 5251-5259, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic980357s>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- 57 PEEK, BRIAN M. *et al.* 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**, v. 38, n. 2, p. 114-123, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb01418.x>. Acesso em: 29 jun. 2017.
- 58 YAGI, Koji *et al.* Syntheses of bipyridine-containing polyamides and their metallation with ruthenium ions. **Inorganica chimica acta**, v. 131, n. 2, p. 273-275, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)96037-7](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)96037-7). Acesso em: 6 nov. 2018.
- 59 ABREU, Felipe Diógenes *et al.* Ruthenium (II) bipyridine complexes with pendant anthracenyl and naphthyl moieties: A strategy for a ROS generator with DNA binding selectivity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 439, p. 92-99, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.09.034>. Acesso em: 6 out. 2017.
- 60 KUSHWAHA, Neelottama; SAINI, Rakesh Kumar; KUSHWAHA, Swatantra KS. Synthesis of some amide derivatives and their biological activity. **Int. J. Chem. Tech. Res**, v. 3, p. 203-209, 2011. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/e38e/8e1113403d986937bfd8c84ff4588cd87592.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2016.
- 61 LO, Kenneth Kam-Wing; LEE, Terence Kwok-Ming. Luminescent ruthenium (II) polypyridine biotin complexes: Synthesis, characterization, photophysical and electrochemical properties, and avidin-binding studies. **Inorganic chemistry**, v. 43, n. 17, p. 5275-5282, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic049750q>. Acesso em: 6 abr. 2016.

- 62 KIZAKI, Tetsuro; MATSUMOTO, Takahiro; OGO, Seiji. Dissolved N₂ sensing by pH-dependent Ru complexes. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1339-1344, 2010. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/dt/b918940h/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 25 nov. 2017.
- 63 NAZEERUDDIN, M. Khaja *et al.* Conversion of light to electricity by cis-X₂bis (2, 2'-bipyridyl-4, 4'-dicarboxylate) ruthenium (II) charge-transfer sensitizers (X= Cl-, Br-, I-, CN-, and SCN-) on nanocrystalline titanium dioxide electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 14, p. 6382-6390, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00067a063>. Acesso em: 18 ago. 2018.
- 64 MCKINLEY, A. W.; LINCOLN, P.; TUIITE, E. M. Environmental effects on the photophysics of transition metal complexes with dipyrido[2,3-*a*:3',2'-*c*]phenazine (dppz) and related ligands. **Coord. Chem. Rev.**, v. 255, p. 2676-2692, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.012>. Acesso em: 20 jun. 2017.
- 65 DE CARVALHO, Idalina MM; DE SOUSA MOREIRA, Ícaro; GEHLEN, Marcelo H. Synthesis, characterization, and photophysical studies of new bichromophoric ruthenium (II) complexes. **Inorganic chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1525-1531, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic025831f>. Acesso em: 23 dez. 2016.
- 66 YANG, X.-J. *et al.* Heteroleptic 5,5'-disubstituted-2,2'-bipyridine complexes of ruthenium(II): spectral, electrochemical, and structural investigations. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 318, p. 103-116, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00414-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00414-5). Acesso em: 3 mai. 2018.
- 67 PERKAMPUS, H. H.; SANDEMAN, I.; TIMMONS, C. J. **DMS UV Atlas of Organic Compounds**. 1966.
- 68 MECKLENBURG, Sandra L. *et al.* Photoinduced electron transfer in amino acid assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 13, p. 5479-5495, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00066a017>. Acesso em: 14 ago. 2017.
- 69 NAIR, Rajesh B.; CULLUM, Brian M.; MURPHY, Catherine J. Optical properties of [Ru(phen) 2dppz] 2+ as a function of nonaqueous environment. **Inorganic chemistry**, v. 36, n. 6, p. 962-965, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic960862u>. Acesso em: 25 abr. 2016.
- 70 WEINHEIMER, Corey *et al.* Effect of a steric spacer on chromophoric interactions of ruthenium complexes containing covalently bound anthracene. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 119-126, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(93\)03723-T](https://doi.org/10.1016/1010-6030(93)03723-T). Acesso em: 21 dez. 2018.
- 71 STROUSE, Geoffrey F. *et al.* Influence of electronic delocalization in metal-to-ligand charge transfer excited states. **Inorganic Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 473-487, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic00106a009>. Acesso em: 16 jun. 2016.
- 72 PADILLA, Roberto *et al.* Pushing the limits of structurally-diverse light-harvesting Ru (II) metal-organic chromophores for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and**

- Photobiology A: Chemistry**, v. 322, p. 67-75, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.02.006>. Acesso em: 27 out. 2017.
- 73 WILSON, Gerard J. *et al.* Excited-state processes in ruthenium (II) bipyridine complexes containing covalently bound arenes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 101, n. 27, p. 4860-4866, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp970667g>. Acesso em: 1 mar. 2018.
- 74 BURYA, Scott J.; LUTTERMAN, Daniel A.; TURRO, Claudia. Absence of quenching by [Fe (CN) 6] 4- is not proof of DNA intercalation. **Chemical Communications**, v. 47, n. 6, p. 1848-1850, 2011. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/cc/c0cc04973e/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 29 nov. 2015.
- 75 CHEN, Yan-Min *et al.* pH-and DNA-induced dual molecular light switches based on a novel ruthenium (II) complex. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1395-1404, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.08.002>. Acesso em: 26 set. 2015.
- 76 NAIR, Rajesh B.; MURPHY, Catherine J. On the interaction of [Ru (phen) 2dppz] 2+(dppz= dipyrido [3, 2-a: 2', 3'-c] phenazine) with different oligonucleotides. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 69, n. 1-2, p. 129-133, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(97\)10033-2](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(97)10033-2). Acesso em: 1 jun. 2016.
- 77 JENKINS, Yonchu *et al.* Characterization of dipyridophenazine complexes of ruthenium (II): the light switch effect as a function of nucleic acid sequence and conformation. **Biochemistry**, v. 31, n. 44, p. 10809-10816, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00159a023>. Acesso em: 8 jul. 2018.
- 78 MCKINLEY, Andrew W.; LINCOLN, Per; TUIITE, Eimer M. Sensitivity of [Ru (phen) 2 dppz] 2+ light switch emission to ionic strength, temperature, and DNA sequence and conformation. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 11, p. 4081-4090, 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/dt/c3dt32555e>. Acesso em: 16 abr. 2017.
- 79 ANDERSSON, Johanna *et al.* Lifetime heterogeneity of DNA-bound dppz complexes originates from distinct intercalation geometries determined by complex-complex interactions. **Inorganic chemistry**, v. 52, n. 2, p. 1151-1159, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ic302626d>. Acesso em: 17 nov. 2016.
- 80 SONG, Hang; KAISER, Jens T.; BARTON, Jacqueline K. Crystal structure of Δ -[Ru (bpy) 2 dppz] 2+ bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation. **Nature chemistry**, v. 4, n. 8, p. 615, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nchem.1375>. Acesso em: 24 out. 2018.
- 81 KHAN, Gul Shahzada *et al.* Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 115, p. 105-118, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.07.003>. Acesso em: 16 jun. 2017.
- 82 PETTINARI, Riccardo *et al.* Arene-ruthenium (II) acylpyrazolonato complexes: apoptosis-promoting effects on human cancer cells. **Journal of medicinal chemistry**, v.

- 57, n. 11, p. 4532-4542, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm500458c>. Acesso em: 9 ago. 2016.
- 83 HAN, H.; HURLEY, L. H. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, p. 136-142, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10740289>. Acesso em: 1 set. 2016.
- 84 RUTTKAY-NEDECKY, Branislav *et al.* G-quadruplexes as sensing probes. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 14760-14779, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules181214760>. Acesso em: 30 nov. 2018.
- 85 BURGE, Sarah *et al.* Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 19, p. 5402-5415, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>. Acesso em: 16 dez. 2015.
- 86 LI, Q. *et al.* Anticancer activity of novel ruthenium complex with 1,10-phenanthroline-selenazole as potent telomeric G-quadruplex inhibitor. **Inorg.Chem. Commun.**, v. 20, p. 142-146, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2012.02.037>. Acesso em: 8 set. 2018.
- 87 LI, Qian *et al.* Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity studies of ruthenium (II) complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 130, p. 122-129, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.006>. Acesso em: 18 dez. 2016.
- 88 YU, Hui-Juan *et al.* Single oxygen-mediated DNA photocleavage of a di-bithiazolyl ruthenium (II) complex [Ru (btz) 2 (dppz)] 2+. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, n. 5, p. 553-556, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2008.02.008>. Acesso em: 4 jun. 2016.
- 89 SUN, Yujie *et al.* Efficient DNA photocleavage by [Ru (bpy) 2 (dppn)] 2+ with visible light. **Chemical Communications**, v. 46, n. 14, p. 2426-2428, 2010. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/cc/b925574e/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 20 set. 2018.
- 90 GOWDA, KR Sangeetha *et al.* Mechanism of DNA binding and cleavage. **Biomed Biotechnol**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.920.7470&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 18 nov. 2017.
- 91 FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; SHINGU, H. A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons. **J. Chem. Phys.**, v. 20, p. 722, 1952. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.1700523>. Acesso em: 16 abr. 2017.
- 92 KURITA, Noriyuki; KOBAYASHI, Kinya. Density functional MO calculation for stacked DNA base-pairs with backbones. **Computers & chemistry**, v. 24, n. 3-4, p. 351-357, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0097-8485\(99\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0097-8485(99)00071-6). Acesso em: 10 nov. 2018.

- 93 KLOPMAN, Gilles. Chemical reactivity and the concept of charge-and frontier-controlled reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 2, p. 223-234, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja01004a002>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- 94 BOLHUIS, Albert *et al.* Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 313-317, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.12.004>. Acesso em: 14 jun. 2017.
- 95 LAM, P.-L. *et al.* Development of ruthenium (II) complexes as topical antibiotics against methicillin resistant Staphylococcus aureus. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 10, p. 3949-3957, 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/dt/c3dt52879k/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 5 mar. 2018.
- 96 SMITH, N. A. *et al.* Combatting AMR: photoactivatable ruthenium(II)-isoniazid complex exhibits rapid selective antimycobacterial activity. **J.Chem. Sci.**, v. 8, p. 395– 404, 2017. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/sc/c6sc03028a>. Acesso em: 13 fev. 2018.
- 97 KHAN, N. U. H. *et al.* Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of chiral Ru(II) salen complexes. **Spectrochim. Acta**, v. 74, p. 113– 119, 2009. Disponível em: <https://europemc.org/abstract/med/19523873>. Acesso em: 7 ago. 2015.
- 98 LEI, Wanhua *et al.* Photodynamic inactivation of Escherichia coli by Ru (II) complexes. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 6, p. 887-890, 2011. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/pp/c0pp00275e/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 20 jul. 2017.
- 99 MALIK, Zvi; HANANIA, Judith; NITZAN, Yeshayau. New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins—An alternative approach to antimicrobial drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 5, n. 3-4, p. 281-293, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85044-W](https://doi.org/10.1016/1011-1344(90)85044-W). Acesso em: 28 mar. 2018.