

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Interação com o DNA e Fototoxicidade de
Porfirinas Tetracatiônicas de Rutênio, Areno e
Fosfina em Células Tumoriais de Ovário**

George Bueno Santana Pereira*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de DOUTOR EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

*** bolsista: CAPES**

São Carlos - SP
2025

Pereira, George Bueno Santana

Interação com o DNA e fototoxicidade de porfirinas tetracatiônicas de rutênio, areno e fosfina em células tumorais de ovário / George Bueno Santana Pereira -- 2025.
217f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Fillipe Vieira Rocha

Banca Examinadora: Fillipe Vieira Rocha, Sofia Nikolaou, Alzir Azevedo Batista, Ana Maria da Costa Ferreira, Ana Paula de Lima Batista

Bibliografia

1. Química Inorgânica. 2. Química Bioinorgânica. 3. Câncer. I. Pereira, George Bueno Santana. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



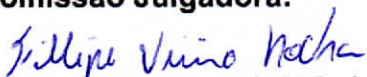
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

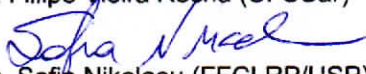
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

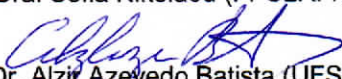
Folha de Aprovação

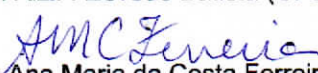
Defesa de Tese de Doutorado do candidato George Bueno Santana Pereira, realizada em 27/01/2025.

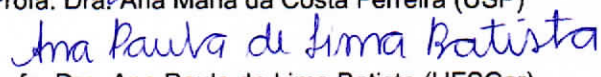
Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)


Profa. Dra. Sofia Nikolaou (FFCLRP/USP)


Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)


Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira (USP)


Profa. Dra. Ana Paula de Lima Batista (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

***Seja a mudança que você
quer ver no mundo.***

Mahatma Gandhi

*Dedico esta tese a todos os
profissionais da Química e
alquimistas da alma do
presente, passado e futuro.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão à Unidade por toda sua manifestação e por proporcionar pessoas incríveis em minha vida. Ao meu pai, Maurício Jorge, minha mãe, Flora, e meu irmão, Paulo Ricardo, por me apoiarem incondicionalmente ao longo de toda minha trajetória. Se cheguei até aqui, foi graças ao amor e carinho dessas pessoas tão queridas.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha, pelos seis anos de orientação. Sou imensamente grato pelas conversas, pelo incentivo à minha carreira profissional, pelas parcerias acadêmicas, pelas viagens e, principalmente, por confiar no meu trabalho. Sem sombra de dúvida, foi o melhor orientador que eu poderia ter.

Aos colegas que contribuíram diretamente para os ensaios biológicos descritos nesta tese: Dr. Marcos Vinícius Palmeira-Mello, Dra. Jocely Lucena Dutra e MSc. Tamara Teixeira. Ao MSc. Carlos André, pelos experimentos de espectrometria de massas. À Profa. Dra. Ana Paula Batista, pelos estudos teóricos. Ao Dr. Pedro Henrique e Prof. Javier Ellena pelas medições de difração de raios-X. À Profa. Rose Maria Carlos e seus alunos Marco e Lorena pela ajuda na caracterização de espectroscopia de fluorescência. Esses experimentos e parcerias foram fundamentais para conferir relevância e solidez a este trabalho.

A todos os membros, ex-membros do laboratório CCQM e amigos dos laboratórios associados, que foram grandes companheiros nesta caminhada: Lucas, Amos, Dario, Gabriela, Paulo (da eletroquímica), Vitão, Belém, Josenilton, Isabella, Victoria, Mariane e Ludimila. À nova geração do laboratório: Fernandinho, Letícia, Maria Eduarda, Ana Júlia, Yumi e Ana Beatriz, que trouxeram jovialidade e renovação ao ambiente. Um agradecimento especial aos colegas Josias e Mauro, por todos esses anos de parceria e verdadeira amizade. Muito obrigado pelas conversas e apoio.

À minha namorada e colega, Nádiya, por todo apoio e incentivo na minha vida pessoal e acadêmica. Obrigado por tornar minha vida mais leve e feliz.

Aos colegas do LERCI, deixo minha gratidão. Um agradecimento especial ao Prof. Alzir Azevedo Batista pelas conversas, discussões e por compartilhar sua valiosa experiência acadêmica.

Aos servidores do Departamento de Química da UFSCar, especialmente à Luciana Vizotto, pelas análises elementares. Ao Programa de Pós-Graduação em Química, com um reconhecimento especial às secretárias Luciani, Cristina e Thainá. Às queridas tias da limpeza, por manterem o ambiente impecável e por proporcionarem conversas sempre tão enriquecedoras.

Gostaria de agradecer aos amigos que conheci em São Carlos e às velhas amigas Mykaelli e Luana, por proporcionarem um ambiente acolhedor nas festinhas.

Aos amigos e amigas da Escola, pelos ensinamentos e por não permitirem que o fogo da busca pela Verdade se apague.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle eMedium</i> (meio de cultura)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray Ionization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Constante de acoplamento
MS	Mass Spectrometry
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TBE	Solução tampão constituído de mistura de Tris, ácido bórico e EDTA.
TMS	Tetrametilsilano
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
UV-vis	Região do ultravioleta-visível
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IC₅₀	Concentração inibitória de 50%
λ	Comprimento de onda
m	10 ⁻³
μ	10 ⁻⁶
n	10 ⁻⁹
Å	10 ⁻¹⁰ metros

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1- Parâmetros utilizados na ionização para a detecção dos padrões isotópicos.....	39
TABELA 4.1 - Valores das porcentagens dos elementos C, H, N e condutividade molar em 10^{-3} mol L ⁻¹	64
TABELA 4.2 - Distâncias e ângulos de ligação dos entre os átomos da esfera de coordenação do rutênio(II) no complexo Mim, obtidos por difração de raios X em monocristal.	77
TABELA 4.3 - Atribuição das bandas, comprimento de onda e logaritmo da absorção molar do máximo das bandas de absorção na região do UV-vis para os compostos sintetizadas utilizando diclorometano como solvente.	84
TABELA 4.4 - Atribuição de bandas do espectro de infravermelho para o precursor, ligante e complexos tipo PRAP.	86
TABELA 4.5 - Diferenças relativas das energias livre de Gibbs de diferentes conformações do complexo H ₂ P e dos compostos H ₂ P2 na conformação SRRR. Diferenças relativas considerando as estruturas mais estáveis.	89
TABELA 4.6 - Parâmetros físico-químicos obtidos pela interação de ct-DNA com os complexos do tipo PRAP.....	96
TABELA 4.7 - Logaritmo dos valores de coeficiente de partição dos compostos PRAP sintetizados nesse trabalho.	124
TABELA 4.8 - Dados de fotoluminescência em diclorometano para as porfirinas sintetizadas.	125
TABELA 4.9 - Valores médios de IC ₅₀ em μ M com os índices de seletividade e índice fototóxico para os complexos sintetizados nesse trabalho na presença e ausência de irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415$ nm, 30 mW cm ⁻² , 9 J cm ⁻²) linhagens A2780, MRC-5 em diferentes tempos de tratamento.	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para o triênio de 2023-2025 por sexo, exceto pele não melanoma.	3
FIGURA 1.2 – (A) Compostos de platina utilizados como quimioterápicos no mundo. (B) Estrutura cristalina de DNA estabelecendo ligação com a cisplatina em destaque. PDB: 1A84.	5
FIGURA 1.3 - (A) Compostos de rutênio que foram utilizados em testes clínicos. (B) Complexos que estão em testes clínicos ou pré-clínicos como quimioterápico atualmente. (D) Composto de rutênio, fotossensibilizante, na fase II dos testes clínicos para o tratamento de câncer de bexiga.....	8
FIGURA 1.4 - Diagrama de Jablonski explicando o funcionamento do mecanismo do tipo I e tipo II para um fotossensibilizante.....	10
FIGURA 1.5 - Efeito de penetração na pele de luz do espectro eletromagnético na região do visível.	11
FIGURA 1.6 - Estruturas básicas das porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas e seus respectivos espectros de absorção na região do ultravioleta visível. Adaptado ⁴⁸	13
FIGURA 1.7 - Posições e designações dos átomos no macrociclo tetrapirrólico segundo a nomenclatura de Hans Fisher (A) e da IUPAC (B).	14
FIGURA 1.8 - Reatividade do anel macrociclo da porfirina na sua forma de base livre quando submetida a condições ácidas (A), básicas (B) e a reação de complexação (C).....	14
FIGURA 1.9 - Estruturas de anéis tetrapirrólicos de ocorrência natural: protoporfirina IX, clorofila, bacterioclorofila e cobalamina.....	16
FIGURA 1.10 - Estrutura do <i>Photofrin</i> (A) e esquema ilustrativo do composto ALA sendo convertido em Protoporfirina IX na mitocôndria (B).....	18
FIGURA 1.11 - Estruturas das porfirinas tetracatiônicas derivadas da cisplatina e transplatina, desenvolvidas pelo grupo do Professor Spingler: trabalho de Naik, 2014 ⁵⁴ (A); Rubbiani, 2020 ⁵⁵ (B); Schneider, 2021 ⁵⁶ (C).....	20
FIGURA 1.12 - Representações dos modos de interação das porfirinas com o DNA: intercalação (A), interação via sulco menor (B) e via sulco maior (C), formação de complexo externo (D) e G-quadruplex (E).	21
FIGURA 1.13 - Estrutura da 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil))porfirina e estrutura de um fragmento de DNA co-cristalizado com a 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil))porfirinato de cobre(II). PDB: 231D	22
FIGURA 1.14 - Estruturas das porfirinas e metaloporfirinas tetracatiônicas derivadas da coordenação de complexos de platina(II) na periferia descrita por Lourenço e colaboradores ⁵⁸	23
FIGURA 1.15 - Estruturas das porfirinas e metaloporfirinas tetracatiônicas derivadas da coordenação de complexos de platina(II) e rutênio(II) na periferia da <i>meso</i> -tetra(2-tienil)porfirina (A) e <i>meso</i> -tetra(N-metil(4-piridil))porfirina (B) descritas por Iglesias e Oliveira ^{59,60} , respectivamente.	24

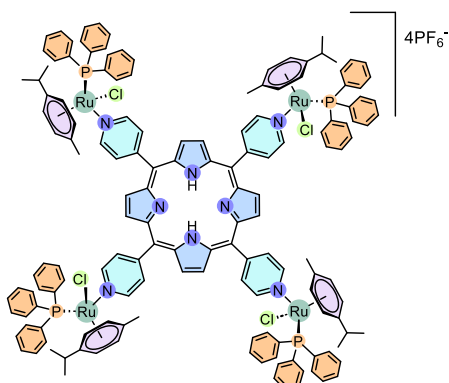
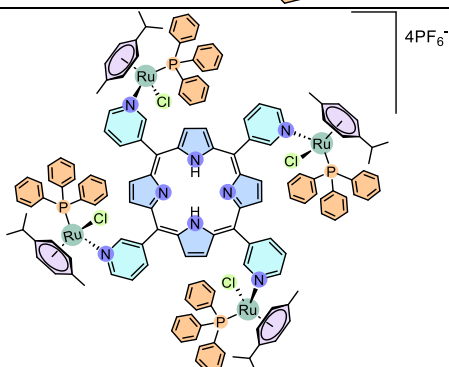
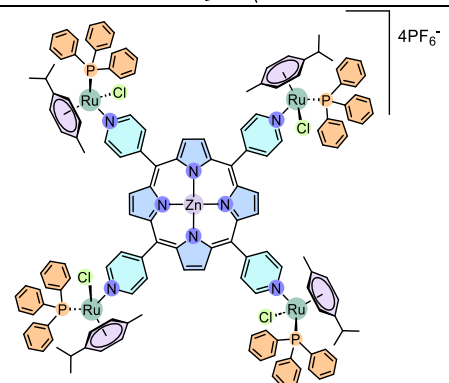
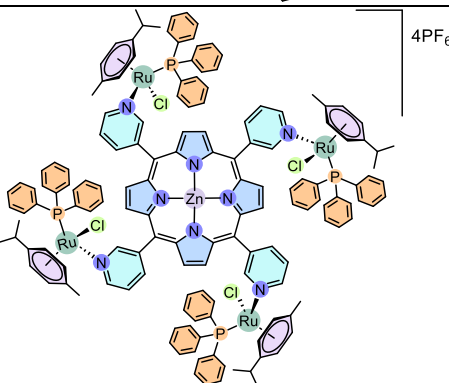
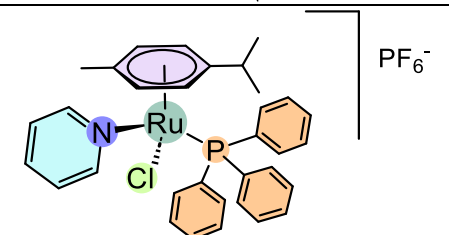
FIGURA 1.16 - Estrutura básica dos compostos PRAP (do inglês: <i>Phorphyrin, Ruthenium, Arene, Phosphine</i>).....	25
FIGURA 1.17 - Planejamento estrutural dos compostos PRAP desenvolvidos neste trabalho, partindo do complexo RAPTA-C, a fim de promover aumento de lipofilicidade, propriedades fotoquímicas e interação com o DNA.....	28
FIGURA 1.18 - Estruturas dos complexos PRAP e mimético (Mim) que foram utilizados neste trabalho.	29
FIGURA 4.1 - Esquema reacional para a formação dos complexos precursores P1 e P2.	61
FIGURA 4.2 - Esquema reacional para a formação do ligante <i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirina.	61
FIGURA 4.3 - Esquema reacional para a formação dos complexos H ₂ P e ZnP.	63
FIGURA 4.4 – Padrões isotópicos do espectro de massas (MS) para o íon-molecular [M+2PF ₆] ²⁺ do composto H ₂ P: (A) experimental e (B) teórico.....	65
FIGURA 4.5 – Espectros de massas (MS/MS) para o composto H ₂ P: (A) experimental; (B) aproximação do padrão isotópico experimental para o íon contendo rutênio, areno e fosfina; (C) padrão isotópico teórico do íon em questão.	66
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ¹ H para o composto H ₂ P em acetona-d ₆	69
FIGURA 4.7 - Mapa de contorno de COZY para o complexo H ₂ P e ampliação da região referente aos hidrogênios aromáticos do areno em cinza.	70
FIGURA 4.8 - Mapa de contorno de HSQC para o complexo H ₂ P e ampliação da região referente aos hidrogênios aromáticos dos arenos em cinza.	71
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹ H para o composto ZnP em acetona-d ₆	72
FIGURA 4.10 - Comparação entre os espectro de RMN ³¹ P{ ¹ H} para os compostos H ₂ P e [Ru(p-cim)(PPh ₃)Cl ₂] em acetona-d ₆	73
FIGURA 4.11 - Espectro de RMN ¹ H para o composto H ₂ P2 em acetona-d ₆	74
FIGURA 4.12 - Espectro de RMN ³¹ P{ ¹ H} para o composto H ₂ P2 em acetona-d ₆	74
FIGURA 4.13 - Espectro de RMN ¹ H para o composto H ₂ T3PyP em CDCl ₃ ..	75
FIGURA 4.14 - Estrutura cristalográfica para o complexo Mim, átomos representados no modo ORTEP (elipsoides 50%).	76
FIGURA 4.15 - Dados das interações intramoleculares para o complexo Mim. (A) Mapa de Hirshfeld. (B) gráfico <i>Fingerprint</i> dos principais átomos das interações intermoleculares. (C) gráfico da distribuição dos contatos intermoleculares.	78
FIGURA 4.16 - Representação das transições eletrônicas possíveis entre os orbitais moleculares quando é incidido radiação eletromagnética na região referente ao UV-vis para compostos orgânicos.	79
FIGURA 4.17 - (A) Orbitais envolvidos no modelo de quatro orbitais de Gouterman, podendo variar a energia dos HOMOs; (B) Diagrama de transição simplificado; (C) Diferença entre os grupos pontuais de bases livres e metaloporfirinas genéricas mostrando plano e rotações C ₂ ; (D) espectros genéricos de bases livres e metaloporfirinas de zinco(II) com as atribuições das bandas Soret e Q.....	81

FIGURA 4.18 - Espectro na região do UV-vis para a H ₂ P (A) e ZnP (B) utilizando diclorometano como solvente em preto e ampliação em rosa.	82
FIGURA 4.19 - Espectros na região do Infravermelho para o precursor P2 em preto, H ₂ T4PyP em vermelho, H ₂ P em azul e ZnP em verde, utilizando CsI como solvente.....	87
FIGURA 4.20 - Distância dos átomos nos periféricos de rutênio verificando a largura (A) e distância transversal (B) aproximada da molécula H ₂ P-SRRR em angstroms.....	90
FIGURA 4.21 - Estudo de agregação do composto H ₂ P em tampão Trizma e DMF (4:1) UV-vis.	93
FIGURA 4.22 - Sobreposição dos espectros na região do UV-vis da titulação espectrofotométrica do complexo H ₂ P (6 µM) variando concentração do ct-DNA a fim de obter a razão molar de 0,1-2,0. O experimento foi realizado em tampão Trizma e DMF (4:1).	95
FIGURA 4.23 - Ensaio de supressão de fluorescência de DNA-Hoechst (DH) fixando a concentração de ct-DNA (100,0 µM) e Hoechst 33342 (5,0 µM), em tampão Trizma:DMF (4:1). A) Espectros de supressão de fluorescência na ausência e presença do composto H ₂ P, variando a concentração entre 0 e 40,0 µM. B) Supressão de fluorescência (F/F ₀) sendo F e F ₀ a intensidade de fluorescência relativa em 450 nm na presença e na ausência dos complexos, respectivamente. Variando a razão molar [PRAP]/[ct-DNA] e [Mim]/[ct-DNA] em 0 - 0,4 e 0 - 1,6, respectivamente. O eixo superior (em vermelho) está relacionado com a variação da razão molar do complexo mimético, exclusivamente.	98
FIGURA 4.24 - Ensaio de supressão de fluorescência de DNA-Laranja de tiazol (DTO) fixando a concentração de ct-DNA (100,0 µM) e Laranja de tiazol (5,0 µM), em tampão Trizma:DMF (4:1). (A) Espectros de supressão de fluorescência na ausência e presença do composto H ₂ P, variando a concentração entre 0 e 40,0 µM. (B) Supressão de fluorescência (F/F ₀) sendo F e F ₀ a intensidade de fluorescência relativa em 530 nm na presença e na ausência dos complexos, respectivamente. Variando a razão molar [PRAP]/[ct-DNA] e [Mim]/[ct-DNA] em 0 - 0,4 e 0 - 1,6, respectivamente. O eixo superior (em vermelho) está relacionado com a variação da razão molar do complexo mimético, exclusivamente.	99
FIGURA 4.25 - Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 com período de incubação de 24 h e 10 % de DMF. Sendo que L1 ou C- é o controle negativo contendo plasmídeo (0,25 µg) e DMF. L2 ou C+ é o controle positivo contendo plasmídeo e cisplatina (5 µM). Para o complexo Mim foram variadas as concentrações, seguindo a ordem: L3 = 0,4; L4 = 4,0; L5 = 40 µM. Para o complexo H ₂ P (L6 = 0,1; L7 = 1,0; L8 = 10 µM) e H ₂ P2 (L9 = 0,1; L10 = 1,0; L11 = 10 µM).	101
FIGURA 4.26 -Verificação da viscosidade relativa do ct-DNA (80 µM) a partir da variação de tempo de escoamento no viscosímetro de Ostwald para os complexos PRAP e laranja de tiazol de 0-0,3 e para o complexo mimético variando a razão molar entre 0-1,2. O eixo superior (em vermelho) está	

relacionado com a variação da razão molar do complexo mimético, exclusivamente.	104
FIGURA 4.27 - Espectros de dicroísmo circular de ct-DNA (80,0 μM) em tampão Trizma:DMF (1:4), na presença complexo mimético nas concentrações de 0, 16, 32, 48, 64, 80, 96 μM obtendo razão molar de 0; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20. (A) com período de incubação de 10 minutos temperatura ambiente; (B) incubação durante 24 h, a 37 °C.	106
FIGURA 4.28 - Espectros de dicroísmo circular de ct-DNA (80,0 μM) em tampão Trizma:DMF (1:4), na presença complexo ZnP2 nas concentrações de 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 μM obtendo razão molar de 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30. (A) com período de incubação de 10 minutos temperatura ambiente; (B) incubação durante 24 h, a 37 °C.	107
FIGURA 4.29 - Estrutura química da purina (A), da guanina (B), da guanosina (C) e guanosina 5'-monofosfato (5'-GMP) (D).	109
FIGURA 4.30 - Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN da interação do composto H_2P e guanosina na proporção 5:1, no período de 0-48 h utilizando acetona- d_6 e DMSO- d_6 (9:1).	110
FIGURA 4.31 - Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN da interação do composto H_2P_2 e guanosina na proporção 5:1, no período de 0-48 h utilizando acetona- d_6 e DMSO- d_6 (9:1).	111
FIGURA 4.32- Medidas da dispersão do tamanho de partículas por DLS de ct-DNA (80,0 μM ; azul), do complexo ZnP2 (20,0 μM ; verde) e da interação ct-DNA:ZnP2 (80:20 μM ; laranja).	113
FIGURA 4.33 - Aspecto visual das soluções de ZnP2 em diferentes concentrações (4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 μM) na ausência e presença de ct-DNA (80,0 μM) em tampão Trizma e 20% DMF, incubando por 24 horas a 37 °C.	114
FIGURA 4.34 - Proposta de interação dos compostos PRAP com o DNA. A) representação da simplificação dos compostos PRAP e do DNA. B) Representação do DNA em solução. C) representação do DNA com os compostos PRAP promovendo a formação de adutos. D) esquema reacional dos compostos PRAP com a guanosina, como uma hipótese de ligação covalente.	116
FIGURA 4.35 - Estudo de estabilidade para H_2P por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em acetona/DMSO (9:1).	121
FIGURA 4.36 - Estabilidade do complexo H_2P por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ após 48 h de interação com acetona- d_6 (marrom), acetona- d_6 /DMSO (9:1) (azul), acetona- d_6 /DMEM/DMSO (85:10:5) - 48 h (verde). Com as marcações das espécies químicas presentes em cada condição.	122
FIGURA 4.37 - Espectros de emissão dos compostos H_2P (A), e ZnP (B), utilizando diclorometano como solvente e comprimento de excitação nas respectivas bandas Soret.	125
FIGURA 4.38 - Exemplo de fotodegradação de porfirina com oxigênio singlete.	126
FIGURA 4.39 - Estudo de fotoestabilidade dos compostos H_2P (A) e ZnP (C) com tempo de exposição de 15 minutos, com suas respectivas curvas monitoradas na	

banda Soret dos compostos H ₂ P (B) e ZnP (D), usando diclorometano como solvente.....	127
FIGURA 4.40 - Esquema ilustrativo da reação da resazurina, na mitocôndria de células viáveis, para a formação da resorufina.....	128
FIGURA 4.41 - Ensaio morfológico para a linhagem A2780 marcado com o corante PI (300 nM) para verificação de morte celular do controle (sem o composto H ₂ P) e após o tratamento com o composto H ₂ P nas concentrações do IC ₅₀ = 0,06 µM; ½ × IC ₅₀ = 0,03 µM; ¼ × IC ₅₀ = 0,015 µM e irradiação (λ _{irrad} = 415 nm, 30 mW cm ⁻² , 9 J cm ⁻²). As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação, em campo claro, fluorescência e suas respectivas sobreposições, utilizando o equipamento CELENA® S.	134
FIGURA 4.42 - Ensaio morfológico para a linhagem A2780 marcado com os corantes DAPI (para a marcação de núcleo) e <i>CellMask Green Plasma Membrane</i> (para a marcação da membrana celular) do controle (sem o composto H ₂ P) e após o tratamento com o composto H ₂ P nas concentrações do IC ₅₀ = 0,06 µM; ½ × IC ₅₀ = 0,03 µM; ¼ × IC ₅₀ = 0,015 µM e irradiação (λ _{irrad} = 415 nm, 30 mW cm ⁻² , 9 J cm ⁻²). As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação, em campo claro, fluorescência e suas respectivas sobreposições, utilizando o equipamento CELENA® S.	135
FIGURA 4.43 - Ampliação do ensaio morfológico para a linhagem A2780 marcado com o corante DAPI (para a marcação de núcleo) do controle (sem o composto H ₂ P) e após o tratamento com o composto H ₂ P na concentração do IC ₅₀ = 0,06 µM e irradiação (λ _{irrad} = 415 nm, 30 mW cm ⁻² , 9 J cm ⁻²). As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação utilizando o equipamento CELENA® S.	136
FIGURA 4.44 - Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 irradiado durante 10 minutos usando irradiação (λ _{irrad} = 415 nm, 60 mW cm ⁻² , 18 J cm ⁻²) e 10 % de DMF. Sendo que L1 ou C- é o controle negativo contendo plasmídeo (0,25 µg) e DMF. Para o complexo Mim foram variadas as concentrações, seguindo a ordem: L2 = 0,4; L3 = 2,0; L4 = 4,0 µM. Para o complexo H ₂ P (L6 = 0,1; L7 = 0,5; L8 = 1,0 µM) e H ₂ P2 (L9 = 0,1; L10 = 0,5; L11 = 1,0 µM). Sem irradiação ou no escuro tem L12 ou C- é o controle negativo (plasmídeo e DMF), L13 = complexo mimético (4,0 µM), L14 = H ₂ P (1,0 µM) e L15 = H ₂ P2 (1,0 µM).	138
FIGURA 4.45 - Estruturas químicas derivadas DCFH-DA envolvidas no processo de detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs).	140
FIGURA 4.46 - Ensaio de espécies reativas de oxigênio após o tratamento com o composto H ₂ P na concentração do IC ₅₀ = 0,06 µM, controle negativo (DMSO) e controle positivo (H ₂ O ₂), seguido de irradiação (λ _{irrad} = 415 nm, 30 mW cm ⁻² , 9 J cm ⁻²). A) Intensidade de fluorescência relativa utilizando o fluorímetro Synergy/H1-Biotek B) As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação utilizando o equipamento CELENA® S.	141
FIGURA 4.47 - Representação de um gráfico de eventos obtido por citometria de fluxo destacando os quadrantes: I – células vivas (anexina-V-/7-AAD-); II –	

apoptose recente (anexina-V+/7-AAD-); III – apoptose tardia (anexina-V+/7-AAD+); IV – necrose (anexina-V-/7-AAD+).	143
FIGURA 4.48 - Gráfico de eventos obtido por citometria de fluxo do controle (sem o composto H ₂ P) e após o tratamento com o composto H ₂ P nas concentrações do $2 \times IC_{50} = 0,12 \mu M$; $IC_{50} = 0,06 \mu M$; $\frac{1}{2} \times IC_{50} = 0,03 \mu M$; $\frac{1}{4} \times IC_{50} = 0,015 \mu M$ e irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). Gráfico em barras do total de células em apoptose. Células vivas (anexina-V-/7-AAD-); apoptose recente (anexina-V+/7-AAD-); apoptose tardia (anexina-V+/7-AAD+); necrose (anexina-V-/7-AAD+). Nível de significância **** $p < 0,0001$	144
FIGURA 4.49 - Composição do esferoide e gradientes de concentração de CO ₂ /excretas e O ₂ /nutrientes na zona de proliferação (ZP, camada externa), zona quiescente ou de hipoxia (ZQ, camada intermediária) e zona necrótica (ZN, camada interna). Adaptado de Brajša ¹⁶⁷	146
FIGURA 4.50 - A) Ensaio morfológico na linhagem A2780, sem e com o tratamento do composto H ₂ P nas concentrações do $IC_{50} = 0,06 \mu M$; $2 \times IC_{50} = 0,12 \mu M$; $10 \times IC_{50} = 0,60 \mu M$; $20 \times IC_{50} = 1,2 \mu M$; $40 \times IC_{50} = 2,4 \mu M$ seguido de irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) em cultura 3D pelo processo de levitação magnética. O experimento foi acompanhado de 0 a 8 dias, em intervalos de 2 dias. B) Relação do diâmetro dos esferoides à variação de tempo. As imagens foram obtidas com o microscópio CELENA [®] S com zoom de 4x.	148
FIGURA 4.51 - Ensaio morfológico na linhagem A2780 marcado com PI e DAPI, sem e com o tratamento do composto H ₂ P nas concentrações do $IC_{50} = 0,06 \mu M$; $2 \times IC_{50} = 0,12 \mu M$; $10 \times IC_{50} = 0,60 \mu M$; $20 \times IC_{50} = 1,2 \mu M$; $40 \times IC_{50} = 2,4 \mu M$ seguido de irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) em cultura 3D pelo processo de levitação magnética, após 8 dias. As imagens foram obtidas com o microscópio de fluorescência CELENA [®] S com zoom de 4x.	149

ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES**H₂P**Massa molecular: 3330,07 g mol⁻¹**H₂P₂**Massa molecular: 3330,07 g mol⁻¹**ZnP**Massa molecular: 3395,06 g mol⁻¹**ZnP₂**Massa molecular: 3395,06 g mol⁻¹**Mim**Massa molecular: 757,10 g mol⁻¹

RESUMO

INTERAÇÃO COM O DNA E FOTOTOXICIDADE DE PORFIRINAS TETRACATIÔNICAS DE RUTÊNIO, ARENO E FOSFINA EM CÉLULAS TUMORAIS DE OVÁRIO. Neste trabalho, foram sintetizadas porfirinas derivadas da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina e *meso*-tetra(3-piridil)porfirina, além de suas respectivas metaloporfirinas de zinco(II), coordenadas a quatro complexos periféricos de rutênio(II) contendo *p*-cimenol e trifenilfosfina, formando uma nova classe de compostos, chamada PRAP, e um composto mimético (Mim). Esses compostos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, espectrometria de massas, análise elementar e condutividade molar, além de cálculos de otimização estrutural por DFT. Foram realizadas interações com o ct-DNA e plasmídeo pUC19 e estudo de interação com a guanosina. Os resultados sugerem um mecanismo de interação que envolve, inicialmente, um efeito de formação de adutos, seguido de uma possível ligação covalente. Os ensaios celulares mostraram que os compostos não apresentam citotoxicidade para a linhagem MRC-5 (não-tumoral de pulmão) em concentrações abaixo de 50 μ M. Por outro lado, na linhagem A2780 (tumoral de ovário), as porfirinas tetracatiônicas apresentaram alta fototoxicidade após irradiação, com IC_{50} de aproximadamente 0,07 μ M para as porfirinas livres e 0,30 μ M para as metaloporfirinas de zinco(II). O composto H₂P destacou-se pelo maior índice de fototoxicidade. Os ensaios morfológicos confirmaram a morte celular por apoptose e danos ao núcleo, corroborando os dados de fotoclivagem do plasmídeo pUC19. Por fim, verificou-se que o tratamento fotodinâmico, pode afetar a zona de proliferação celular em esferoides tumorais. Esses experimentos demonstram que o sistema avaliado apresenta potencial promissor para interagir com o DNA e atuar como fotossensibilizante.

Palavras-chave: Fototoxicidade. Interação com DNA. Porphirina. Complexo de rutênio(II).

ABSTRACT

DNA INTERACTION AND PHOTOTOXICITY OF TETRACATIONIC PORPHYRINS OF RUTHENIUM, ARENE AND PHOSPHINE IN OVARIAN TUMOR CELLS. In this work, porphyrins derived from *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin and *meso*-tetra(3-pyridyl)porphyrin were synthesized, along with their respective zinc(II) metalloporphyrin, coordinated to four peripheral ruthenium(II) complexes containing *p*-cymene and triphenylphosphine, forming a new class of compounds, called PRAP, and a mimetic compound (Mim). These compounds were characterized by spectroscopic techniques, mass spectrometry, elemental analysis and molar conductivity, as well as structural optimization calculations by DFT. Plasmid pUC19 and ct-DNA interactions were carried out, as well as an interaction with guanosine. The results suggest an interaction mechanism that initially involves an aggregation effect, followed by a possible covalent bond. Cellular assays showed that the compounds were not cytotoxic to the MRC-5 (non-tumor lung cancer) strain at concentrations below 50 μM . On the other hand, in the A2780 lineage (ovarian tumor), the tetra-cationic porphyrin showed high phototoxicity after irradiation, with an IC_{50} of approximately 0.07 μM for the free porphyrins and 0.30 μM for the zinc(II) metalloporphyrin. The H_2P compound stood out for having the highest phototoxicity index. The morphological tests confirmed cell death by apoptosis and damage to the nucleus, corroborating the photobleaching data from the pUC19 plasmid. Finally, it was found that photodynamic treatment can affect the cell proliferation zone in tumor spheroids. These experiments show that the system evaluated has promising potential for interacting with DNA and acting as a photosensitizer.

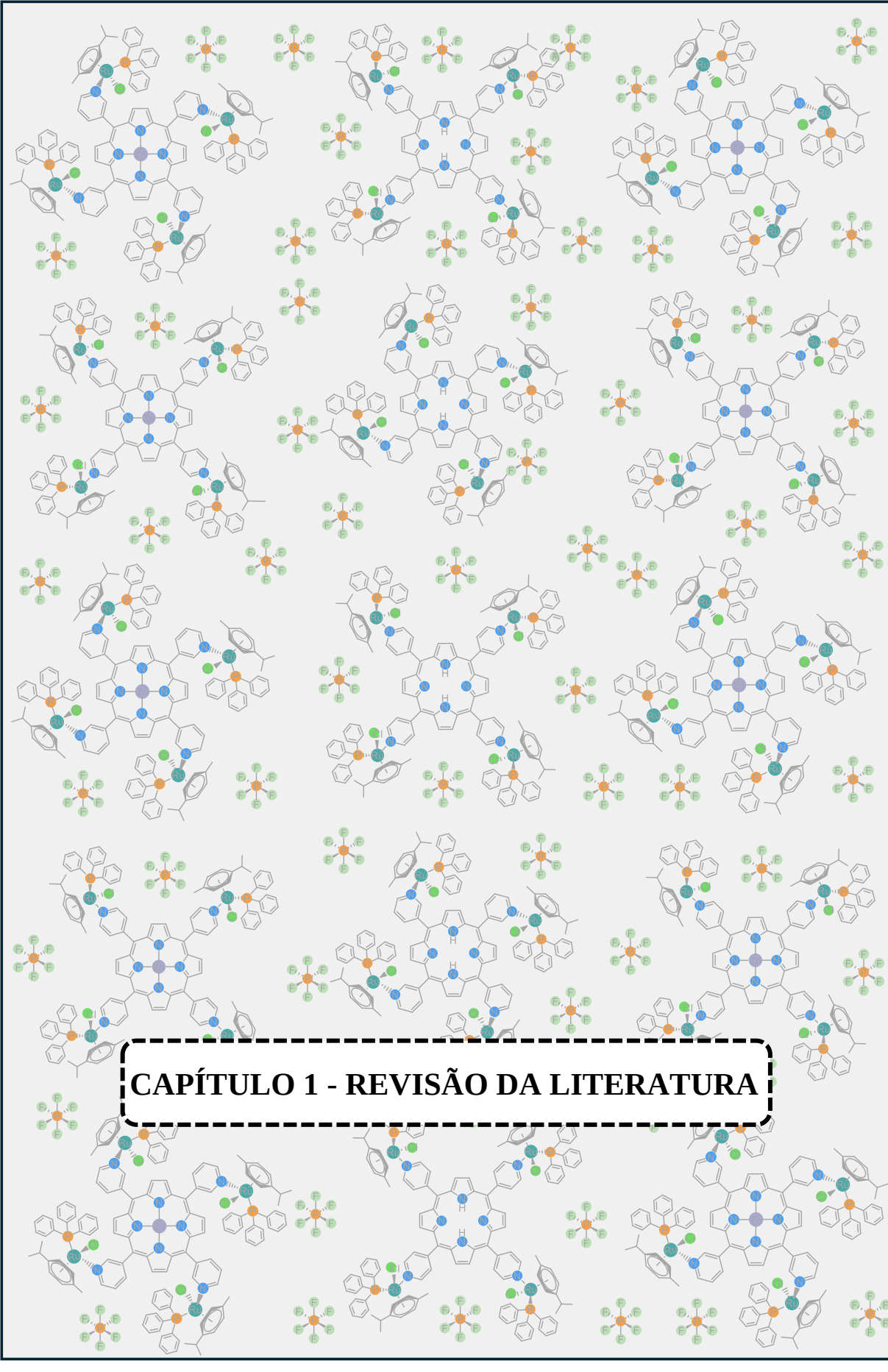
Keywords: Phototoxicity. DNA Interaction. Porphyrin. Ruthenium(II) complex.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 – Câncer: conceito, causas e estatísticas	2
1.2 – Quimioterapia e os fármacos a base de platina	4
1.3 – Compostos de rutênio no tratamento do câncer	6
1.4 – Terapia Fotodinâmica e Inativação Fotodinâmica	9
1.5 – Compostos tetrapirrólicos: generalidades e ocorrência natural ³⁹	12
1.6 – Algumas aplicações biológicas de porfirinas sintéticas	17
1.6.1 – Fotossensibilizante	17
1.6.2 – Interação com DNA	21
1.7 – Planejamento estrutural	24
CAPÍTULO 2 - OBJETIVO.....	31
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1 – Materiais.....	34
3.1.1 – Solventes	34
3.1.2 – Reagentes diversos	34
3.2 – Sínteses.....	34
3.2.1 – Síntese dos precursores de rutênio	35
3.2.1.1 – Síntese do complexo $\{[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})]_2(\mu\text{-Cl})_2\}$ (P1).....	35
3.2.1.2 – Síntese do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$ (P2)	35
3.2.2 – Síntese de <i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirina ($\text{H}_2\text{T3PyP}$)	35
3.2.3 – Síntese dos complexos tetracatiônicos.....	36
3.2.3.1 – Síntese de <i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)]$ - (H_2P).....	36
3.2.3.2 – Síntese de <i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirina com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)]$ - ($\text{H}_2\text{P2}$).....	37
3.2.3.3 – Síntese de <i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirinato de zinco(II) com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)]$ - (ZnP)	37
3.2.3.4 – Síntese de <i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirinato de zinco(II) com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)]$ - (ZnP2)	37
3.2.3.5 – Síntese de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{py})\text{Cl}(\text{PPh}_3)]$ - (Mim).....	37
3.3 – Métodos instrumentais e procedimentos.....	38
3.3.1 – Análise elementar	38

3.3.2 – Medidas de condutividade molar	38
3.3.3 – Espectrometria de massas	38
3.3.4 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	39
3.3.5 – Espectroscopia na Região do UV-visível.....	40
3.3.6 – Espectroscopia na região do Infravermelho.....	40
3.3.7 – Espectroscopia de fluorescência e rendimento quântico de emissão	40
3.3.8 – Difração de raios-X	41
3.4 – Estudo teórico.....	42
3.5 – Ensaio físico-químicos.....	42
3.5.1 – Ensaio de estabilidade por ressonância magnética nuclear em solventes e meio de cultura	42
3.5.2 – Estudo de agregação.....	43
3.5.3 – Coeficiente de partição.....	43
3.5.4 – Estudo de fotoestabilidade	44
3.6 – Ensaio biomoleculares.....	45
3.6.1 – Interação com DNA	45
3.6.1.1 – Interação com ct-DNA por titulação espectrofotométrica.....	45
3.6.1.2 – Ensaio de supressão de fluorescência do complexo ct-DNA - Hoechst 33342 ou laranja de tiazol	47
3.6.1.3 – Medidas de viscosidade relativa	48
3.6.1.4 – Mobilidade eletroforética em gel de agarose com plasmídeo pUC19	49
3.6.1.5 – Interação com ct-DNA por dicroísmo circular	50
3.6.1.6 – Interação com guanosina.....	50
3.7 – Ensaio celulares	51
3.7.1 – Cultivo celular.....	51
3.7.2 – Ensaio de viabilidade celular	51
3.7.3 – Ensaio de espécies reativas de oxigênio utilizando DCFH-DA	52
3.7.4 – Ensaio de morfologia celular	53
3.7.5 – Ensaio de morfologia celular em cultura 3D	54
3.7.6 – Ensaio de morte celular por citometria utilizando Anexina V e 7-AAD	54
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 – Síntese, caracterização e estudo estrutural teórico.....	59

4.1.1 – Síntese	60
4.1.2 – Caracterizações não espectroscópicas.....	63
4.1.3 – Espectrometria de massas	64
4.1.4 – Ressonância magnética nuclear.....	66
4.1.5 – Difração de raios-X complexo mimético	75
4.1.6 – Espectroscopia eletrônica.....	78
4.1.7 – Espectroscopia na região do infravermelho	85
4.1.8 – Estudo estrutural teórico	87
4.2 – Investigação do modo de interação com DNA	91
4.2.1 – Estudo de agregação.....	92
4.2.2 – Titulação espectrofotométrica.....	94
4.2.3 – Supressão de fluorescência do ct-DNA/Hoechst 33342 e ct-DNA/laranja de tiazol.....	96
4.2.4 – Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 em gel de agarose	100
4.2.5 – Viscosidade Relativa	102
4.2.6 – Interação com ct-DNA por dicroísmo circular	104
4.2.7 – Interação com guanosina.....	108
4.2.8 – Interação por DLS e discussão geral da interação com o DNA....	112
4.3 – Estudos fotoquímicos e celulares com ênfase.....	119
em fotoativação	119
4.3.1 – Estabilidade por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	120
4.3.2 – Coeficiente de partição.....	123
4.3.3 – Estudos fotoquímicos	124
4.3.4 – Estudo de fotoestabilidade	126
4.3.5 – Viabilidade celular	128
4.3.6 – Ensaio de morfologia celular	133
4.3.7 – Ensaio de fotoclivagem do plasmídeo pUC19.....	136
4.3.8 – Ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs)	139
4.3.9 – Ensaio de morte celular por citometria de fluxo	141
4.3.10 – Análise morfológica em cultura celular 3D	145
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	151



CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – Câncer: conceito, causas e estatísticas

O câncer compreende um conjunto de doenças caracterizadas por alterações genéticas ou epigenéticas em células somáticas, levando a um crescimento descontrolado de células que perdem a função específica do tecido original e adquirem potencial invasivo¹. A proliferação dessas células pode resultar na formação de neoplasias, que são nutridas por meio de novos vasos sanguíneos em um processo denominado angiogênese². Por essa via, as células tumorais podem se disseminar a partir do tumor primário para outros tecidos e órgãos, estabelecendo-se em diferentes partes do corpo, processo conhecido como metástase³.

O desenvolvimento de câncer em diferentes partes do corpo pode ser influenciado por diversos fatores. Entre as principais causas estão o consumo de tabaco, uso excessivo de álcool, exposição a substâncias químicas nocivas, poluentes e radiação ionizante¹. Outros fatores de risco incluem dieta inadequada, obesidade e predisposição genética, os quais também estão associados ao aumento da incidência de câncer. Essas causas, combinadas ou isoladas, desempenham um papel significativo nas taxas de mortalidade relacionadas à doença.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que em 2022 foram diagnosticados aproximadamente 20 milhões de novos casos de câncer no mundo, enquanto cerca de 9,7 milhões de mortes foram atribuídas à doença no mesmo ano⁴. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) projeta a ocorrência de cerca de 705 mil novos casos para o triênio 2023-2025⁵. Essas estatísticas colocam o câncer como o segundo grupo de doenças mais letais globalmente, atrás apenas das doenças cardiovasculares⁶.

Devido à sua alta incidência e mortalidade, o câncer possui diversos tipos de tratamento, incluindo terapia hormonal, imunoterapia, transplante de medula óssea, terapia-alvo, cirurgia, radioterapia e quimioterapia, entre outros^{7,8}. Os últimos tratamentos citados são classificados como terapias convencionais, e,

dependendo do perfil do paciente, essas abordagens são frequentemente combinadas para aumentar a eficácia terapêutica⁷.

De acordo com as estimativas do INCA para o triênio 2023-2025 no Brasil, os três tipos de câncer mais incidentes entre os homens deverão ser: câncer de próstata (71,7 mil casos), câncer de cólon e reto (22,0 mil casos) e câncer de traqueia, brônquio e pulmão (18,0 mil casos). Para as mulheres, os tipos mais frequentes serão: câncer de mama (73,6 mil casos), câncer de cólon e reto (23,7 mil casos) e câncer de colo do útero (17,0 mil casos), conforme a FIGURA 1.1.

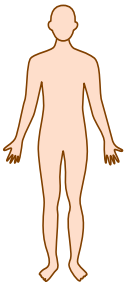
Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Colón e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

FIGURA 1.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para o triênio de 2023-2025 por sexo, exceto pele não melanoma.

O câncer de ovário, uma neoplasia de alta relevância clínica, é o terceiro tipo de câncer mais letal entre as mulheres, ficando atrás apenas dos cânceres de mama e colo do útero⁹. O tratamento dessa neoplasia geralmente envolve uma abordagem combinada, na qual a cirurgia seguida de quimioterapia representa uma das principais estratégias terapêuticas⁹. A cisplatina é um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento de cânceres nesse tecido. Embora essa terapia seja eficaz em aproximadamente 80% dos casos, muitas pacientes desenvolvem resistência à droga¹⁰.

1.2 – Quimioterapia e os fármacos a base de platina

A quimioterapia refere-se à administração de compostos químicos com propriedades citotóxicas, capazes de destruir células tumorais¹¹. Em alguns casos, pode levar à erradicação do tumor, ou, ao menos, reduzir os sintomas associados à neoplasia e potencialmente prolongar a vida do paciente¹¹. Embora o uso de compostos químicos no tratamento do câncer remonta a séculos atrás, o primeiro documento formal sobre o tema data da década de 1940.

A quimioterapia pode ser aplicada em diversas fases do tratamento oncológico, como na redução do volume tumoral (terapia de indução) ou no tratamento adjuvante, cujo objetivo é eliminar células residuais que possam permanecer no organismo após o tratamento principal, como a cirurgia ou a radioterapia^{11,12}. Dessa forma, a quimioterapia desempenha um papel crucial no manejo de cânceres metastáticos^{11,12}.

Os quimioterápicos podem ser classificados em duas categorias principais: derivados de produtos naturais e compostos de origem sintética. Com base no seu mecanismo de ação, esses fármacos são subdivididos em diferentes classes, como antimetabólitos, inibidores da topoisomerase e agentes alquilantes⁸. A última classe inclui compostos que interagem com o DNA, especialmente com as bases de guanina⁸. Além disso, essa categoria abrange diversos fármacos, incluindo os compostos de platina⁸.

Desde a descoberta da cisplatina como agente anticancerígeno pelo Dr. Barnett Rosenberg em 1969, numerosos compostos à base de platina foram investigados e são amplamente utilizados para esse propósito¹³. Entre os fármacos à base de platina aprovados destacam-se cisplatina, carboplatina, nedaplatina, lobaplatina, oxaliplatina e hepatoplatina, FIGURA 1.2(A)¹⁴. Embora esses compostos interajam com diversos alvos celulares, o DNA é o um dos possíveis alvo biológico responsável por suas propriedades antitumorais¹⁵, como exemplificado pela cisplatina, FIGURA 1.2(B).

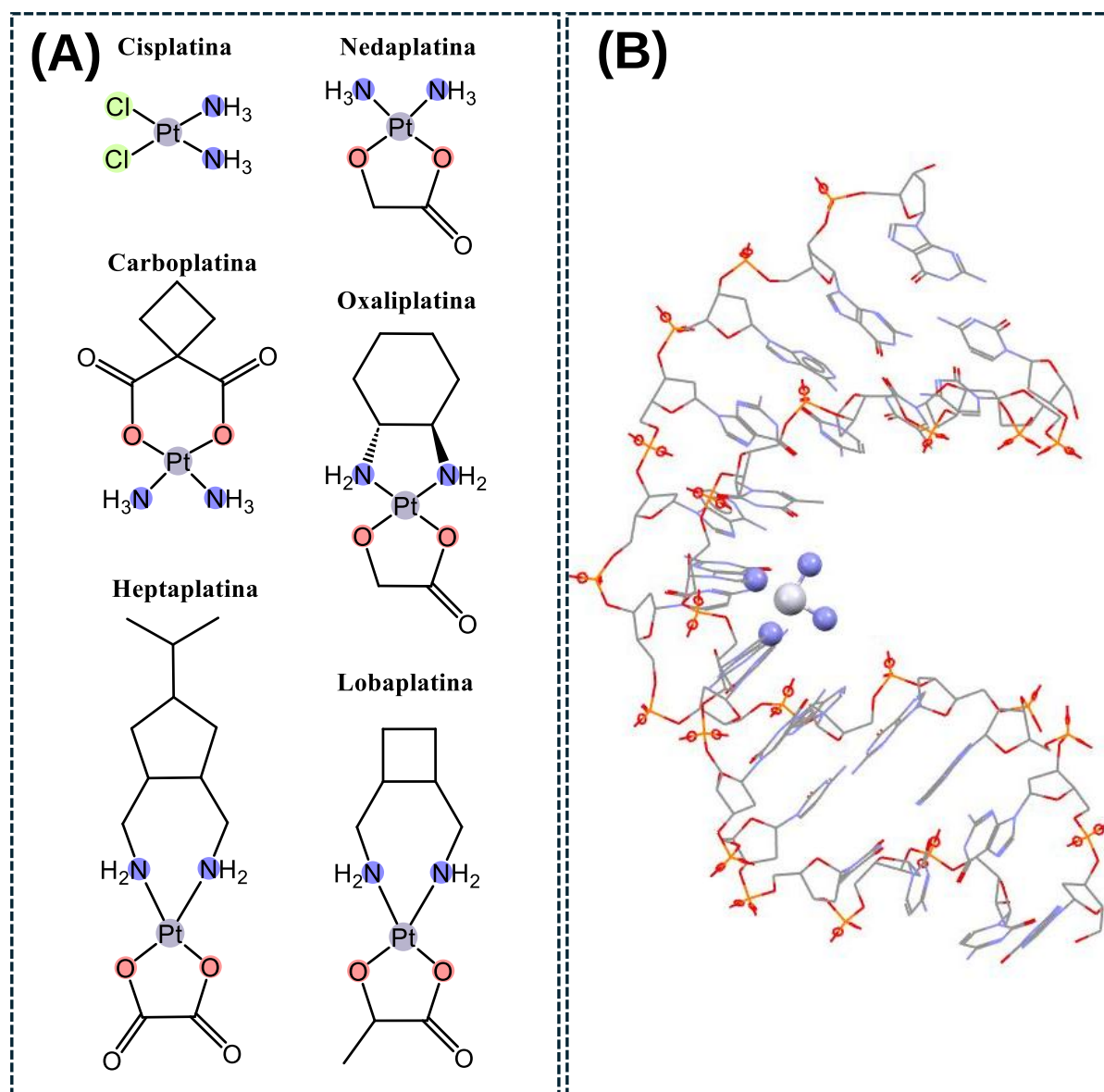


FIGURA 1.2 - (A) Compostos de platina utilizados como quimioterápicos no mundo. (B) Estrutura cristalina de DNA estabelecendo ligação com a cisplatina em destaque. PDB: 1A84.

Embora os compostos de platina sejam amplamente utilizados no tratamento do câncer, eles estão associados a graves efeitos adversos, como nefrotoxicidade, ototoxicidade e neurotoxicidade¹⁶⁻¹⁸. Além disso, podem causar danos a tecidos normais, e os pacientes submetidos a esses tratamentos frequentemente desenvolvem resistência a esses quimioterápicos^{16,18,19}. Devido a esses efeitos, outros compostos com diferentes centros metálicos estão sendo investigados para minimizar essas limitações.

1.3 – Compostos de rutênio no tratamento do câncer

O desenvolvimento de compostos com diferentes centros metálicos busca não apenas reduzir os efeitos colaterais associados à toxicidade dos quimioterápicos existentes, mas também ampliar o espectro de ação da quimioterapia. Nesse sentido, compostos de rutênio têm se mostrado bons candidatos para aplicação em quimioterapia²⁰⁻²⁴.

Os compostos de rutênio possuem diversas propriedades químicas que permitem uma ampla variedade de estruturas, especialmente quando comparados aos compostos de platina(II). O rutênio pode existir nos estados de oxidação II, III e IV em condições fisiológicas²⁴. Seus complexos apresentam geometria octaédrica, possibilitando maior diversidade de ligantes, os quais podem conferir diferentes propriedades²⁴.

Embora os complexos de rutênio sejam amplamente investigados quanto à interação com diversos alvos, como RNA, transferrina, albumina e citocromo c, em muitos casos a citotoxicidade dos complexos de rutênio(II) e rutênio(III) está associada à sua capacidade de interagir com o DNA²⁴. Assim, compostos de rutênio que chegam a fases de estudos pré-clínicos e/ou clínicos frequentemente apresentam essa interação com vários alvos, entre eles, o DNA. Entre os principais complexos de rutênio que alcançaram esses estágios de estudo estão NAMI-A, KP-1019, NKP-1339 (também chamado de BOLD-100) e KP-418²². Esses compostos são complexos de rutênio(III) com ligantes imidazol e indazol, contendo quatro ligantes cloreto que proporcionam complexos aniônicos, FIGURA 1.3(A).

É importante destacar que o composto BOLD-100 é atualmente o único complexo de rutênio(III) em fase de testes como agente quimioterápico, FIGURA 1.3(B)²⁵. Esse composto exibe atividade redox, o que induz estresse oxidativo nas células tumorais, resultando em sucessivas paradas no ciclo celular, bloqueio da síntese de DNA e indução de apoptose²⁴.

Outros compostos de rutênio(II) com potencial para o tratamento do câncer, são os compostos organometálicos de rutênio com estrutura “semi-sanduíche” (*half-sandwich*)^{22,24}. Esses compostos, também conhecidos como 'banco de piano', possuem a fórmula geral $[(\eta^{6,5}\text{-arene})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y/Z})]$ ²⁴. A geometria dos complexos “semi-sanduíche” de rutênio é altamente versátil, permitindo modificações nos ligantes e, conseqüentemente, em suas propriedades biológicas²⁴. Uma das classes mais estudadas é a dos compostos RAPTA, que são complexos de rutênio(II) “semi-sanduíche”, em que o rutênio está coordenado a um areno, dois cloretos e à fosfina PTA (1,3,5-triazo-7-fosfadamatano), com fórmula básica $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-arene})\text{PTA}]$ ²¹. Dentro dessa classe, o RAPTA-C, que contém o ligante *p*-cimeno como areno, FIGURA 1.3(B), é um dos compostos mais conhecidos e está na fase de testes clínicos²⁶. Este complexo pode atuar em vários alvos, causando danos ao DNA de maneira pH-dependente, e apresenta atividade na enzima Catepsina B, associada ao processo de angiogênese²². Logo, o complexo RAPTA-C pode ser indicado no tratamento de cânceres metastáticos.

É relevante destacar que compostos análogos ao RAPTA-C, derivados de rutênio(II) e areno, como RM145 e RAED-C, encontram-se em fase de testes pré-clínicos²⁶, FIGURA 1.3(B). O composto RM145 apresenta um mecanismo de ação semelhante ao da cisplatina, ligando-se à guanina do DNA. No entanto, ele não demonstra resistência cruzada em células de câncer de ovário resistentes à cisplatina (A2780cis)²⁶. Por sua vez, o composto RAED-C, que contém *p*-cimeno, apresenta maior seletividade para tumores primários em comparação ao RAPTA-C. Esses resultados evidenciam o potencial dos compostos de rutênio(II) e areno como agentes quimioterápicos promissores para o tratamento do câncer.

Outro composto promissor no tratamento do câncer é o TLD-1433, um complexo de rutênio(II) que contém dois ligantes 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina e uma fenantrolina estendida, composta por três unidades de tiofeno em sequência, FIGURA 1.3(C). Esse composto está na fase 2 dos testes clínicos para

o tratamento de câncer de bexiga. Diferente de outros quimioterápicos, o TLD-1433 atua como fotossensibilizante na terapia fotodinâmica²¹, uma modalidade de tratamento que é ativada por luz e será discutida na subseção 1.4.

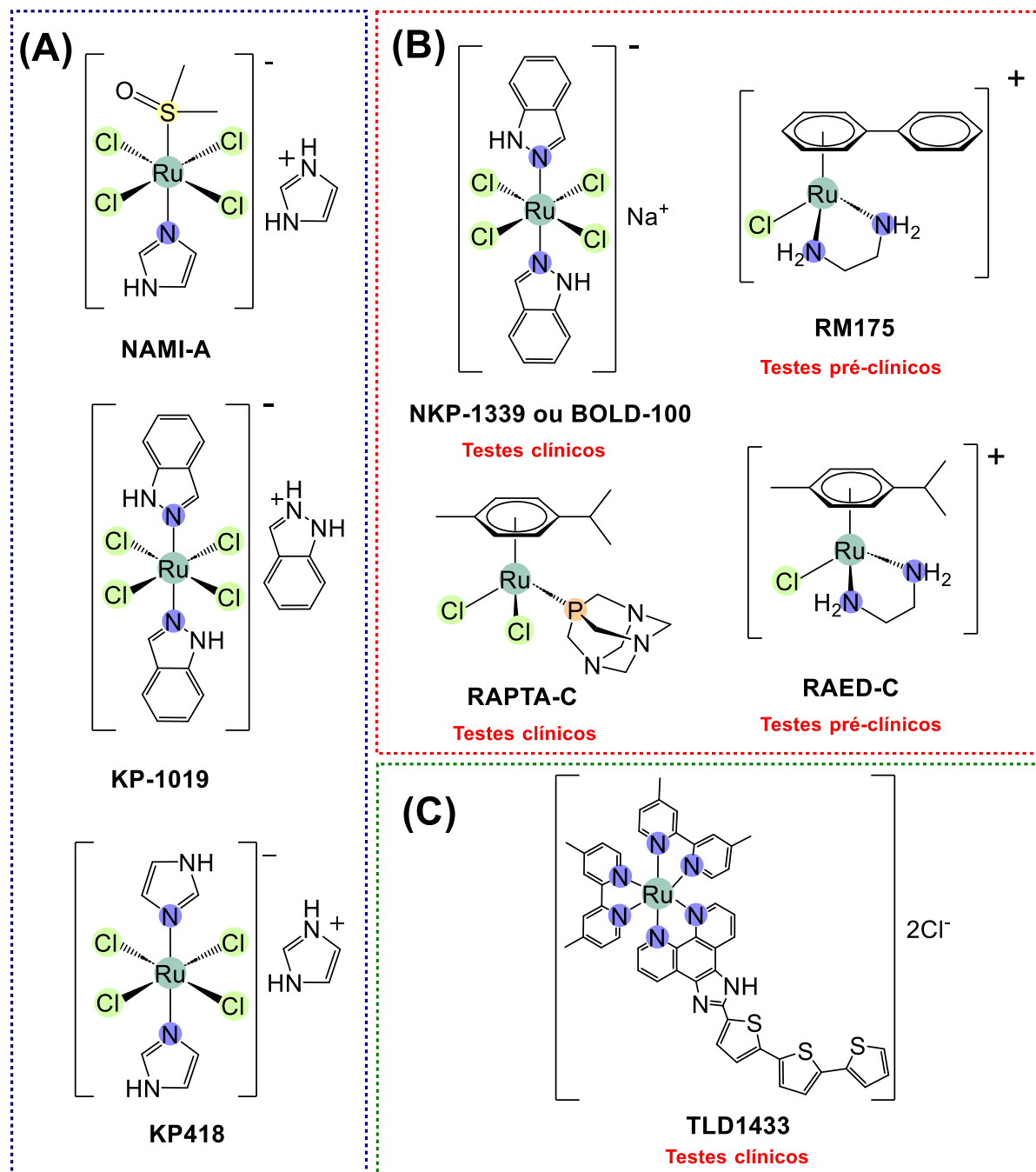


FIGURA 1.3 - (A) Compostos de rutênio que foram utilizados em testes clínicos. (B) Complexos que estão em testes clínicos ou pré-clínicos como quimioterápico atualmente. (D) Composto de rutênio, fotossensibilizante, na fase II dos testes clínicos para o tratamento de câncer de bexiga.

1.4 – Terapia Fotodinâmica e Inativação Fotodinâmica

O uso terapêutico da luz remonta a milhares de anos, com registros de sua aplicação no antigo Egito, Índia e China para o tratamento de doenças de pele, como psoríase, vitiligo e até câncer, além de condições como psicose e raquitismo^{27,28}. No entanto, a luz solar como método terapêutico passou a ser mais amplamente adotada a partir do século XVIII. Em 1903, Niels Finsen foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por seu estudo pioneiro sobre o uso da luz ultravioleta para tratar tuberculose cutânea²⁷.

Posteriormente, novas descobertas ampliaram o entendimento dos mecanismos fototerapêuticos. Em especial, H. Tappeiner e A. Jodlbauer observaram a necessidade de oxigênio para que ocorressem reações fotoinduzidas, introduzindo o termo “ação fotodinâmica”²⁷. Em 1972, Diamond e colaboradores demonstraram que o crescimento tumoral poderia ser reduzido pela irradiação com luz, sugerindo que a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*), como passou a ser conhecida, poderia ser aplicada no tratamento de cânceres²⁷.

Atualmente, a PDT é considerada um tratamento não convencional contra o câncer, baseada na irradiação de comprimentos de onda específicos que ativam um fotossensibilizante, gerando espécies reativas de oxigênio que promovem a morte celular. Esse tratamento é menos invasivo e apresenta menores efeitos colaterais em comparação aos tratamentos convencionais^{27,29}. Entretanto, a PDT não é indicada para o tratamento de metástases, sendo mais adequada como um tratamento complementar aos métodos convencionais, como a quimioterapia. A terapia fotodinâmica depende de três elementos principais: oxigênio molecular, luz e o fotossensibilizante (PS, do inglês *photosensitizer*)²⁷⁻³⁰.

A PDT pode ser explicada pelo diagrama de Jablonski simplificado, FIGURA 1.4. Nesse processo, o fotossensibilizante é inicialmente excitado de seu estado fundamental singleto (1PS) para o estado excitado singleto ($^1PS^*$), pela absorção de radiação eletromagnética na faixa do visível. Após essa excitação, o

fotossensibilizante pode retornar ao estado fundamental por meio de conversão interna (CI) ou fluorescência, processos de decaimento não radioativo e radioativo, respectivamente. Alternativamente, ele pode sofrer uma conversão entre sistemas (CIS), mudando o spin do elétron e formando o estado excitado tripleto ($^3\text{PS}^*$). No estado tripleto, o fotossensibilizante pode liberar energia por decaimentos fosforescentes (radioativos) ou via conversão intersistemas (não radioativos). Durante esse processo, o $^3\text{PS}^*$ pode transferir energia para moléculas presentes, formando espécies reativas de oxigênio (EROs) que interagem com biomoléculas nas células, levando à morte celular (mecanismo Tipo I). Em outro mecanismo, o $^3\text{PS}^*$ transfere energia diretamente para o oxigênio molecular em estado fundamental ($^3\text{O}_2$), formando oxigênio singlete, que também reage com biomoléculas e induz a morte celular (mecanismo Tipo II)^{29,31,32}.

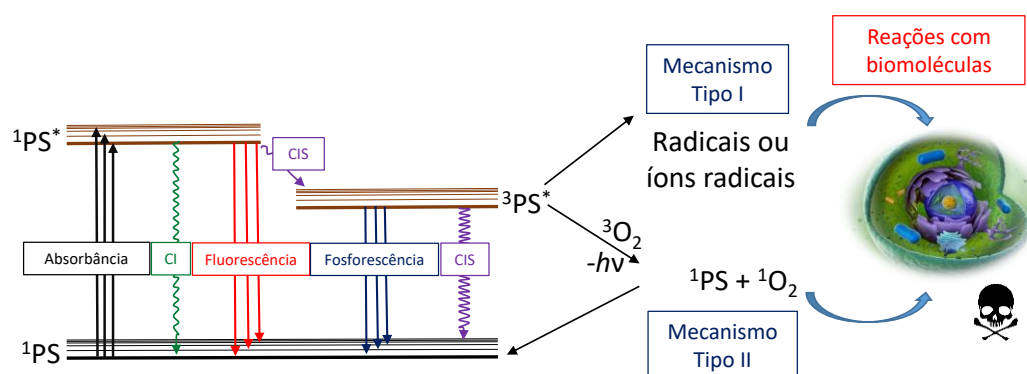


FIGURA 1.4 - Diagrama de Jablonski explicando o funcionamento do mecanismo do tipo I e tipo II para um fotossensibilizante.

Os fotossensibilizantes utilizados na terapia fotodinâmica (PDT) possuem características químicas e físico-químicas específicas. Entre elas, destaca-se a capacidade de emitir fluorescência e fosforescência, o que está associado a sistemas conjugados, especialmente estruturas com anéis aromáticos conjugados que favorecem esses processos. Além disso, esses compostos devem apresentar absorção de energia eficiente no comprimento de onda da radiação utilizada para excitá-los. É desejável que o fotossensibilizante apresente uma alta

absortividade molar na banda de absorção correspondente à radiação aplicada, garantindo uma resposta eficaz durante a irradiação^{30,32,33}.

Na terapia fotodinâmica (PDT), a luz aplicada geralmente possui comprimento de onda entre 600 e 800 nm. Essa faixa, conhecida como “janela terapêutica”, permite maior penetração nos tecidos, pois comprimentos de onda mais curtos não conseguem atravessar camadas mais profundas de forma eficaz, FIGURA 1.5. Esse comportamento é devido a presença de diversos cromóforos que apresentam diferentes coeficientes de absorção ou dispersão que são dependentes do comprimento de onda da luz³⁴. Adicionalmente, a inativação fotodinâmica (PDI) tem explorado comprimentos de onda abaixo da janela terapêutica para a inativação de vírus, parasitas, bactérias, fungos e descontaminação de alimentos, baseando-se no mesmo princípio da PDT. Assim, a PDI é frequentemente considerada uma modalidade de terapia fotodinâmica, mas com irradiação em comprimentos de onda abaixo de 600 nm³⁵⁻³⁷.

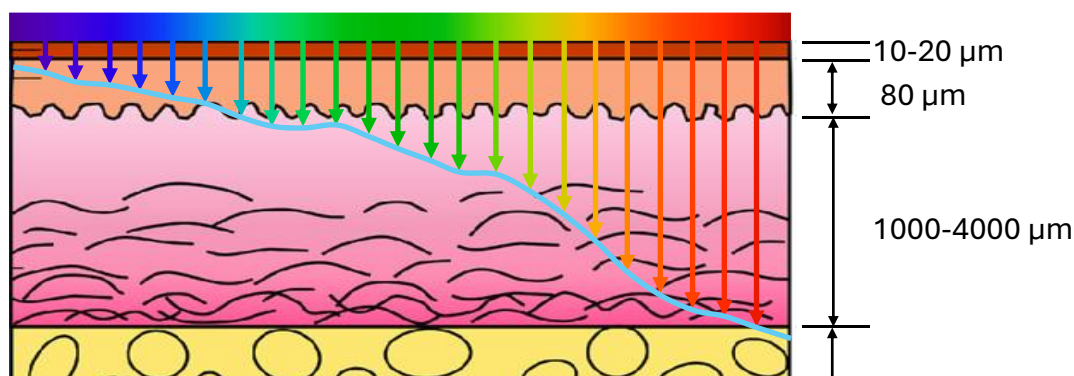


FIGURA 1.5 - Efeito de penetração na pele de luz do espectro eletromagnético na região do visível.

Muitos estudos sobre o tratamento do câncer utilizam o termo PDT, ainda que sejam aplicados comprimentos de onda abaixo de 600 nm, enquanto o termo PDI é raramente empregado. No entanto, esforços têm sido realizados para promover o uso do termo PDI no contexto oncológico. Um exemplo é o estudo de Raschpichler e colaboradores, que explora a PDI como uma alternativa para a

inativação de células tumorais no sistema circulatório, visando a possibilidade de tratamento de cânceres metastáticos³⁸.

Diversos compostos são empregados como fotossensibilizantes em PDT ou PDI; entretanto, os compostos tetrapirrólicos representam uma classe amplamente utilizada para esse propósito. Na subseção 1.5, será discutida essa importante classe de compostos, destacando seu papel em aplicações biológicas.

1.5 – Compostos tetrapirrólicos: generalidades e ocorrência natural³⁹

As porfirinas e seus derivados pertencem a uma classe maior de compostos chamada tetrapirrólicos. Esses compostos desempenham funções essenciais em sistemas biológicos que sustentam a vida na Terra⁴⁰. Além disso, devido às suas propriedades químicas e físico-químicas, os compostos tetrapirrólicos são amplamente estudados para aplicações tecnológicas. Entre esses usos, destacam-se as aplicações em células solares⁴¹, corantes⁴², sensores ópticos⁴³ e eletroquímicos⁴⁴, degradação de poluentes⁴⁵, catálise⁴⁶ e óptica não linear⁴⁷.

Os compostos tetrapirrólicos são classificados como macrociclos altamente conjugados, formados por anéis que têm o pirrol como unidade básica. Quando apresentam uma insaturação no anel pirrólico, são chamados de clorinas. Caso tenham duas insaturações em mais de um anel pirrólico, são designados como bacterioclorinas ou isobacterioclorinas, diferenciando-se pela posição das insaturações, FIGURA 1.6. Por outro lado, a ausência de insaturações nos anéis pirrólicos é característica das porfirinas⁴⁸.

Além dessas diferenças estruturais, essas classes de compostos também variam na quantidade e intensidade das bandas em seus espectros na região do UV-vis⁴⁸. Vale destacar que clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas apresentam bandas em regiões de menor energia desses espectros FIGURA 1.6, o que as torna mais apropriadas para uso como

fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica. Por outro lado, todos esses compostos podem ser utilizados na inativação fotodinâmica.

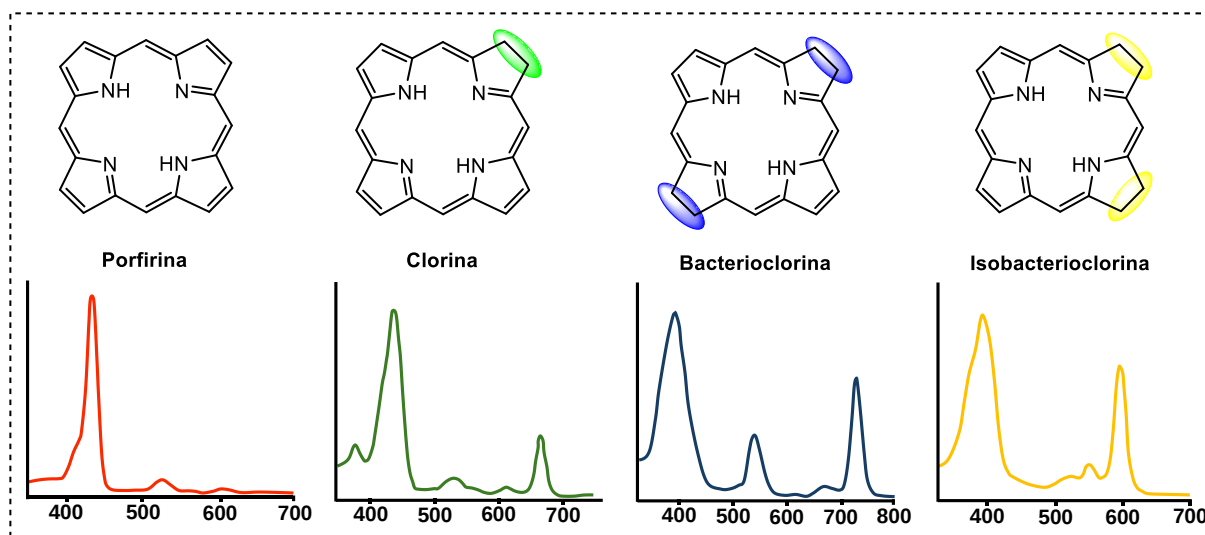


FIGURA 1.6 - Estruturas básicas das porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas e seus respectivos espectros de absorção na região do ultravioleta visível. Adaptado⁴⁸.

Dois sistemas de nomenclatura são amplamente utilizados para esses compostos: o proposto por Hans Fischer e o definido pela IUPAC. A nomenclatura de Fischer é uma forma simplificada, que enumera os carbonos mais externos dos anéis pirrólicos de 1 a 8, referindo-se a eles como posições β . Os carbonos laterais recebem designações pelas letras gregas α , β , γ e δ , conhecidas genericamente como posições *meso*, FIGURA 1.7(A). A nomenclatura IUPAC, por sua vez, atribui uma numeração detalhada aos carbonos e nitrogênios, de 1 a 24, FIGURA 1.7(B). Sendo que as posições *meso* compreende aos carbonos 5, 1, 15, 20 para o esse sistema. Embora a nomenclatura IUPAC seja amplamente adotada devido à sua importância internacional, as designações *meso*, α e β -pirrólicas são frequentemente utilizadas em discussões estruturais sobre esses compostos, especialmente para fins de pesquisa e caracterização.

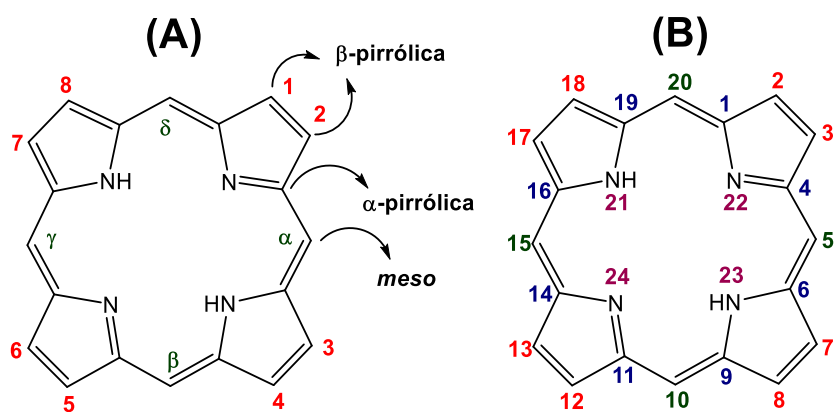


FIGURA 1.7 - Posições e designações dos átomos no macrociclo tetrapirrólico segundo a nomenclatura de Hans Fisher (A) e da IUPAC (B).

As porfirinas, em sua forma de base livre, contêm átomos de hidrogênio nos nitrogênios 21 e 23. Em condições de pH ácido, essas moléculas podem ser protonadas, formando a estrutura diácida, FIGURA 1.8(A). Em ambientes altamente alcalinos, por outro lado, as porfirinas na forma de base livre podem ser desprotonadas, convertendo-se para a forma dibásica, FIGURA 1.8(B). Esses compostos também podem sofrer reações de complexação, levando à formação de metaloporfirinas, FIGURA 1.8(C).

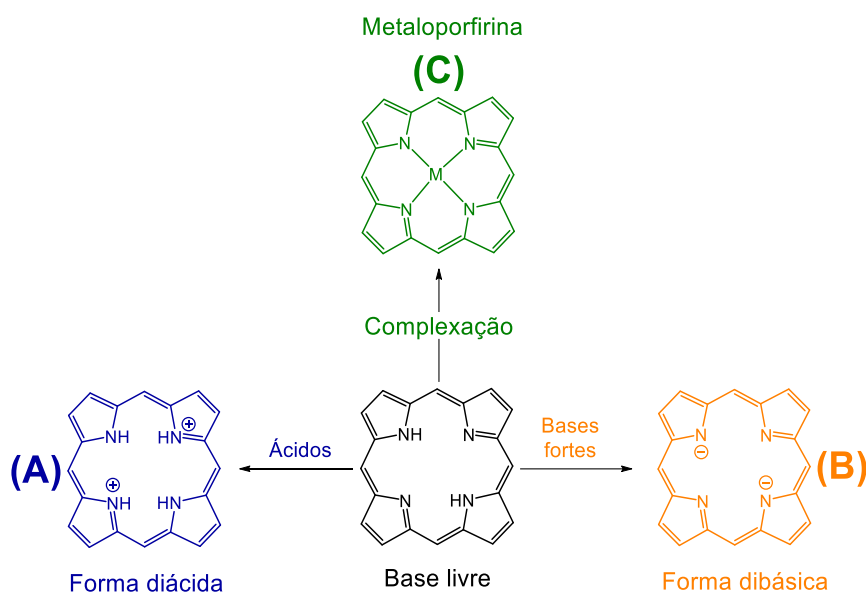


FIGURA 1.8 - Reatividade do anel macrociclo da porfirina na sua forma de base livre quando submetida a condições ácidas (A), básicas (B) e a reação de complexação (C).

Como mencionado anteriormente, os compostos tetrapirrólicos estão envolvidos em diversos processos biológicos, como o transporte de oxigênio nas células de organismos aeróbios. Esse transporte é realizado pelas hemácias, células que contêm a proteína hemoglobina, a qual possui átomos de ferro(II) coordenados ao centro de uma porfirina conhecida como protoporfirina IX, FIGURA 1.9(A). Durante o processo de respiração, moléculas de oxigênio se coordenam na posição axial do ferro, sendo transportadas pelo sangue e armazenadas nos músculos⁴⁰.

Os compostos tetrapirrólicos também desempenham um papel essencial em plantas e bactérias, sendo responsáveis pelo processo de fotossíntese através dos pigmentos clorofila e bacterioclorofila, respectivamente, FIGURA 1.9(B) e 1.9(C). Esses pigmentos contêm um cátion de magnésio(II) coordenado a uma clorina, nas plantas, e a uma bacterioclorina, nas bactérias⁴⁰. Outro composto tetrapirrólico de destaque é a cobalamina, ou vitamina B12, que atua na digestão de ácidos graxos. Essa macromolécula apresenta um átomo de cobalto(III) em sua estrutura, FIGURA 1.9(D). E a deficiência dessa vitamina, sintetizada por bactérias intestinais, pode levar a uma doença grave chamada anemia perniciosa⁴⁰.

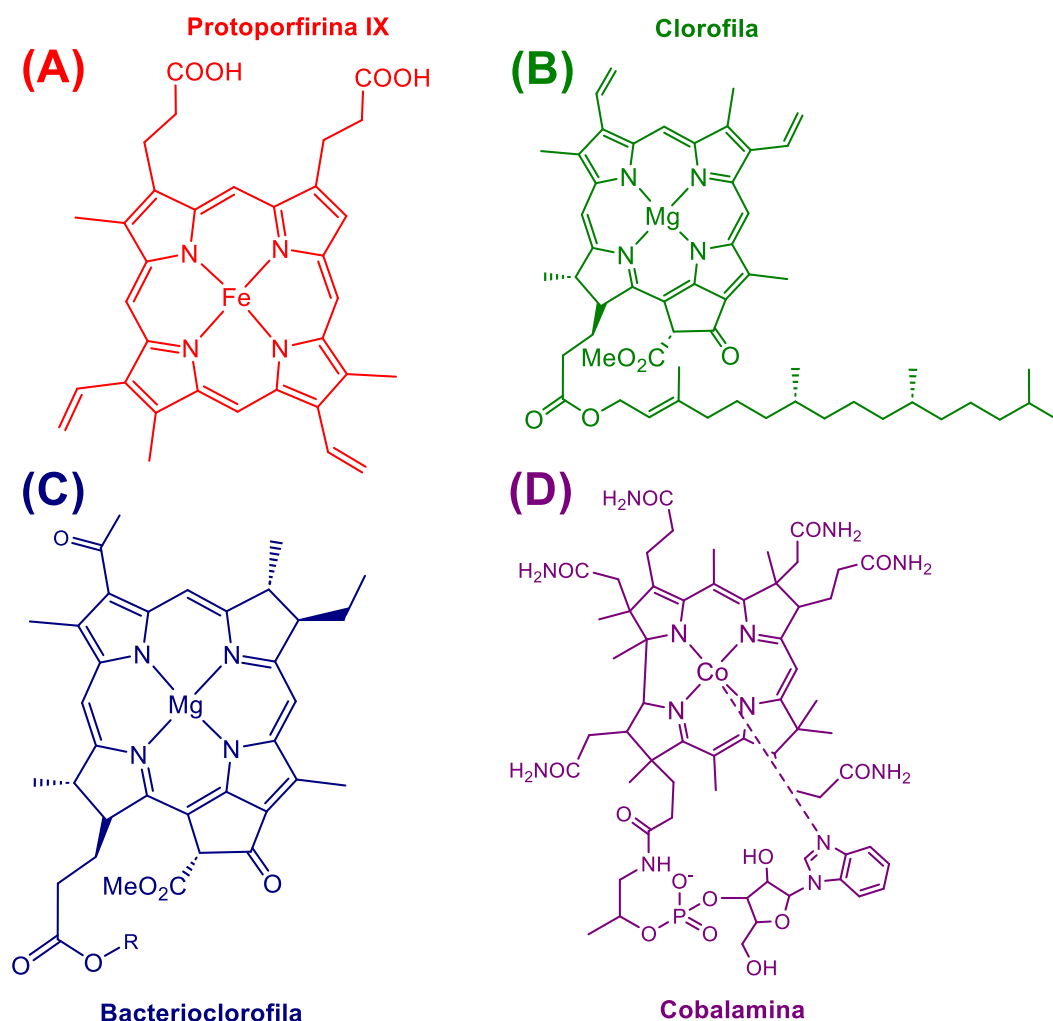


FIGURA 1.9 - Estruturas de anéis tetrapirrólicos de ocorrência natural: protoporfirina IX (A), clorofila (B), bacterioclorofila (C) e cobalamina (D).

Fonte: Adaptada de Pereira³⁹.

Nesta subseção, foram abordadas as generalidades relativas à nomenclatura, reatividade e à presença de compostos tetrapirrólicos encontrados de forma natural no meio biológico. Na subseção 1.6, serão discutidas algumas aplicações biológicas das porfirinas sintéticas, relevantes para este trabalho.

1.6 – Algumas aplicações biológicas de porfirinas sintéticas

1.6.1 – Fotossensibilizante

Embora tenha sido mencionado que clorinas, bacterioclorinas sejam utilizados como fotossensibilizante na terapia fotodinâmica, o objetivo deste trabalho é a utilização de compostos na inativação fotodinâmica. Sendo assim, as porfirinas são compostos mais interessantes, uma vez que os procedimentos sintéticos para a obtenção desses compostos apresenta rotas mais simples quando comparado com as clorinas e bacterioclorinas^{49,50}. Em muitos casos, as porfirinas são utilizadas como reagentes para a formação de outros compostos tetrapirrólicos. Por esse motivo, as porfirinas serão os compostos centrais deste estudo.^{49,50}.

É importante mencionar que, apesar de existirem outros fotossensibilizantes, o *Photofrin* ainda é o PS mais amplamente utilizado no mundo FIGURA 1.10(A). Este composto é uma mistura polimérica contendo de dois a seis monômeros de porfirinas em sua estrutura, e é empregado no tratamento de cânceres de pulmão, esôfago, ducto biliar, bexiga, cérebro e ovário⁵¹. Outro fotossensibilizante amplamente utilizado é o ALA. Embora sua estrutura não contenha anéis aromáticos condensados, o ALA é um precursor que passa por várias reações na mitocôndria, convertendo-se na Protoporfirina IX no ambiente intracelular⁵² FIGURA 1.10(B). Este composto é empregado como PS no tratamento de cânceres de pele, bexiga, cérebro e esôfago⁵¹.

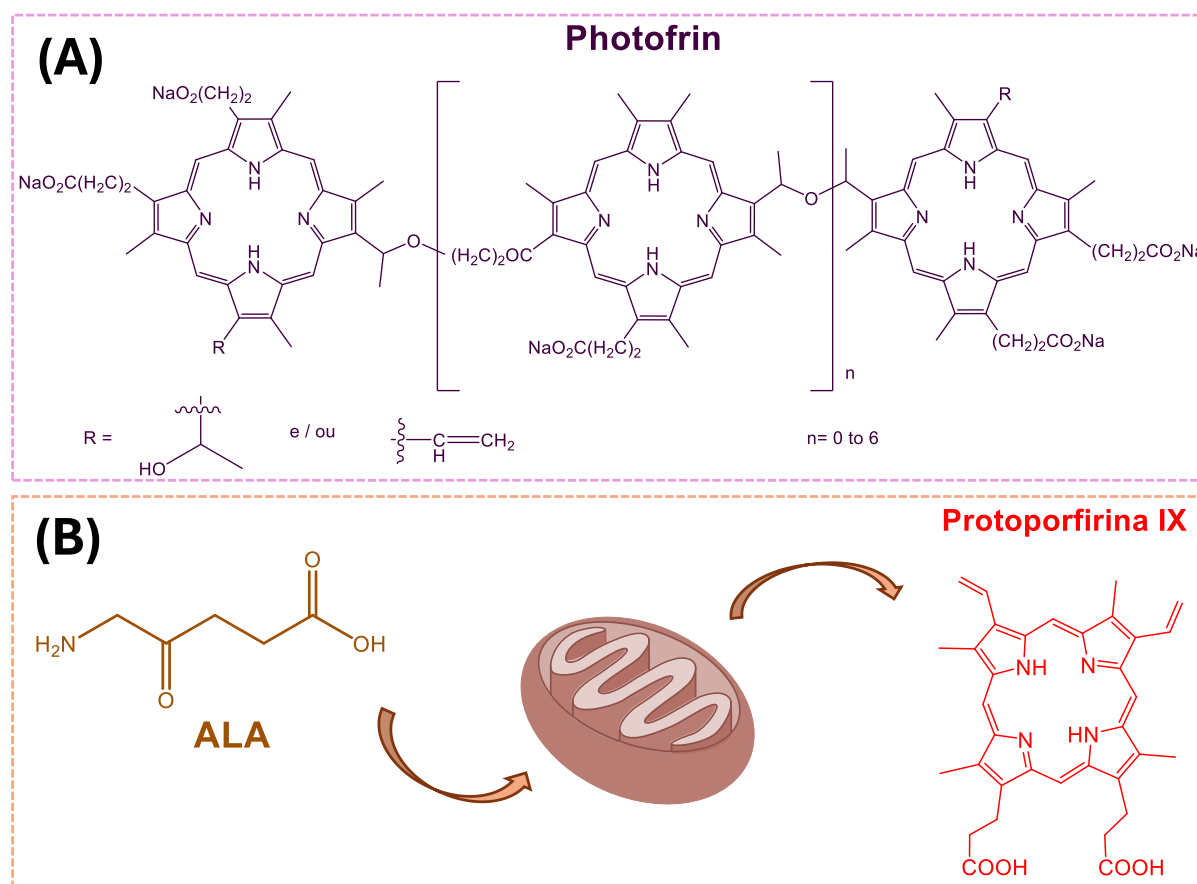


FIGURA 1.10 - Estrutura do *Photofrin* (A) e esquema ilustrativo do composto ALA sendo convertido em Protoporfirina IX na mitocôndria (B).

Devido ao sucesso dos compostos *Photofrin* e ALA como fotossensibilizantes, diversas porfirinas derivadas de compostos de coordenação têm sido desenvolvidas com essa finalidade. Em um estudo realizado por Schmitt e colaboradores, foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto à fototoxicidade complexos de rutênio(II) coordenados a diferentes arenos e à 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina (H_2T4PyP) na periferia⁵³. Observou-se uma redução expressiva na viabilidade celular após exposição à luz com comprimento de onda de 652 nm, em comparação ao controle. Adicionalmente, também foram sintetizados complexos de ósmio(II) e ródio(II) para avaliar a influência do centro metálico na fototoxicidade⁵³. No entanto, verificou-se que esses cátions não promoveram uma diminuição significativa na viabilidade celular em relação aos complexos de rutênio(II) nas mesmas condições experimentais.

O grupo do Prof. Spingler desenvolveu, em três estudos distintos, compostos baseados em porfirinas e metaloporfirinas com o objetivo de obter fotossensibilizantes aplicados à PDI. No primeiro trabalho, conduzido por Naik e colaboradores, foram sintetizadas e caracterizadas porfirinas tetracatiônicas derivadas da coordenação de cisplatina e transplatina à 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina (H_2T4PyP), FIGURA 1.11(A)⁵⁴. Esses compostos foram avaliados em células de ovário sensíveis e resistentes à cisplatina (linhagens A2780 e CP07, respectivamente) após irradiação com luz a 420 nm⁵⁴. Os resultados mostraram que o composto derivado da transplatina apresentou um índice fototóxico (IF) superior a 5260, indicando que sua toxicidade foi mais de 5260 vezes maior após a irradiação com luz de 420 nm, em comparação com a condição sem irradiação⁵⁴. É importante mencionar que, o índice fototóxico é a razão entre a concentração inibitória dos compostos sem a irradiação e concentração inibitória do compostos após a irradiação, na mesma linhagem celular e utilizando as condições experimentais semelhantes.

De forma semelhante, no trabalho de Rubbiani e colaboradores, foram investigadas metaloporfirinas de zinco(II) tetracatiônicas contendo precursores de cisplatina e transplatina, avaliando sua ação fototóxica em células de câncer cervical da linhagem HeLa, FIGURA 1.11(B)⁵⁵. Após irradiação a 420 nm, verificou-se que essas metaloporfirinas apresentaram um índice fototóxico superior a 5882, significativamente maior que o da porfirina de base livre análoga, que foi de 1210⁵⁵. Esses resultados destacam a importância de comparar as porfirinas de base livre com suas metaloporfirinas de zinco(II) análogas, dado que o centro metálico de zinco(II) não suprime completamente a fluorescência da porfirina, preservando sua eficácia como fotossensibilizante⁵⁵.

Por fim, no terceiro estudo, conduzido por Schneider e colaboradores, foram sintetizadas porfirinas tetracatiônicas contendo os mesmos precursores mencionados anteriormente, porém utilizando o isômero de posição da H_2T4PyP , a 5,10,15,20-tetra(3-piridil)porfirina (H_2T3PyP), FIGURA

1.11(C)⁵⁶. Os resultados indicaram um índice de fototoxicidade superior aos estudos previamente citados, alcançando um valor de 6030.

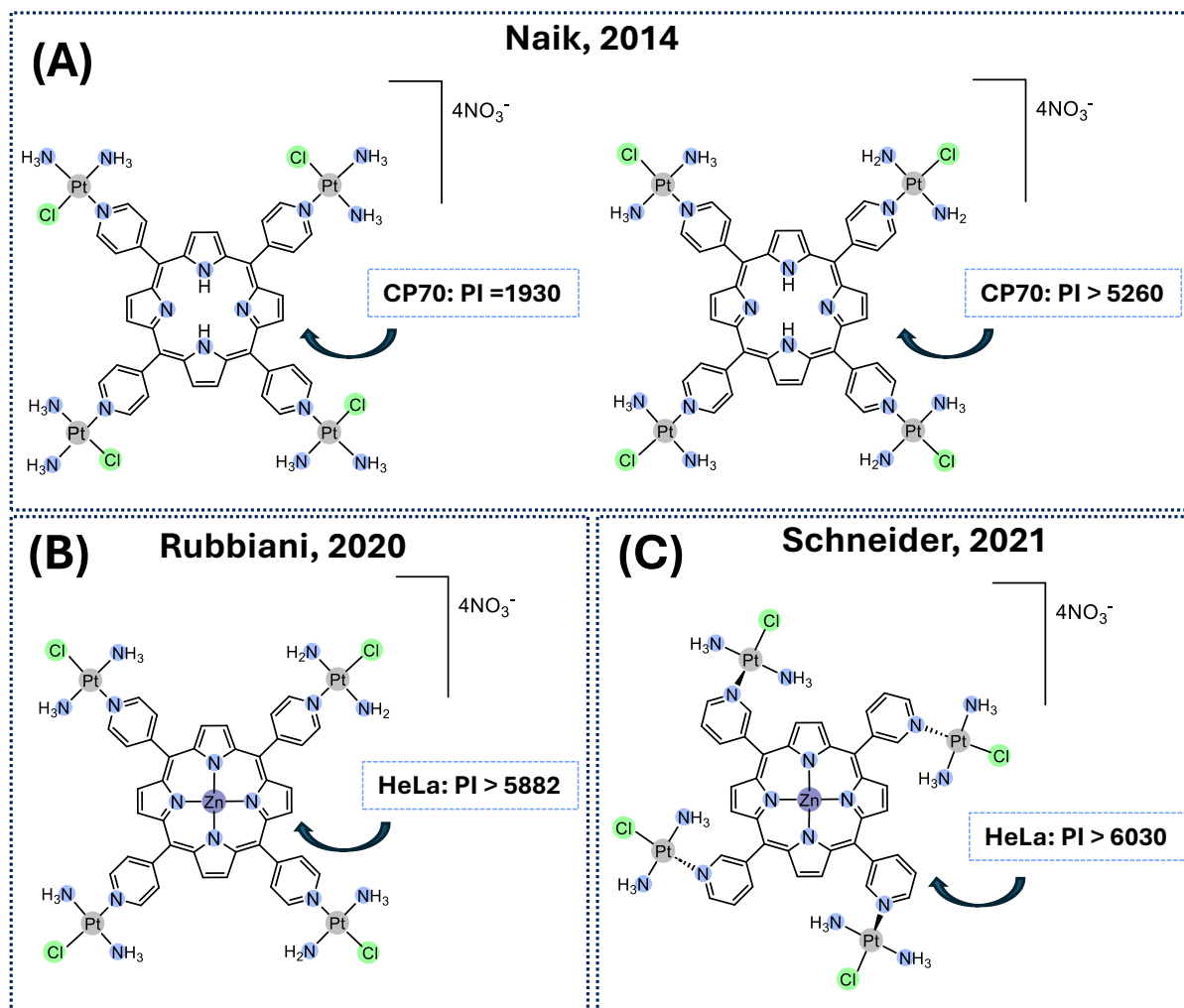


FIGURA 1.11 - Estruturas das porfirinas tetracatiônicas derivadas da cisplatina e transplatina, desenvolvidas pelo grupo do Professor Spingler: trabalho de Naik, 2014⁵⁴ (A); Rubbiani, 2020⁵⁵ (B); Schneider, 2021⁵⁶ (C).

Embora os estudos conduzidos pelo grupo do Prof. Spingler apresentem outros resultados relevantes, os dados sobre viabilidade celular são complementares e destacam a importância de realizar modificações estruturais pontuais para uma melhor compreensão do sistema^{54–56}. Alterações como a substituição de porfirinas de base livre por metaloporfirinas de zinco(II) e a substituição da $\text{H}_2\text{T4PyP}$ pela $\text{H}_2\text{T3PyP}$ demonstraram ser estratégias importantes para otimizar a eficácia dos compostos.

1.6.2 – Interação com DNA

Outra aplicação relevante das porfirinas, embora menos conhecida do que seu uso como fotossensibilizante, é sua interação com o DNA, particularmente no caso das porfirinas tetracatiônicas. De acordo com Pratviel, porfirinas neutras ou carregadas negativamente não interagem com a dupla fita de DNA em condições fisiológicas⁵⁷. Porfirinas tetracatiônicas, por sua vez, são amplamente empregadas para esse propósito devido às interações eletrostáticas que ocorrem entre seus grupos catiônicos, especialmente nas posições *meso*, e as cadeias de açúcar-fosfato do DNA. Inicialmente, a interação com o DNA é predominantemente eletrostática. Entretanto, outras formas de interação podem surgir, incluindo intercalação entre bases nitrogenadas, ligação aos sulcos maior e menor, formação de complexos externos ou interações com estruturas G-quadruplex, FIGURA 1.12.

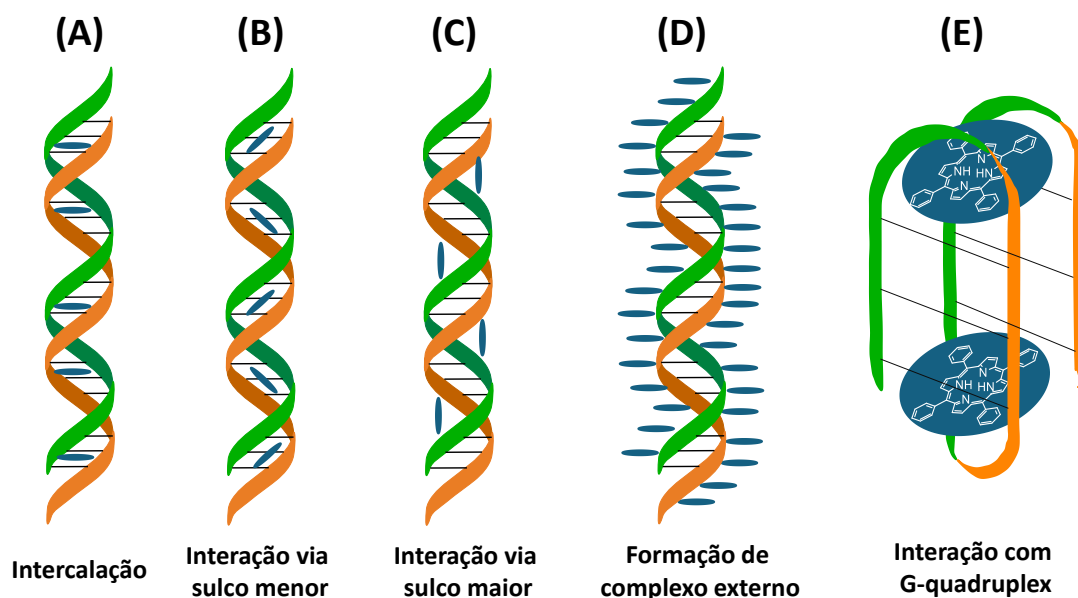


FIGURA 1.12 - Representações dos modos de interação das porfirinas com o DNA: intercalação (A), interação via sulco menor (B) e via sulco maior (C), formação de complexo externo (D) e G-quadruplex (E).

Um exemplo notável de porfina com capacidade de interação com o DNA é a 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil))porfina, FIGURA 1.13(A),

conhecida por sua habilidade de intercalar com essa biomolécula, FIGURA 1.13(B). Devido à sua aplicação clássica, outras porfirinas tetracatiônicas derivadas de moléculas orgânicas foram sintetizadas, com o objetivo de aprofundar a compreensão sobre como essa classe de compostos pode interagir com o DNA⁵⁷.

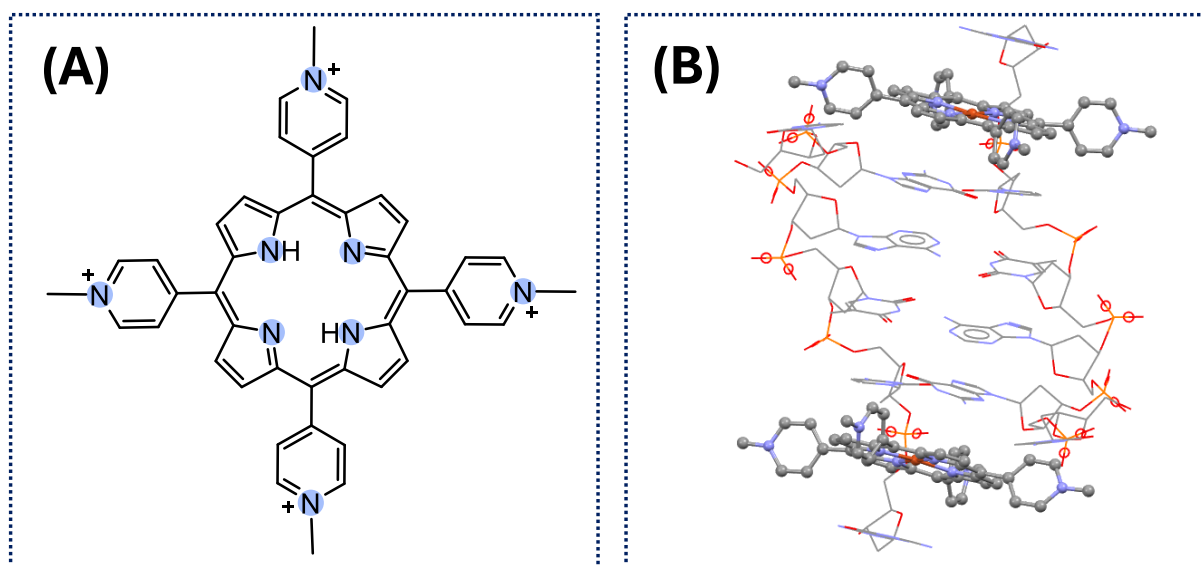


FIGURA 1.13 - Estrutura da 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil))porfirina e estrutura de um fragmento de DNA co-cristalizado com a 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil))porfirinato de cobre(II). PDB: 231D

Embora exista uma grande quantidade de porfirinas tetracatiônicas derivadas de reações orgânicas com propriedades de interação com o DNA, menos compostos de coordenação foram desenvolvidos com essa finalidade, FIGURA 1.14. Em um estudo conduzido por Lourenço e colaboradores, foram sintetizadas porfirinas de base livre tetracatiônicas derivadas da coordenação de complexos de platina(II) ligados à bipyridina, bem como suas metaloporfirinas de zinco(II) análogas⁵⁸. Por meio de diversas técnicas, foi observado que as metaloporfirinas de zinco(II) são capazes de promover interações externas e intercalações com o DNA⁵⁸.

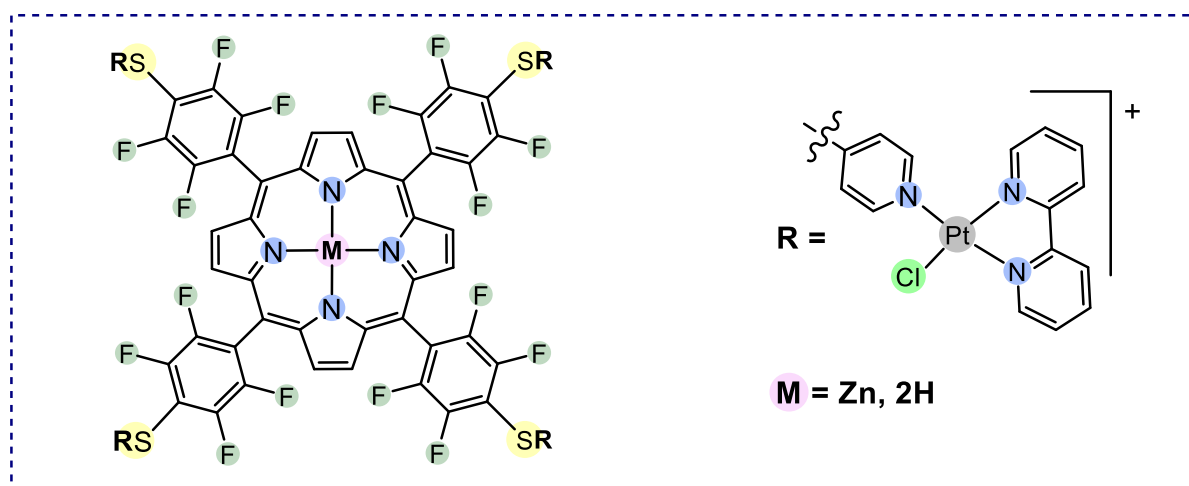


FIGURA 1.14 - Estruturas das porfirinas e metaloporfirinas tetracatiônicas derivadas da coordenação de complexos de platina(II) na periferia descrita por Lourenço e colaboradores⁵⁸.

Por outro lado, no estudo realizado por Iglesias e colaboradores, foram sintetizados e caracterizados complexos de paládio(II) e platina(II) coordenados na periferia da *meso*-tetra(2-tienil)porfirina, FIGURA 1.15(A)⁵⁹. Para investigar a interação desses compostos com o DNA, foram realizados ensaios de viscosidade, dicroísmo circular, ensaios de competição por espectroscopia de fluorescência com vários corantes que interagem com o DNA por modos específicos e estudos de ancoragem molecular. Com base nos resultados desses experimentos, os autores concluíram que os compostos têm a capacidade de interagir com o DNA por meio do sulco menor⁵⁹.

De forma semelhante, no estudo conduzido por Oliveira e colaboradores, foram investigadas as interações de porfirinas derivadas da *meso*-tetra(N-metil(4-piridil))porfirina e sua metaloporfirina de zinco(II) análoga, ambas coordenadas a complexos de rutênio(II) contendo dois ligantes bipyridina, FIGURA 1.15(B)⁶⁰. Diversos experimentos foram realizados para avaliar a interação com o DNA, incluindo estudos de ancoragem molecular e dicroísmo circular. Os resultados indicaram que a interação predominante entre as porfirinas tetracatiônicas e o DNA é de natureza eletrostática. Além disso, devido às

propriedades fotoquímicas dos compostos, foi observado que esses complexos promovem a fotoclivagem do DNA com a exposição de 60 minutos à luz branca⁶⁰.

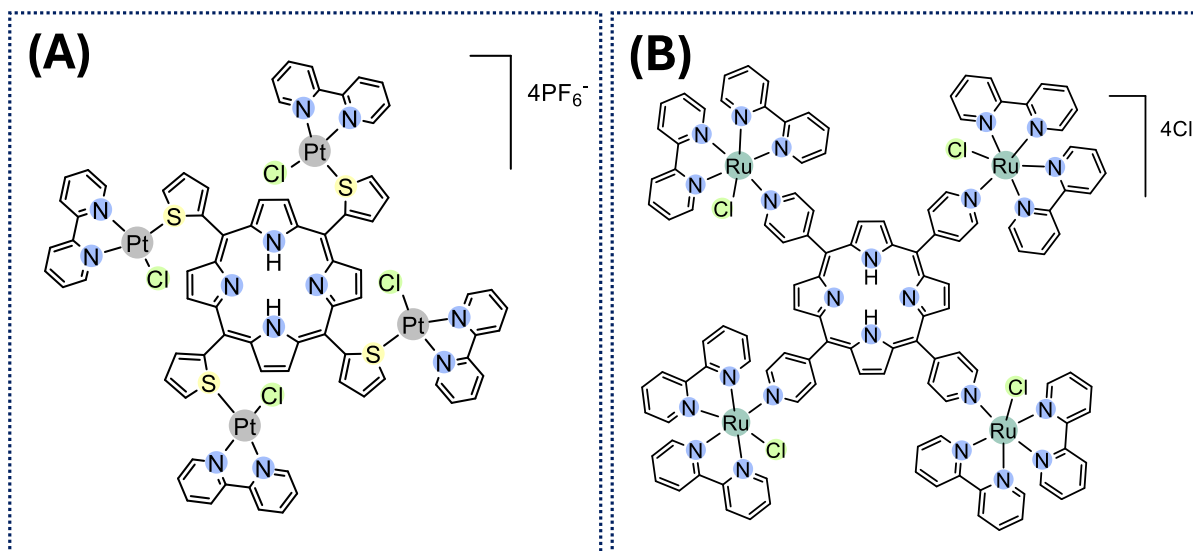


FIGURA 1.15 - Estruturas das porfirinas e metaloporfirinas tetracatiônicas derivadas da coordenação de complexos de platina(II) e rutênio(II) na periferia da *meso*-tetra(2-tienil)porfirina (A) e *meso*-tetra(N-metil(4-piridil))porfirina (B) descritas por Iglesias e Oliveira^{59,60}, respectivamente.

Dessa forma, todo o embasamento teórico relacionado à aplicação das porfirinas foi devidamente apresentado, proporcionando uma base sólida para a compreensão deste trabalho. Na subseção 1.7, será descrita a estrutura básica dos compostos sintetizados neste estudo, juntamente com a justificativa para a escolha de cada um dos ligantes presentes em suas estruturas.

1.7 – Planejamento estrutural

Neste trabalho, foi explorada a possibilidade de desenvolver uma nova classe de complexos contendo porfirinas, rutênio, areno e fosfinas, designados como PRAP (do inglês: *Porphyrin, Ruthenium, Arene, Phosphine*). Esses compostos consistem em porfirinas tetracatiônicas com uma estrutura diferenciada, ilustrada na FIGURA 1.16, e descrita pela primeira vez na literatura. A estrutura básica desses complexos oferece grande versatilidade, permitindo

modificações por meio da utilização de diferentes porfirinas, arenos e fosfinas, o que pode resultar em propriedades biológicas distintas. Os compostos PRAP foram desenvolvidos com o objetivo de explorar duas das principais aplicações biológicas das porfirinas: sua atuação como fotossensibilizante e interação com o DNA.

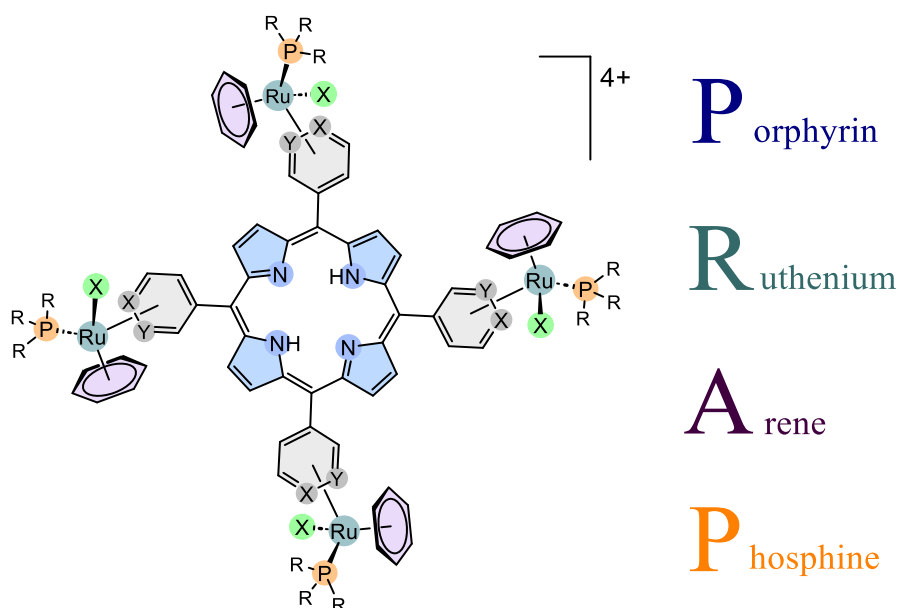


FIGURA 1.16 - Estrutura básica dos compostos PRAP (do inglês: *Phorphyrin*, *Ruthenium*, *Arene*, *Phosphine*).

Conforme mencionado anteriormente, o complexo RAPTA-C é considerado um dos compostos promissores de rutênio(II) para uso como quimioterápico⁶¹. Este complexo serviu como uma das principais inspirações para os compostos PRAP sintetizados neste trabalho. Os complexos da série RAPTA apresentam uma estrutura básica $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-arene})\text{PTA}]$, contendo a fosfina 1,3,5-triaza-7-fosfadadamantano (PTA) e dois cloretos como ligantes, o que resulta em uma estrutura neutra.

Dessa forma, foram realizadas algumas modificações estruturais, como a substituição do ligante PTA pela trifenilfosfina (PPh_3), conferindo características mais lipofílicas aos complexos, facilitando a difusão pela membrana celular, o que pode aumentar sua citotoxicidade, FIGURA 1.17⁶². É

relevante destacar que os átomos de fósforo das fosfinas se ligam ao centro metálico de rutênio(II) por meio de uma ligação frontal, formando ligação σ , e também realizam uma sobreposição dos orbitais d preenchidos do metal com misturas de orbitais do tipo σ^* , proveniente dos orbitais atômicos $3p$, e os orbitais d vazios do fósforo, que também são utilizados para a formação da ligação π com o centro metálico. Assim, as fosfinas atuam como ligantes com características tanto σ -doadoras quanto π -receptoras, promovendo o mecanismo de retrodoação⁶³.

Os complexos de rutênio(II)/areno constituem um sistema organometálico, caracterizado pela ligação direta entre um centro metálico e átomos de carbono. Nesse caso, a interação ocorre por meio da sobreposição dos orbitais d do rutênio(II) com a densidade eletrônica gerada pelos elétrons π dos seis átomos de carbono do anel aromático, resultando na formação de uma ligação σ . Simultaneamente, ocorre um processo de retrodoação, no qual os orbitais d do rutênio(II) interagem com os orbitais π^* do anel areno.

Outra modificação significativa foi a substituição de um ligante cloreto pelo piridil. Com essa substituição, o complexo de areno, antes neutro, torna-se catiônico, FIGURA 1.17. A presença do cloreto remanescente pode promover a labilização desse ligante, facilitando sua interação com biomoléculas no meio biológico. Por outro lado, o cloreto, como ligante aniônico, desempenha um papel estabilizador para o átomo de rutênio(II), uma vez que, após a substituição do primeiro cloreto, o complexo adquire carga positiva. Além disso, o cloreto apresenta características de ligante σ -doador e π -doador⁶⁴, devido ao preenchimento total de seus orbitais atômicos, o que contribui para a estabilidade do rutênio(II).

Além do composto RAPTA-C, este trabalho baseia-se nos estudos do Professor Spingler, com adaptações específicas para aprofundar a compreensão do sistema. Nesse contexto, foram utilizados os ligantes 5,10,15,20-tetra(piridil)porfirina e suas metaloporfirinas de zinco(II) análogas^{54,55}.

Adicionalmente, o centro metálico de zinco(II) pode proporcionar interações com moléculas de solvente, proporcionando uma maior solubilidade dos compostos, podendo modificar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

Essas modificações visam explorar o potencial desses compostos como fotossensibilizante em inativação fotodinâmica (PDI). Adicionalmente, foi realizada a coordenação de quatro complexos de rutênio(II) com essas porfirinas, resultando na formação dos complexos PRAP, projetados para potencial interação com o DNA, ampliando suas possíveis aplicações biológicas.

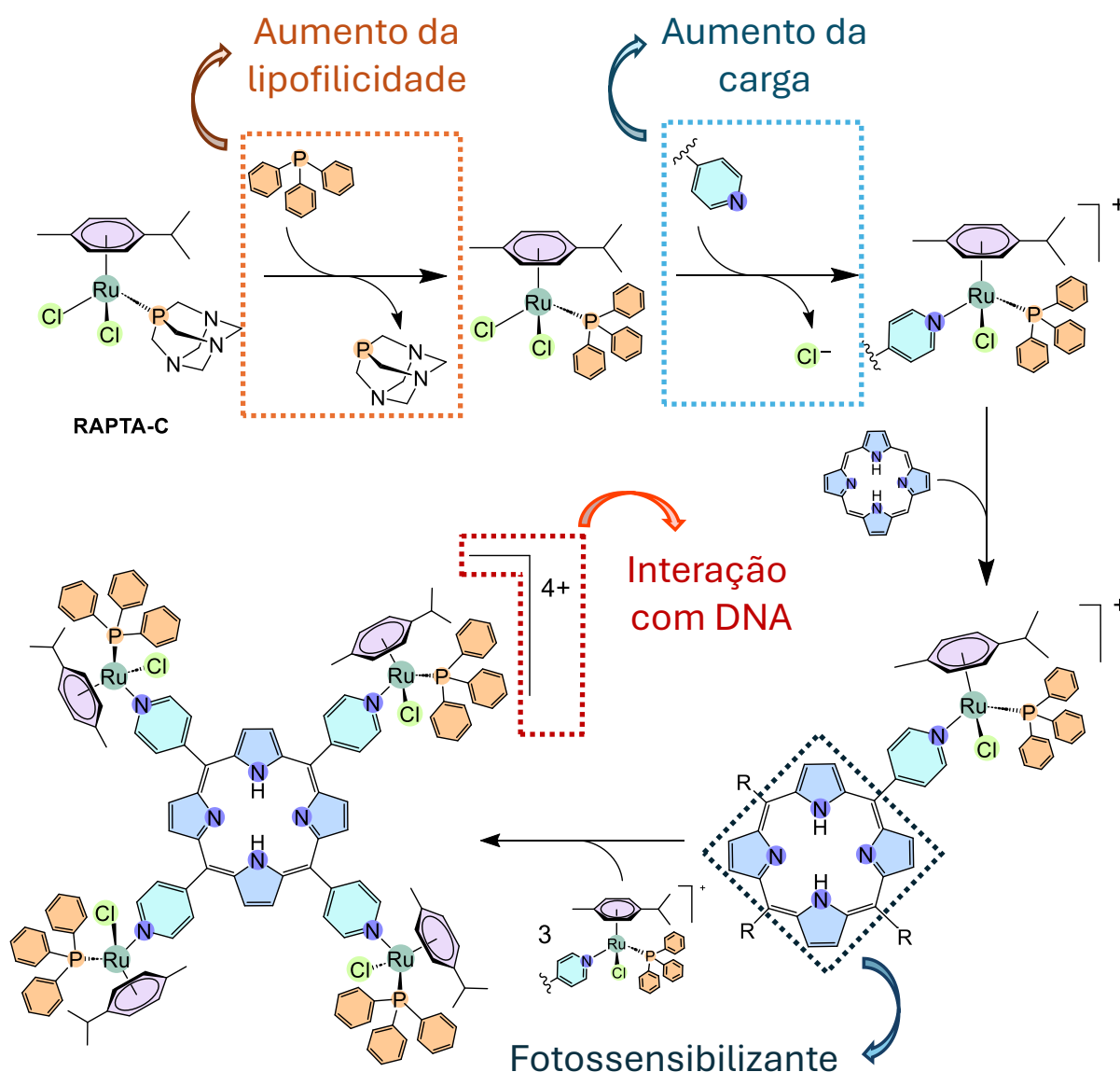


FIGURA 1.17 - Planejamento estrutural dos compostos PRAP desenvolvidos neste trabalho, partindo do complexo RAPTA-C, a fim de promover aumento de lipofilicidade, propriedades fotoquímicas e interação com o DNA.

Foram sintetizados quatro complexos derivados da classe PRAP, utilizando como precursor o composto $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$. Os ligantes empregados foram a 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina e sua metaloporfirina de zinco(II), denominadas H_2P e ZnP , respectivamente. De forma análoga, foram utilizados a 5,10,15,20-tetra(3-piridil)porfirina e sua metaloporfirina de zinco(II) para a obtenção dos complexos $\text{H}_2\text{P2}$ e ZnP2 . Adicionalmente, foi sintetizado um complexo mimético, denominado Mim. Esse complexo apresenta a estrutura básica da periferia das porfirinas tetracatiônicas. Ou seja, é um complexo de

rutênio(II) coordenado ao p-cimeno, trifenilfosfina, cloreto e piridina, proporcionando um composto carregado positivamente. Esse complexo foi sintetizado com o objetivo de comparar suas ações citotóxicas, fototóxicas e de interação com o DNA em relação às porfirinas tetracatiônicas desenvolvidas neste estudo, FIGURA 1.18.

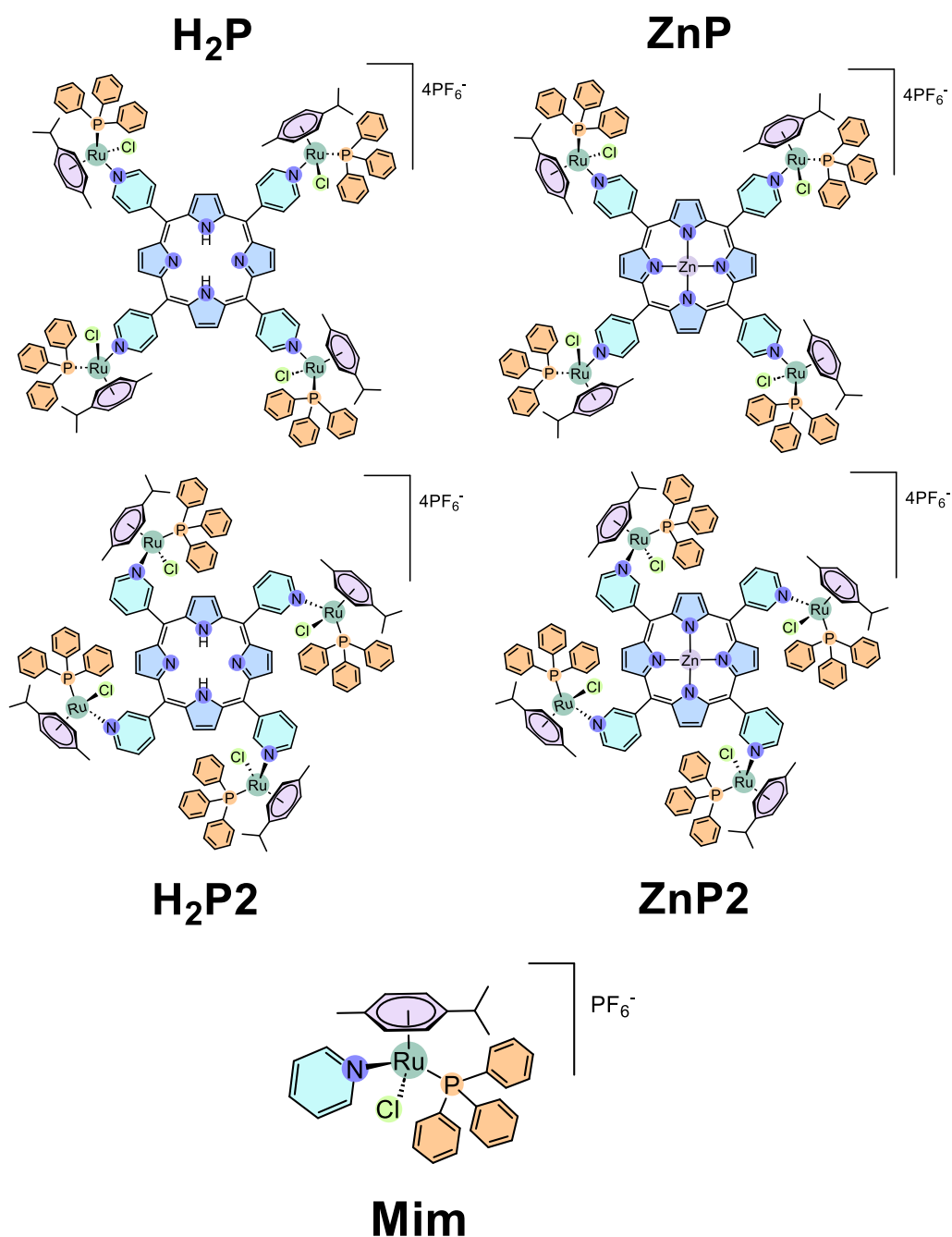
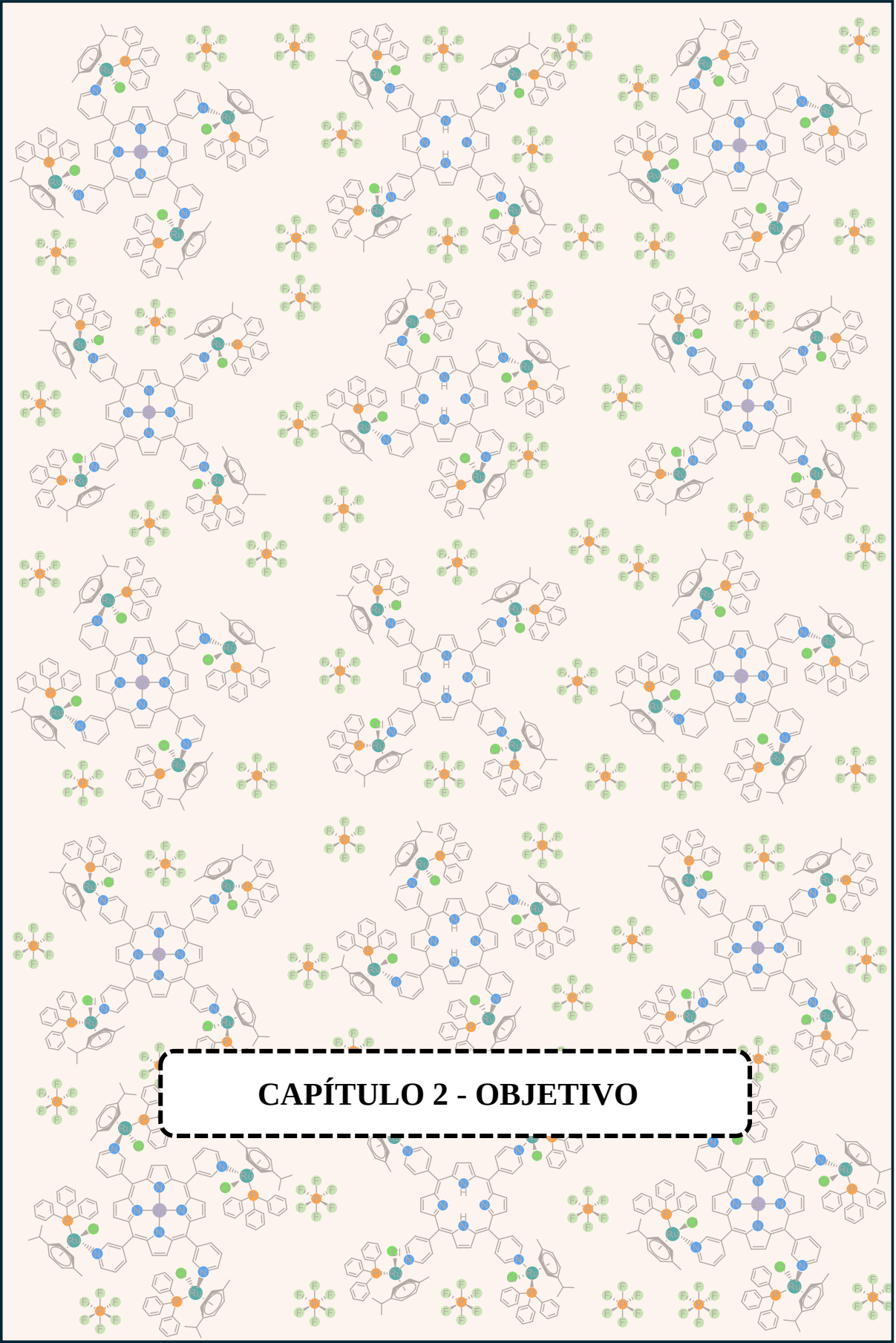
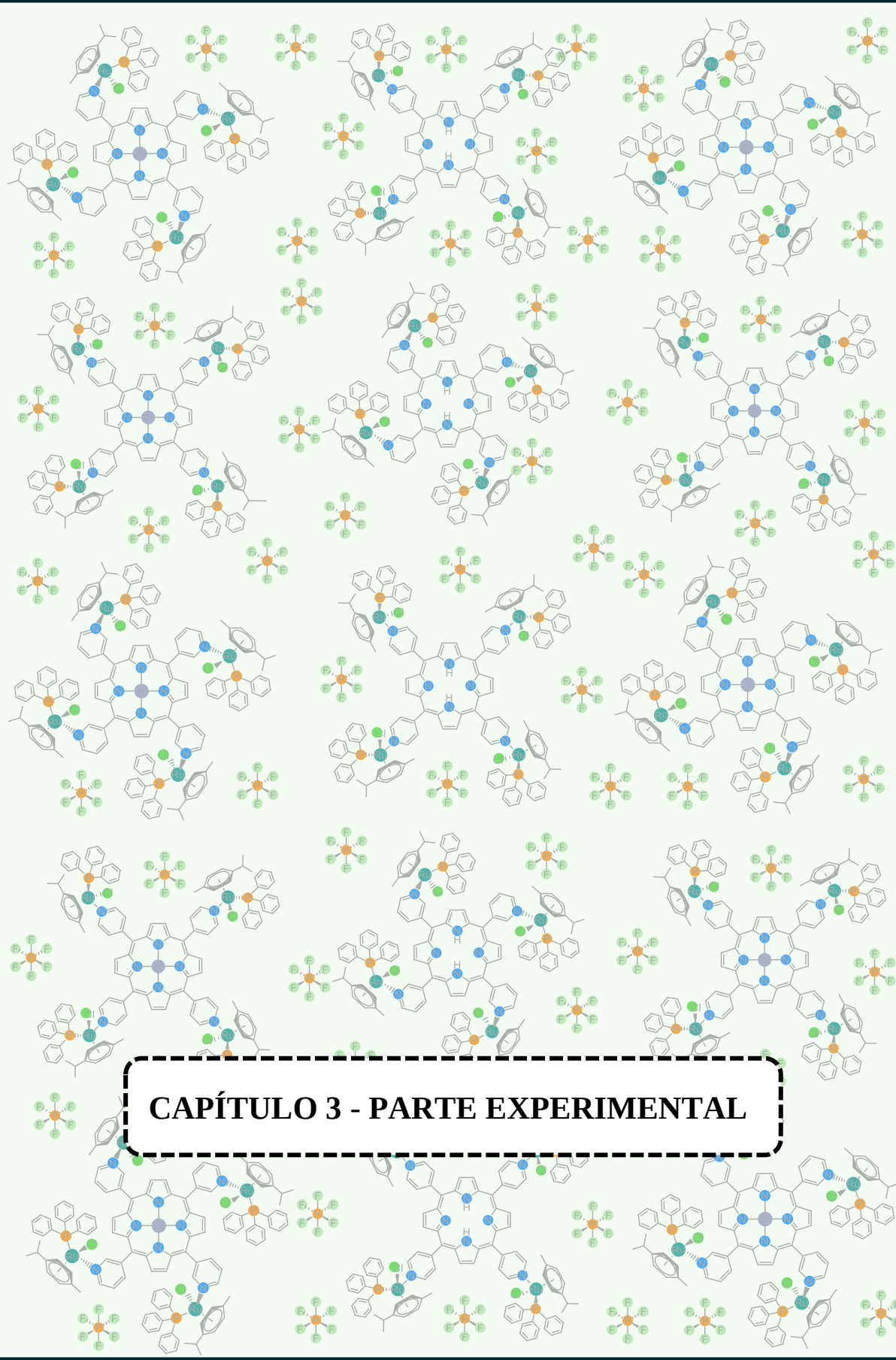


FIGURA 1.18 - Estruturas dos complexos PRAP e mimético (Mim) que foram utilizados neste trabalho.

The background of the page is a repeating pattern of chemical structures. These structures include large, complex molecules with multiple rings and functional groups, as well as smaller, simpler molecules. The structures are rendered in a light, semi-transparent style, allowing the text to be clearly visible. The colors used in the structures include blue, green, orange, and grey.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVO

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é contribuir para a compreensão da relação estrutura/atividade de novas porfirinas tetracatiônicas, derivadas da coordenação com complexos de rutênio(II), areno e fosfina na periferia (compostos PRAP), avaliando sua interação com o DNA, fototoxicidade e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs).

The background of the page is a repeating pattern of chemical structures. These structures include large, complex molecules with multiple rings and functional groups, as well as smaller, simpler molecules. The structures are rendered in a light green color, with some atoms highlighted in blue and orange. The overall pattern is dense and covers the entire page.

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão descritas as procedências dos solventes, reagentes, metodologias de sínteses, caracterizações, aplicações biomoleculares e celulares dos compostos utilizados nesse trabalho.

3.1 – Materiais

3.1.1 – Solventes

Os solventes orgânicos [metanol, diclorometano, N,N-dimetilformamida (DMF), hexano, dimetilsulfóxido (DMSO), éter dietílico, etanol, ácido propiônico e n-octanol] foram utilizados sem purificação prévia sendo que todos são de procedência Synth[®]. O sal iodeto de cério (CsI) era de procedência Sigma-Aldrich[®].

3.1.2 – Reagentes diversos

Os reagentes pirrol, tricloreto de rutênio tri-hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), α -felandreno, 3-piridinacarboxaldeído, tetrafluoroborato de prata (AgBF_4), hexafluorofosfato de potássio (KPF_6), trifenilfosfina (PPh_3), *meso*-tetra(4-piridil)porfirina ($\text{H}_2\text{T4PyP}$) e piridina são de procedência Sigma-Aldrich[®] e foram utilizados sem purificação prévia, com exceção do pirrol que foi submetido a destilação antes da síntese do ligante *meso*-tetra(3-piridil)porfirina.

3.2 – Sínteses

Nessa subseção serão descritas as sínteses dos precursores de arenos rutênio, da porfirina *meso*-tetra(3-piridil)porfirina, dos complexos tetracatiônicos derivado de piridil-porfirinas e complexo mimético.

3.2.1 – Síntese dos precursores de rutênio

3.2.1.1 – Síntese do complexo $\{[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})]_2(\mu\text{-Cl})_2\}$ (P1)

O complexo precursor $\{[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})]_2(\mu\text{-Cl})_2\}$ foi sintetizado segundo a literatura⁶⁵. Em um frasco Schlenk foi dissolvido $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,500 g; 1,90 mmol) em 50,0 mL de metanol previamente desaerado e adicionado α -felandreno (4,00 mL; 19,0 mmol). A solução foi mantida sob refluxo, agitação magnética e atmosfera inerte de argônio por 4 h. Em seguida, o solvente do meio reacional foi diminuído sob pressão reduzida, até a precipitação de um sólido amarelo e a mistura foi mantida a 8 °C por 12 h. Finalmente, o sólido foi filtrado, lavado com etanol (3 x 10,0 mL), éter dietílico (3 x 10,0 mL) e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 75%.

3.2.1.2 – Síntese do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$ (P2)

O complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$ foi sintetizado segundo a literatura⁶⁶. Em um frasco Schlenk foi dissolvido $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})_2(\mu\text{-Cl})_2]$ (274,7 mg; 0,47 mmol) em 40,0 mL de metanol previamente desaerado e adicionado trifenilfosfina (4,0 mL; 19,0 mmol). A solução foi mantida sob refluxo, agitação magnética e atmosfera inerte de argônio por 4 h. Em seguida, a reação foi resfriada e o sólido vermelho alaranjado foi filtrado, sendo esse procedimento realizado duas vezes. Finalmente, o sólido foi lavado com metanol (3 x 10 mL), éter etílico (3 x 10 mL) e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 70%.

3.2.2 – Síntese de *meso*-tetra(3-piridil)porfirina ($\text{H}_2\text{T3PyP}$)

O ligante *meso*-tetra(3-piridil)porfirina foi sintetizado segundo a literatura⁶⁷. Em um balão foram adicionados ácido propiônico (40,0 mL), piridina-

3-carboxaldeído (0,88 mL; 9,17 mmol) e pirrol previamente destilado (0,65 mL; 9,17 mmol). O meio reacional foi mantido sob refluxo, agitação magnética em sistema aberto durante 2,5 h. Em seguida, a reação foi resfriada e o solvente foi totalmente evaporado em um sistema de destilação sob pressão reduzida. Após esse processo, foram realizadas duas cristalizações utilizando DMF/etanol (5:100). Posteriormente, o produto foi solubilizado em clorofórmio, e realizada uma filtração para a remoção final do polipirrol. Finalmente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para a obtenção do produto púrpuro. Rendimento: 25%.

3.2.3 – Síntese dos complexos tetracatiônicos

3.2.3.1 – Síntese de *meso*-tetra(4-piridil)porfirina com [Ru(η^6 -p-cimeno)Cl(PPh₃)] - (H₂P)

Em um frasco Schlenk foi solubilizado H₂T4PyP (20,0 mg; 0,32 μ mol) em 40 mL de clorofórmio, em seguida foram adicionados [Ru(η^6 -p-cimeno)Cl₂(PPh₃)] (73,7 mg; 0,13 mmol) solubilizado em 20,0 mL de acetona e AgBF₄ (26,7 mg; 0,14 mmol). O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente sob agitação magnética por 24 h, no escuro. Após o tempo decorrido, os solventes foram totalmente evaporados sob pressão reduzida e adicionado 20,0 mL de diclorometano para solubilização do composto, seguido de filtração em celite. O filtrado foi coletado e adicionado KPF₆ solubilizado em 5 mL de metanol. Finalmente, o sólido marrom foi precipitado em hexano, filtrado e lavado com água (3 x 10 mL), éter etílico (3 x 10 mL) e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 73%.

3.2.3.2 – Síntese de *meso*-tetra(3-piridil)porfirina com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)] - (\text{H}_2\text{P2})$

A síntese da $\text{H}_2\text{P2}$ foi realizada de forma semelhante com a descrita para a obtenção do complexo H_2P . O produto foi obtido com o rendimento de 63%.

3.2.3.3 – Síntese de *meso*-tetra(4-piridil)porfirinato de zinco(II) com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)] - (\text{ZnP})$

Em um frasco Schlenk foi solubilizado H_2P (80 mg; 24,0 μmol) em 8 mL de diclorometano, em seguida foi adicionado $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (105,3 mg; 0,48 mmol) solubilizado em 1,0 mL de metanol. O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente sob agitação magnética por 1,5 h. Após o tempo decorrido, foi adicionado hexano para a formação de um sólido esverdeado que foi filtrado e lavado com água, metanol e hexano. O produto foi obtido com o rendimento de 80%.

3.2.3.4 – Síntese de *meso*-tetra(3-piridil)porfirinato de zinco(II) com $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{PPh}_3)] - (\text{ZnP2})$

A síntese com complexo ZnP2 foi realizada de forma semelhante com a descrita para a obtenção do complexo ZnP . O produto foi obtido com o rendimento de 69%.

3.2.3.5 – Síntese de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{py})\text{Cl}(\text{PPh}_3)] - (\text{Mim})$

O composto mimético, ou simplesmente Mim, foi sintetizado pela solubilização 70,0 mg do complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$ em 40 mL de metanol, adicionados 200 μL de piridina e 26,3 mg de KPF_6 . O meio reacional foi mantido sob refluxo e agitação magnética por 24 h. Posteriormente,

o volume do solvente foi reduzido a aproximadamente 3,0 mL sob pressão reduzida e resfriado até a formação de um sólido amarelo, que foi filtrado e lavado com metanol gelado e éter etílico. O produto foi obtido com o rendimento de 69%.

3.3 – Métodos instrumentais e procedimentos

3.3.1 – Análise elementar

As porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram obtidas utilizando o equipamento Fisions-EA1108 (CHNS-O) da CE *Instruments* com o programa EAGER 200 disponíveis na central analítica do Departamento de Química da UFSCar. Pesou-se aproximadamente 1 mg das amostras em uma balança Sartorius Micro (XM-1000 P) que apresenta erro igual a 0,005 mg.

3.3.2 – Medidas de condutividade molar

Os compostos foram solubilizados em acetona para obter uma concentração de 1.10^{-3} mol L⁻¹ e analisadas por um condutivímetro MARCONI MA-521. Antes da análise o equipamento foi calibrado com uma solução padrão 146,9 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ da MS TECPON Instrumentação.

3.3.3 – Espectrometria de massas

As medidas de espectrometria de massas foram realizadas pelo MSc. Carlos André Ferreira Moraes. A amostra foi preparada solubilizando 1,0 mg do composto em 1000 μL de ACN (grau LC-MS), posteriormente diluída para 5 ppm. A fase móvel foi composta de ACN grau LC-MS (solvente C) e H₂O ultrapura (solvente A) no modo isocrático de eluição 95:05 (ACN:H₂O), com vazão de 0.300 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 3 μL .

A análise qualitativa foi realizada usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo, sendo empregado os seguintes parâmetros para a ionização:

TABELA 3.1- Parâmetros utilizados na ionização para a detecção dos padrões isotópicos.

Condições do Q-Tof	
Tipo de ionização	ESI+
Temperatura do gás (°C)	280
Fluxo de gás (L min⁻¹)	12
Nebulizador (Psi)	35
Temperatura da barreira térmica do gás (°C)	270
Temperatura da barreira térmica do fluxo (°C)	10
VCap	1800
Voltagem do Nozze (V)	700
Fragmentador (eV)	90
Skimmer	45
OctopoleRFPeak	750

O erro (em ppm) foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS adquirido monitorando primeiramente uma faixa entre 100 a 7000 Da, posteriormente 1000-1700 Da, com uma taxa de varredura 3 espectros s⁻¹ e processados pelo software Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00. Os padrões isotópicos teóricos foram calculados utilizando o software Isotope Distribution Calculator da Agilent.

3.3.4 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H (400 MHz) e ³¹P{¹H} (162 MHz) foram obtidos utilizando o espectrômetro Bruker 9,4 Tesla,

NanoBay disponível do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar. As amostras foram preparadas utilizando 3 mg dos compostos, dissolvidas em 450 μL de acetona- d_6 . Os espectros foram tratados utilizando o software MestReNova versão 12.0.2-20910.

3.3.5 – Espectroscopia na Região do UV-visível

Os espectros na região do Ultravioleta visível foram obtidos com auxílio de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC, duplo-feixe. Sendo que, as caracterizações dos complexos foram realizadas em diclorometano 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1cm e a varredura foi feita na região de 750 a 300 nm. Os espectros foram obtidos utilizando os softwares UVProb 2.42. Durante a aquisição dos experimentos foram subtraídos os espectros do solvente utilizado nas medidas.

3.3.6 – Espectroscopia na região do Infravermelho

As amostras foram analisadas usando um equipamento IRPrestige-21 da SHIMADZU utilizando pastilhas de CsI. Os espectros foram coletados com 64 varreduras para maior precisão em uma faixa de varredura de 4000 a 240 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos e a linha de base corrigida utilizando o programa Shimadzu IRsolution 1.60.

3.3.7 – Espectroscopia de fluorescência e rendimento quântico de emissão

Os espectros de emissão foram obtidos com auxílio do espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC - lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928. As análises foram realizadas

em cubetas de quartzo de quatro lados de caminho ótico com 10 mm e volume 3,0 mL. As medidas foram realizadas utilizando diclorometano como solvente.

O rendimento quântico de emissão (ϕ_{em}) está relacionado com a razão entre o número de fótons emitidos e número de fótons absorvidos⁶⁸, como mostra a EQUAÇÃO 3.1:

EQUAÇÃO 3.1 - Equação base que conceitua o rendimento quântico de emissão.

$$\phi_{em} = \frac{n^{\circ} \text{ de fótons emitidos}}{n^{\circ} \text{ de fótons absorvidos}}$$

Os valores de rendimento quântico das amostras podem ser calculados a partir de rendimento quântico de um padrão⁶⁸, nesse caso foi utilizado a *meso*-tetra(fenil)porfirina (H₂TPP) $\phi_{TPP} = 0,13^{69,70}$, pela

EQUAÇÃO 3.2.

EQUAÇÃO 3.2 - Rendimento quântico de emissão em que ϕ_x é rendimento quântico da amostra; A_{TPP} e A_x são a absorbância real da H₂TPP e amostra, respectivamente, próxima a 0,1; I_{TPP} e I_x são as integrais das bandas analisadas do espectro de emissão para a H₂TPP e a amostra, respectivamente; n_x e n_{TPP} são os índices de refração do solvente utilizado na amostra e no padrão.

$$\phi_x = \phi_{TPP} \cdot \left(\frac{A_{TPP}}{A_x} \right) \cdot \left(\frac{I_x}{I_{TPP}} \right) \cdot \left(\frac{n_{TPP}}{n_x} \right)^2$$

O termo $(n_{TPP}/n_x)^2$ foi desprezado, pois utilizou-se mesmo solvente.

3.3.8 – Difração de raios-X

As coletas de difração de raios-X do composto Mim foram realizadas em um difratômetro XtaLAB Synergy Dualflex HyPix, radiação MoK α ($\lambda = 0,71073$ Å), no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, pelo Dr. Pedro Santiago. As estruturas foram

resolvidas com auxílio do programa SHELXT⁷¹ usando método direto, que permitiram a localização dos átomos, exceto hidrogênio. Com restrição dos átomos de hidrogênio, todos os outros foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL⁷². Os cálculos de parâmetro de célula unitária e as correções por absorção foram realizados usando o software CrysAlisPro. A representação e os cálculos de superfície de Hishfeld da molécula Mim foi realizada pelo programa MERCURY e CrystalExplore^{73,74}.

3.4 – Estudo teórico

Para compreender o sistema molecular, foram aplicados cálculos teóricos com baseado na teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*), que foram realizados pela Profa. Dra. Ana Paula de Lima Batista. A estrutura eletrônica foi calculada utilizando o programa ADF⁷⁵ (*Amsterdam Density Functional*) usando a nível de teoria DFT/BP86-D3(BJ)/TZP^{76–80}. As otimizações geométricas, sem restrição de simetria, seguida dos cálculos de frequência em todos os pontos estacionários, foram calculadas a fim de verificar o mínimo da energia potencial da superfície. As análises vibracionais foram realizadas dentro da aproximação harmônica com os dados termoquímicos calculados a 298 K e 1 atm.

3.5 – Ensaios físico-químicos

3.5.1 – Ensaio de estabilidade por ressonância magnética nuclear em solventes e meio de cultura

Os ensaios de estabilidade foram realizados por RMN ¹H e ³¹P{¹H} utilizando os compostos H₂P, H₂P2 e Mim usando acetona e DMSO (9:1) para avaliar a estabilidade em DMSO, e acetona, meio de cultura DMEM e DMSO

(85:10:5) em proporções volumétricas. O ensaio foi registrando em períodos de 0, 24 e 48 h, utilizando o equipamento de RMN descrito na seção da 3.3.4.

3.5.2 – Estudo de agregação

Para os estudos de agregação, foi preparada inicialmente uma solução estoque das porfirinas tetracatiônicas a uma concentração de 0,3 mM em DMF. O experimento foi conduzido aumentando-se gradativamente a concentração dos compostos PRAP de 0 a 40,0 μ M, utilizando como meio uma solução tampão Trisma (Tris-HCl 84,0 mM; Tris-base 16,0 mM; pH 7,4; Sigma-Aldrich®) contendo 20% de DMF. Alíquotas da solução estoque foram adicionadas diretamente a uma cubeta de quartzo, e, após cada adição, foi registrado um espectro na região do UV-vis. Os espectros obtidos foram utilizados para construir um gráfico de absorbância em função da concentração do composto, permitindo avaliar a linearidade do sistema.

3.5.3 – Coeficiente de partição

Os compostos estudados foram solubilizados em DMSO em concentração de 300 μ M DMSO e diluídas para se obter 30 μ M em n-octanol:DMSO (9:1). Em seguida, misturas heterogêneas foram feitas com 750 μ l da solução previamente preparada em n-octanol e 750 μ l de tampão fosfato (pH = 7,4) em um microtubo de 2 ml. Após o período de incubação de 24 h a 37 °C sob agitação a 500 rpm utilizando o Termo-ShakerAgmaxx modelo AG-100 as amostras foram analisadas em triplicata utilizando espectrofotômetro UV-vis Shimadzu em uma concentração de aproximadamente 1,15 μ M (concentração inicial dos compostos ($[n\text{-Oc}]_{\text{inicial}}$)). Depois foram feitas curvas analítica com sete pontos na faixa de concentração entre 0,2 – 1,8 μ M com as soluções estoque em n-octanol.

A partir das equações de primeiro grau obtidas com as regressões lineares, foram verificadas as concentrações dos compostos em n-octanol após incubação ($[n-Oc]_{final}$). E utilizando a EQUAÇÃO 3.3, foi verificado a quantidade dos compostos em tampão fosfato, $[PBS]$:

EQUAÇÃO 3.3 -Cálculo para obtenção da concentração dos compostos em fase aquosa, em que $[n-Oc]_{inicial}$ é a concentração adicionada antes da incubação, $[n-Oc]_{final}$ e $[H_2O]$ as concentrações dos compostos na fase lipofílica e aquosa, respectivamente.

$$[n - Oc]_{inicial} = [n - Oc]_{final} + [PBS]$$

A lipofilicidade ($\log P$) dos compostos foram calculadas dividindo a concentração de composto em n-octanol pela concentração em tampão fosfato e aplicando o logaritmo de P na base 10, EQUAÇÃO 3.4:

EQUAÇÃO 3.4 - Cálculo do logaritmo do coeficiente de partição, em que $[n-Oc]_{final}$ e $[PBS]$ as concentrações dos compostos na fase lipofílica e aquosa, respectivamente.

$$\log P = \log \frac{[n - Oc]_{final}}{[PBS]}$$

3.5.4 – Estudo de fotoestabilidade

Os experimentos de fotoestabilidade foram realizados em acetona, em concentração de composto de 1,0 μM . A radiação eletromagnética utilizada foi de LED em 415 nm. O tempo de exposição máximo foi de 15 min adquirindo um espectro a cada 1 minuto. As medidas foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC.

3.6 – Ensaios biomoleculares

Nessa subseção serão descritos os procedimentos de titulação espectrofotométrica, supressão de fluorescência de ct-DNA/ Hoechst e ct-DNA/ laranja de tiazol, medidas de viscosidade, mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19, dicroísmo circular interação e interação com a guanosina por ressonância magnética nuclear para os compostos sintetizados.

3.6.1 – Interação com DNA

3.6.1.1 – Interação com ct-DNA por titulação espectrofotométrica

Para realizar o teste de interação com DNA, primeiramente, foi preparada uma solução tampão Trizma (Tris-HCl 84,0 mM; 16,0 mM de Tris-base, pH = 7,4; procedência Sigma-Aldrich®) em temperatura ambiente. Nesse trabalho foi utilizada uma solução estoque de DNA do timo de bezerro (*calftymus* / ct-DNA, procedência Sigma-Aldrich®) 0,5 mg mL⁻¹ preparada na solução tampão Trizma em temperatura ambiente. Antes do procedimento a solução foi estocada em geladeira a aproximadamente 4 °C para evitar degradação da biomolécula e verificado a razão da absorbância comprimentos de onda 260 e 280 nm (A_{260} / A_{280}) acima de 1,8 indicando que o ct-DNA está com a quantidade aceitável de proteínas contaminantes que podem prejudicar a interação com os compostos estudados. Para determinar a concentração molar de ct-DNA na solução, foi utilizado a absorvidade molar ($\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$) relatada pela literatura⁸¹. Após obter a concentração através da Lei de Lambert-Beer, EQUAÇÃO 3.5, a solução foi diluída para 1,0 mM.

EQUAÇÃO 3.5 - Equação de Lambert-Beer, em “A” é a absorbância, “l” o caminho ótico, “ ϵ ” a absorvidade molar e “c” a concentração da espécie química.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A constante de ligação (K_b) foi calculada utilizando a técnica de titulação espectrofotométrica, a partir da EQUAÇÃO 3.6. Para a realização desse experimento, foram preparadas soluções estoque das porfirinas tetracatiônicas na concentração de 0,3 mM em DMF. Em seguida, foi adicionado à cubeta de quartzo (3,00 mL) 40 μ L da solução estoque de composto, tampão Trizma e DMF (4:1) para completar 2,00 mL, obtendo a concentração final de composto de 6,0 μ M. Os espectros foram obtidos adicionando à cubeta de trabalho ct-DNA afim de que a razão $[DNA]/[composto]$ estivesse entre 0,1 – 2,0. Durante a obtenção dos espectros, o branco apresentava a mesma concentração de ct-DNA para evitar possíveis erros. Nesse experimento as bandas Soret das porfirinas foram escolhidas para monitorar a interação com a biomolécula.

EQUAÇÃO 3.6 - Equação de Benesi-Hildbrand, em que $[DNA]$ é a concentração adicionada de DNA, $\varepsilon_A = A_{obs}/[complexo]$, ε_f é o coeficiente de absorvidade molar do composto livre e ε_b é o coeficiente da absorvidade molar do composto ligado ao DNA.

$$\frac{[DNA]}{\varepsilon_A - \varepsilon_f} = \frac{[DNA]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

Além da constante de ligação, foram calculados o efeito de batocromismo pela diferença entre os comprimentos de onda da banda Soret sem a adição de ct-DNA e após a adição na concentração máxima de DNA, R_i igual a 2,0, seguindo a EQUAÇÃO 3.7:

EQUAÇÃO 3.7 - Quantificação do efeito de batocromismo ($\Delta\lambda_{max}$), onde λ_0 e λ_f é o comprimento de onda da absorção máxima da banda analisada do composto e da maior concentração de ct-DNA na interação, respectivamente.

$$\Delta\lambda_{max} = |\lambda_f - \lambda_0|$$

A quantificação do hipocromismo em porcentagem foi determinada pela EQUAÇÃO 3.8.

EQUAÇÃO 3.8 - Porcentagem de hipocromismo, em que A_0 e A_f é a absorbância máxima do composto e a absorbância máxima da maior concentração de DNA na interação, respectivamente.

$$Hipo(\%) = \left| \frac{A_0 - A_f}{A_0} \right| \times 100\%$$

3.6.1.2 – Ensaio de supressão de fluorescência do complexo ct-DNA - Hoechst 33342 ou laranja de tiazol

Os ensaios de supressão de fluorescência das sondas Hoechst 33342 (H) ou Laranja de tiazol (TO - do inglês *tiazol orange*) com ct-DNA foram realizados para as porfirinas tetracatiônicas e o complexo Mim sintetizados nesse trabalho.

Primeiramente, foram preparadas soluções 1,0 mM estoques de ct-DNA, sua pureza foi verificada pelo UV-vis seguindo a metodologia descrita na seção 3.6.1.1. Em seguida, foram preparadas as soluções estoques das sondas. Para o Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®) foi pesado 1,0 mg e dissolvido em 1,5 mL de água, a concentração da solução foi verificada por espectroscopia na região do UV-vis pela absorvidade molar ($\epsilon = 46000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda = 344 \text{ nm}$) em água e diluída para obter uma concentração de 0,6 mM. O mesmo procedimento foi realizado para o laranja de tiazol porém a concentração foi verificada pela absorvidade molar ($\epsilon = 59000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda = 502 \text{ nm}$) em água.

Após esse processo, foi preparada uma solução contendo ct-DNA (100,0 μM), Hoechst 33342 ou laranja de tiazol (5,0 μM) em tampão Trizma formando as respectivas soluções DH e DTO. Em seguida, foram adicionados 800 μM das respectivas soluções dos complexos DNA-sonda em microtubos de 1,5 mL e adicionado os compostos nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 μM dos compostos estudados, proporcionando um volume final de 1,0 mL,

contendo 20% de DMF. Essas soluções foram incubadas no Sheiker por 20 minutos com 1000 rpm.

As medidas foram realizadas no fluorímetro Synergy/H1-Biotek em triplicatas em uma placa de 96 poços com borda preta. Os espectros de emissão foram obtidos na faixa de 350-660 nm e comprimento de onda de excitação de 340 nm, em temperaturas de 25, 30 e 37 °C.

3.6.1.3 – Medidas de viscosidade relativa

Primeiramente, para a realização dos experimentos a solução de ct-DNA foi verificada sua pureza e concentração de acordo com a metodologia descrita na seção 3.6.1.1. As soluções para os ensaios de viscosidade foram preparadas a partir de soluções estoques de ct-DNA com concentração de 1,0 mM solubilizado em tampão Trizma; os compostos PRAP e composto mimético foram preparados em DMF em concentrações de 0,6 mM e 2,4 mM, respectivamente. Para os complexos PRAP os tempos de escoamento foram medidos na concentração fixa de ct-DNA em 80,0 μ M com variação das concentrações dos compostos de 0-24 μ M, a fim de obter razões molares [PRAP]/[ct-DNA] entre 0-0,3 variando em 0,05. Para o complexo Mim, a concentração de ct-DNA permaneceu em 80,0 μ M, porém sua concentração variou entre 0-96 μ M, obtendo razões molares entre 0-1,2, variando em 0,2. Os experimentos foram realizados com 20% de DMF.

Após a etapa de preparo das soluções, foi utilizado uma solução de ensaio de 4,0 mL e o tempo de escoamento foi aferido em um viscosímetro de Ostwald (Aldrich), com auxílio de um cronômetro digital. A temperatura de ensaio foi controlada em $(25 \pm 0,2)$ °C pelo acoplamento do viscosímetro a um banho termostático. Os tempos de escoamento foram medidos em cinco repetições e utilizado o valor médio para calcular as viscosidades relativas calculadas a partir da EQUAÇÃO 3.9. Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. [complexo]/[ct-DNA].

EQUAÇÃO 3.9 - Viscosidade relativa de acordo com o tempo de escoamento, em que: t_0 é o tempo de escoamento da solução de tampão Trizma:DMF (4:1); t_{DNA} é o tempo de escoamento de ct-DNA em Trizma:DMF (4:1); t é o tempo de escoamento da solução complexo/ct-DNA em Trizma:DMF (4:1). Os dados foram apresentados graficamente como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. [complexo]/[ct-DNA], onde η é a viscosidade do ct-DNA na presença dos complexos e η_0 é a viscosidade do DNA na ausência de complexo.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{(t_{DNA} - t_0)}$$

3.6.1.4 – Mobilidade eletroforética em gel de agarose com plasmídeo pUC19

Os testes de interação com o plasmídeo pUC19 de procedência da Thermo Fisher Scientific® derivado da *Escherichia coli* com o tamanho de 2686 bp. Para realizar esse experimento, os complexos foram solubilizados em DMF, em seguida, em um microtubo de 1500 μ L livre de DNase e RNase foram adicionados 3 μ L dessas soluções, 26,5 μ L de água deionizada e 0,5 μ L do plasmídeo totalizando assim um volume de 30 μ L, obtendo concentrações finais dos compostos de 0,1; 1,0 e 10,0 μ M. Para o complexo mimético (Mim) as concentrações são quatro vezes as utilizadas para os complexos derivados das porfirinas, ou seja 0,4; 4,0 e 40,0 μ M. As soluções então foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o tempo transcorrido as amostras foram retiradas do banho termostático, foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos e adicionou-se 15 μ L de STEB (40% de sacarose, 100 mM de tris-HCl, pH = 7,5; 1 mM de EDTA; 0,5 mgmL⁻¹ de azul de bromofenol). Em seguida 20 μ L das amostras foram adicionadas nos respectivos poços do gel de agarose 1%, que foi preparado previamente com 525 mg de agarose e 53 mL de TBE 1x. A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 60 V durante 120 minutos, após esse período o gel foi adicionado em solução corada de brometo de etídio e revelado no

fotodocumentador Gel DocTM EZ, a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLabTM 6.0.0 fornecido pela BioRad.

Os ensaios de fotoclivagem foram realizados sob as condições de corrida eletroforética semelhantes aos ensaios de mobilidade do pUC19, com exceção da forma de incubação, que foi realizada em uma placa de 96 poços livre de DNase e RNase. Os compostos foram incubados por 10 minutos, em seguida, a placa foi irradiada por 10 minutos utilizando luzes de LED com comprimento de onda igual a 415 nm. Para esse ensaio, as concentrações utilizadas foram de 0,1; 0,5 e 1,0 μM para os compostos derivados das porfirinas e em 0,4; 2,0 e 4,0 μM para o complexo Mim.

3.6.1.5 – Interação com ct-DNA por dicroísmo circular

O ensaio de interação com ct-DNA por dicroísmo circular foi realizado a partir de soluções estoques de complexos na concentração de 0,6 mM em DMF e ct-DNA 1,0 mM em tampão Trizma (Tris-HCl 84,0 mM; 16,0 mM de Tris-base, pH = 7,4). Em seguida, em um microtudo de 2 mL foram adicionados volumes apropriados de ct-DNA para obter 80,0 μM em tampão Trizma e variado a razão molar entre 0-0,3 e 0-1,2 para as porfirinas catiônicas e para o complexo mimético, respetivamente, a fim de obter um volume total de 2 mL e 20% de DMF. As amostras foram incubadas por 16 h e analisadas no espectrômetro de dicroísmo circular JASCO J-815 disponível no laboratório de Biofísica e Espectroscopia (IFSC-USP). Os espectros foram adquiridos a 25 °C, em um intervalo de 500-220 nm, largura de banda 1 nm, velocidade de escaneamento de 200 nm/min, modo de escaneamento contínuo e acumulação de 5 espectros.

3.6.1.6 – Interação com guanosina

Os ensaios de interação com guanosina foram realizados por espectroscopia de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ utilizando os compostos H₂P, H₂P2 e Mim.

Inicialmente, os compostos de interesse foram pesados e solubilizados diretamente no tubo de RMN em 450 μL de acetona- d_6 , obtendo-se soluções a concentrações de 2,0 mM para as porfirinas tetracatiônicas e 8,8 mM para o complexo Mim. Paralelamente, foram preparadas duas soluções de guanosina em DMSO- d_6 , com concentrações de 9,0 mM e 13,2 mM, para experimentos com as porfirinas tetracatiônicas e o complexo Mim, respectivamente. A partir dessas soluções, alíquotas de 50 μL foram adicionadas aos experimentos correspondentes, de forma a obter proporções molares de 1:5 para as porfirinas e 1:1,5 para o complexo Mim, bem como proporções volumétricas de acetona- d_6 :DMSO- d_6 de 9:1. Os ensaios foram monitorados em diferentes intervalos de tempo, com registros realizados nos períodos de 0, 24 e 48 horas.

3.7 – Ensaios celulares

3.7.1 – Cultivo celular

As células das linhagens A2780 (carcinoma de ovário humano) e MRC-5 (humana não tumoral de pulmão) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (do inglês Roswell Park Memorial Institute) e Dulbecco Modificado (DMEM, do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium), respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês fetal bovine serum). As linhagens celulares foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 .

3.7.2 – Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados gentilmente pelo Dr. Marcos Vinícius Palmeira Mello. A citotoxicidade dos compostos foi determinada empregando-se o ensaio alamar blue. Inicialmente, as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração celular e, em seguida, semeadas em placas de cultura de 96 poços ($1,5 \times 10^4$ células/poço, 150 μL /poço)

e posteriormente armazenadas em estufa (37 °C e 5% CO₂) durante 24 h para a adesão celular. Após este período, os compostos foram adicionados (0,75 µL em DMSO), e a placa foi mantida em estufa por mais 48 horas. Em seguida, foi adicionada uma solução de resazurina em meio de cultura (0,312 mg mL⁻¹, 20 µL/poço), e as células foram incubadas na estufa (37 °C e 5% CO₂) por mais 4 horas. Para os experimentos com luz, as placas de 96 poços foram inicialmente semeadas e incubadas por 24 h. Após este período, os compostos foram adicionados e a placa foi mantida em estufa por 6, 12, ou 24 h (37 °C e 5% CO₂). O meio de cultura foi substituído por um novo meio sem o corante vermelho de fenol, e a placa foi irradiada por 5 minutos ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm⁻², 9 J cm⁻²) e armazenada na estufa por mais 42, 36, ou 24 h, na ausência de luz. Em seguida, foi adicionada uma solução de resazurina em meio de cultura (0,312 mg mL⁻¹, 20 µL/poço), e as células foram incubadas na estufa (37 °C e 5% CO₂) por mais 4 horas. Em todos os experimentos, o sinal de fluorescência da resazurina foi registrado em espectrofotômetro/fluorímetro Synergy/H1-Biotek ($\lambda_{\text{ex}}: 540 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}: 590 \text{ nm}$). As células do controle negativo receberam somente 0,5% de DMSO. Os resultados foram tratados utilizando o software GraphPad Prism 8, e os valores de IC₅₀ calculados através de regressão não linear e reportados como média ± desvio padrão.

3.7.3 – Ensaio de espécies reativas de oxigênio utilizando DCFH-DA

O ensaio de espécie reativas de oxigênio foi realizado pelo Dr. Marcos Vinícius Palmeira Mello. As células A2780 foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração celular e, em seguida, semeadas em placas de cultura de 96 poços de fundo preto (1,0 × 10⁴ células/poço, 150 µL/poço) e posteriormente armazenadas em estufa (37 °C e 5% CO₂) durante 24 horas para a adesão celular. Após este período, 0,75 µL do complexo H₂P em DMSO (0,04 µM) foi adicionado, e a placa foi mantida em estufa por 12 horas. Em seguida, a

placa foi irradiada por 5 minutos ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) e armazenada na estufa por mais 12 horas, na ausência de luz. Após o tempo de tratamento foram adicionados 100 μL do marcador DCFH-DA (10 μM) em cada poço e a placa foi incubada por mais 30 minutos à 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas duas vezes com 100 μL de PBS. Imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência CELENA® Digital Imaging System (Logos Biosystems) e a leitura da placa foi realizada em espectrômetro de fluorescência Synergy/H1 (Biotek – Winooski, VT, USA), em comprimento de onda de excitação 485 nm e emissão 528 nm. As medidas foram realizadas em duplicata, e como controle negativo e positivo, foram adicionados PBS e H_2O_2 , respectivamente.

3.7.4 – Ensaio de morfologia celular

Os ensaios de morfologia celular foram realizados encarecidamente pela MSc. Tamara Teixeira. O ensaio morfológico foi realizado com a linhagem A2780 ($1,5 \times 10^4$ células/poço) que foi adicionada em uma placa de 96 poços. Após 24 horas, o composto H_2P foi adicionado em diferentes concentrações e possíveis alterações morfológicas foram monitoradas nos períodos de 0, 24 e 48 horas, com o auxílio de um microscópio CELENA® (Logos Biosystems). Já o experimento de morfologia com fotoativação foi realizado em um tempo de incubação de 24 horas da adição do composto, após esse período houve a retirada do meio de cultura e adição de um novo meio sem fenol. Em seguida, ocorreu a irradiação (5 min, $\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). Após 48 horas do tratamento, o marcador fluorescente PI (do inglês, *propidium iodide*) (200 μL , 300 nM) foi adicionado para observar indícios de morte celular. O ensaio de morfologia celular foi realizado 48 horas após a irradiação, em seguida as células foram fixadas com metanol, posteriormente adicionou-se os marcadores *CellMask Green Plasma* (50 μL da solução de trabalho 1x) incubado por 5 minutos e lavado cuidadosamente com PBS. Em seguida, foi adicionado DAPI

(300 nM), incubado por 10 minutos e lavado cuidadosamente com PBS. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA[®] S (Logos Biosystems).

3.7.5 – Ensaio de morfologia celular em cultura 3D

Os ensaios de morfologia celular em cultura 3D foram conduzidos pela MSc. Tamara Teixeira. Para isso, foi utilizando o Kit Bioprint de 96 poços da tecnologia de Cultura Celular 3D Magnética (m3D). Na preparação do experimento, 150 µL de uma solução contendo nanopartículas (NanoShuttle-PL) foram adicionados a uma garrafa de 25 cm² com a linhagem celular A2780, para magnetizar as células. Após 24 horas, as células foram tripsinizadas, contadas para ajuste da concentração celular e, em seguida, semeadas em uma placa de cultura repelente de 96 poços (1.500 células/poço). A placa foi colocada sob drivers magnéticos para induzir a formação de esferoides via forças magnéticas dos ímãs. Em seguida, a placa foi incubada (37 °C, 5% CO₂), monitorando-se a formação e o crescimento dos esferoides com o microscópio CELENA[®] S Digital Imaging System (Logos Biosystems).

Após a formação dos esferoides, diferentes concentrações do complexo foram adicionadas, e, após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por RPMI sem fenol. A amostra foi então irradiada com luz de LED (5 min, $\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). O efeito do composto sobre os esferoides foi monitorado ao longo de 8 dias. No último dia, os marcadores fluorescentes DAPI e PI foram adicionados para análise.

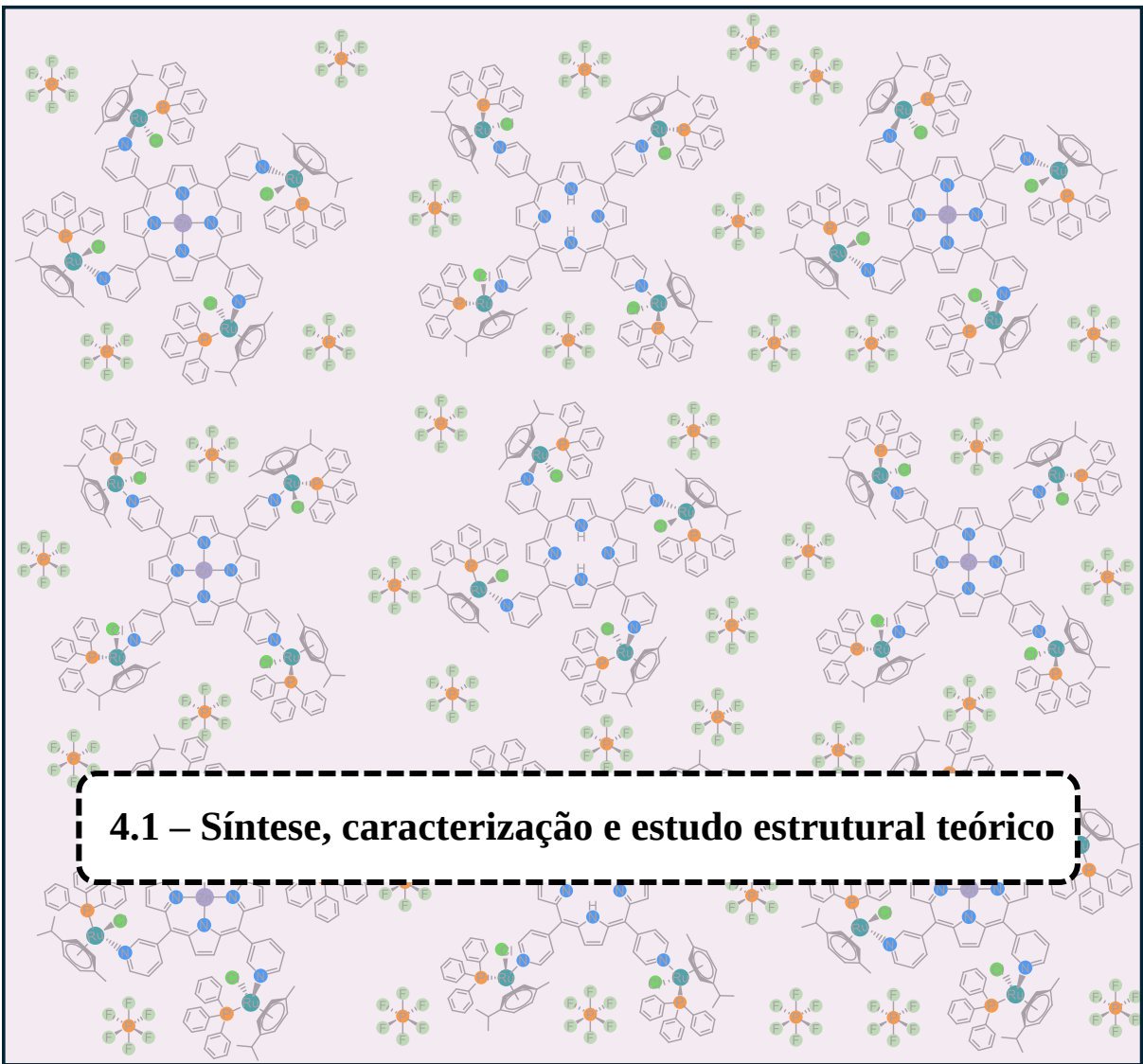
3.7.6 – Ensaio de morte celular por citometria utilizando Anexina V e 7-AAD

O ensaio de morte celular por citometria foi realizado pela Dra. Jocely de Lucena Dutra. Esse experimento foi realizado pela adição do complexo H₂P na linhagem celular A2780 quantificado o número de eventos por citometria

de fluxo utilizando o kit de detecção de apoptose PE-Anexina-V (BD Biosciences). As células foram semeadas em placas de 12 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e, após 24 horas de incubação para adesão, foram expostas a diferentes concentrações do complexo H₂P ($2 \times IC_{50} = 0,12 \mu\text{M}$; $IC_{50} = 0,06 \mu\text{M}$; $\frac{1}{2} \times IC_{50} = 0,03 \mu\text{M}$; $\frac{1}{4} \times IC_{50} = 0,015 \mu\text{M}$) por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por RPMI sem fenol, e as células foram irradiadas com luz de LED (5 min, $\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). Após incubação adicional no escuro por 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas com os marcadores PE-Anexina V (2,5 μL) e 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (2,5 μL) em 200 μL de tampão de ligação, por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as células foram coletadas com raspador, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 200 μL de tampão de ligação para análise em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10.000 eventos. A fluorescência foi quantificada utilizando o software CellQuest (BD Biosciences). O experimento foi realizado em triplicata e o controle negativo significa que as células foram tratadas com 0,5% de DMSO.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo tem como objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos para os compostos sintetizados, comparando-os com compostos análogos descritos na literatura. Para isso, o capítulo está organizado em três seções. A primeira, intitulada “Síntese, caracterização e estudo estrutural teórico”, abordará a síntese e caracterização dos compostos obtidos, além dos estudos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) realizados para uma compreensão teórica das estruturas dos compostos PRAP. A segunda seção, “Investigação do modo de interação com DNA”, discutirá os experimentos de interação com DNA e guanosina, buscando entender a relação entre as estruturas dos compostos e suas interações com a biomolécula de interesse. Por fim, a terceira seção, “Estudo físico-químico, fotoquímico e celular com ênfase em fotoativação”, analisará as propriedades luminescentes, estudos físico-químicos preliminares e a citotoxicidade dos compostos em células tumorais e não tumorais. Além disso, serão discutidos os resultados dos experimentos com radiação eletromagnética, com foco em sua aplicação na inativação fotodinâmica (PDI), como a fotoclivagem do plasmídeo pUC19 e a fototoxicidade dos compostos PRAP em células tumorais de ovário.

The background of the slide is a repeating pattern of various chemical structures. These include large, complex macrocyclic molecules with multiple nitrogen (blue) and oxygen (green) atoms, and smaller, simpler molecules like phosphorus pentachloride (PCl5) and phosphorus pentabromide (PBr5). The structures are rendered in a 2D line-art style with colored atoms.

4.1 – Síntese, caracterização e estudo estrutural teórico

Nesta seção, serão discutidos os procedimentos sintéticos utilizados para obtenção dos compostos analisados neste trabalho. Em seguida, serão descritas as caracterizações não-espectroscópicas, incluindo análise das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio, condutividade molar e espectrometria de massas. Serão também examinadas as caracterizações espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear (RMN), difração de raios-X, espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível e espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Por fim, serão discutidos os resultados obtidos das estruturas tridimensionais otimizadas por DFT.

4.1.1 – Síntese

Para a obtenção dos compostos PRAP, inicialmente foram sintetizados os complexos precursores. Especificamente, o complexo $\{[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})]_2(\mu\text{-Cl})_2\}$, referido como P1, foi obtido a partir da reação entre tricloreto de rutênio e α -felandreno, utilizando metanol como solvente, em condições de refluxo e atmosfera de argônio, FIGURA 4.1. Nessa reação, ocorre a redução do rutênio(III) para rutênio(II) e a oxidação de uma ligação saturada do anel cíclico presente no α -felandreno, resultando na formação do *p*-cimeno, um anel aromático substituído por grupos metil e isopropil em posições *para*. O complexo formado é um dímero de rutênio(II) que contém quatro ligantes cloreto, sendo dois em pontes e dois coordenados de forma monodentada ao centro metálico, além do ligante *p*-cimeno. Essa síntese, bem documentada na literatura, apresentou rendimento de 75%.

Em seguida, foi sintetizado o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$, denominado P2, a partir do complexo P1 e trifenilfosfina, ambos dissolvidos em metanol desaerado. A reação foi conduzida sob refluxo por 6 horas em atmosfera inerte de argônio. Esse procedimento permite obter dois mols do produto (P2) após a reação com trifenilfosfina, FIGURA 4.1.

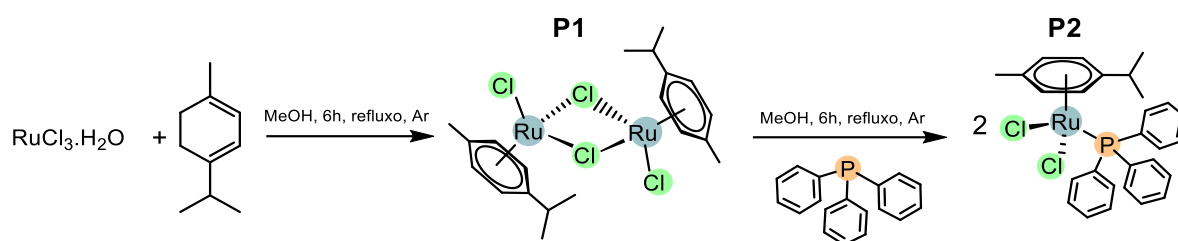


FIGURA 4.1 - Esquema reacional para a formação dos complexos precursores P1 e P2.

Conforme mencionado no Capítulo 2, a *meso*-tetra(4-piridil)porfirina foi adquirida comercialmente, enquanto a *meso*-tetra(3-piridil)porfirina foi sintetizada por meio da reação de Alder e Longo⁸². Esta reação envolveu quatro moléculas de 3-piridinacarboxaldeído e pirrol, na presença de ácido propiônico, que atuou simultaneamente como solvente e catalisador, resultando na formação da porfirina desejada. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo por 4 horas, conforme ilustrado no esquema reacional apresentado na FIGURA 4.2.

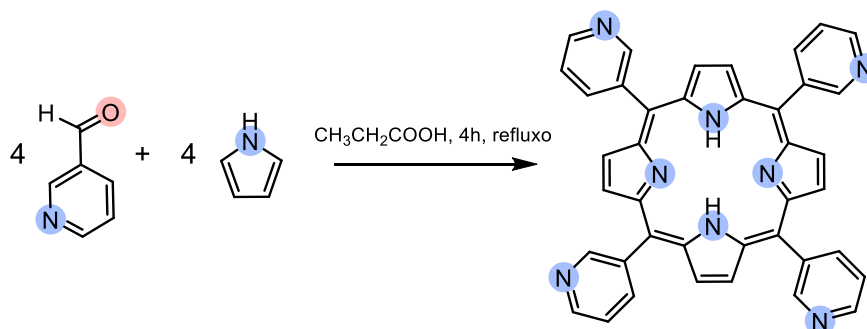


FIGURA 4.2 - Esquema reacional para a formação do ligante *meso*-tetra(3-piridil)porfirina.

Após a obtenção das porfirinas e dos precursores de rutênio(II), foram realizadas as primeiras tentativas de síntese das porfirinas tetracatiônicas de rutênio contendo areno e fosfina, a partir de agora referidas como PRAP. Inicialmente, tentativas foram feitas para sintetizar o composto H₂P sem o uso de sal de prata para a remoção dos ligantes cloretos do complexo P2. O espectro de

RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do composto sintetizado apresentou apenas um singleto, que, comparado ao precursor, apareceu em uma região mais desblindada do espectro, sugerindo a coordenação do nitrogênio do grupo piridil da porfirina ao centro metálico de rutênio. No entanto, o espectro de RMN de hidrogênio revelou sinais duplicados, atribuídos à presença de grupos piridil coordenados e não coordenados ao rutênio(II). Uma explicação para esse fenômeno é que, em uma reação em equilíbrio, após a primeira inserção de um centro de rutênio nos substituintes da posição *meso*, a incorporação dos centros metálicos subsequentes demanda maior energia. Esse processo gradual dificulta a obtenção direta do complexo tetracatiônico.

Com base nesses resultados, para deslocar o equilíbrio em direção à formação do produto desejado, foram testadas algumas estratégias, como o uso de excesso do precursor, aumento da temperatura e utilização de frasco Schlenk para elevar a pressão. No entanto, essas medidas não resultaram em uma redução significativa dos sinais duplicados observados no espectro. A utilização de sais de prata para abstração de haletos, levando à formação de haletos de prata (AgX), é uma estratégia comum em reações inorgânicas para deslocar o equilíbrio químico⁸³. Assim, a síntese do complexo H_2P foi realizada utilizando AgBF_4 . Dessa vez, observou-se a ausência de sinais duplicados, o que indicou uma maior pureza e confiabilidade do composto obtido, conforme as condições descritas no esquema reacional da FIGURA 4.3. Após a reação, e com a evaporação dos solventes, não foi possível obter um sólido, formava-se uma solução bastante concentrada. Então, verificou-se a necessidade de realizar a troca de contra-íon BF_4^- para PF_6^- . Com essa troca, foi possível realizar a precipitação de um sólido, que pudesse ser filtrado.

Na síntese da metaloporfirina de zinco(II), foi testada a reação direta da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina com $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em solução. No entanto, observou-se uma redução significativa na solubilidade do produto formado, possivelmente devido à formação de estruturas poliméricas. Esse comportamento

pode estar associado à coordenação dos grupos piridil ao zinco(II), que se estende para outros sítios de coordenação da porfirina e outros centros metálicos, gerando uma estrutura mais complexa e menos solúvel.

Diante dessa observação, utilizou-se o composto H_2P para a formação do complexo ZnP , FIGURA 4.3. Algumas modificações foram feitas nas condições sintéticas descritas na literatura⁸⁴, como o aumento do tempo de reação de 45 minutos para 2 horas e a redução da temperatura de 40 °C para ambiente, com acompanhamento da reação por espectroscopia na região do UV-vis. Essas condições mais brandas foram adotadas para evitar a labilização dos complexos de rutênio na periferia da porfirina.

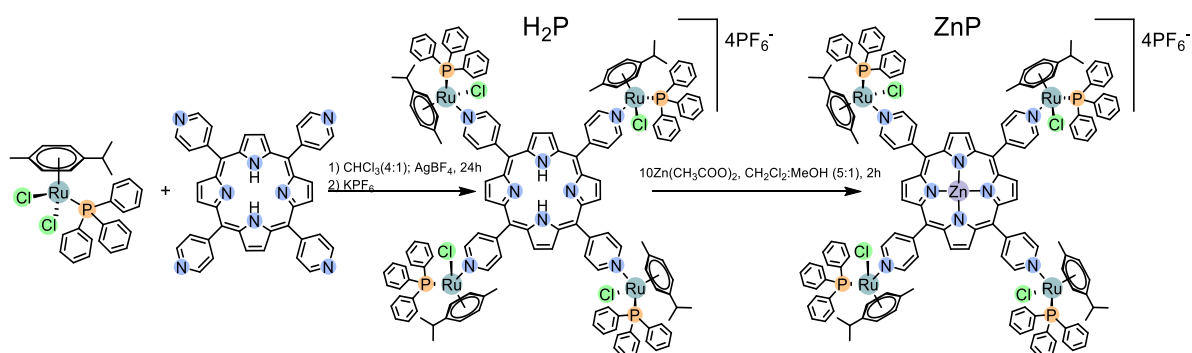


FIGURA 4.3 - Esquema reacional para a formação dos complexos H_2P e ZnP .

A síntese do complexo Mim foi realizada a partir da reação entre piridina e $P2$, ambos solubilizados em metanol e utilizando KPF_6 , conforme descrito na literatura⁸⁵. Todos os estudos de interação com DNA, estudos celulares e as caracterizações descritas neste trabalho foram realizados para os compostos que foram obtidos com sucesso nas sínteses desenvolvidas.

4.1.2 – Caracterizações não espectroscópicas

Após a síntese, os compostos apresentaram colorações distintas: marrom-avermelhada para H_2P e H_2P2 , verde-escura para o complexo ZnP , verde-acinzentada para $ZnP2$ e amarela para o complexo mimético. As análises

elementares dos compostos PRAP revelaram porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com desvios inferiores a 0,4%, TABELA 4.1. Todos os compostos demonstraram caráter eletrolítico, com condutividades variando entre 218,9 e 277,3 S m² mol⁻¹ para os compostos PRAP e 95,77 S m² mol⁻¹ para o complexo mimético, conforme detalhado nos anexos deste trabalho, TABELA 4.1.

TABELA 4.1 - Valores das porcentagens dos elementos C, H, N e condutividade molar em 10⁻³ mol L⁻¹.

Composto	%C	%H	%N	Condutividade molar (S m ² mol ⁻¹)
H ₂ P	54,98 (54,81)	4,59 (4,30)	3,45 (3,36)	260,3
ZnP	54,05 (53,79)	4,52 (4,16)	3,38 (3,30)	222,3
H ₂ P2	54,90 (54,81)	4,42 (4,30)	3,43 (3,36)	218,9
ZnP2	53,83 (53,79)	4,28 (4,16)	3,71 (3,32)	277,3
Mim	51,97 (52,34)	5,66 (4,53)	2,77 (1,85)	95,73

4.1.3 – Espectrometria de massas

A espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray (HRMS-ESI, do inglês *High-resolution Mass Spectrometry – Electrospray Ionization*) é uma técnica de grande utilidade para a caracterização de moléculas orgânicas, proteínas e compostos de coordenação^{86–89}. Com essa técnica, é possível determinar padrões isotópicos dos íons moleculares e analisar o perfil de fragmentação dos compostos a partir da relação massa/carga dos íons (m/z)⁸⁶.

Como mencionado anteriormente, as porfirinas estudadas são tetracatiônicas, o que é relevante para a espectrometria de massas, pois, devido à presença de múltiplas cargas, os íons podem apresentar relações massa/carga (m/z) menores que suas massas moleculares. Neste caso, foram observados íons moleculares contendo a porfirina, quatro periféricos de rutênio e dois contra-íons

hexafluorofosfato, formando adutos com carga 2^+ e aparecendo em aproximadamente 1520 e 1552 m/z para as porfirinas de base livre e para as metaloporfirinas de zinco(II), respectivamente. Esses íons são denominados $[M+2PF_6]^{2+}$, que contém como massa exata de 3040,77 e 3102,36 u para bases-livres e metaloporfirinas de zinco(II), respectivamente. As fórmulas moleculares dos adutos são: $Ru_4C_{152}H_{142}P_6Cl_4N_8F_{12}$ para as bases-livres e $ZnRu_4C_{152}H_{140}P_6Cl_4N_8F_{12}$ para as metaloporfirinas.

Para o complexo H_2P , foi observada uma pequena distorção no padrão isotópico de $[M+2PF_6]^{2+}$. O segundo pico mais intenso no padrão isotópico calculado corresponde ao pico base do padrão isotópico observado, FIGURA 4.4. Esse comportamento é comum em isótopos com abundâncias próximas, sendo que o pico base do padrão isotópico calculado apresenta 100% de abundância, enquanto o segundo isótopo mais intenso tem uma abundância de 99,1%.

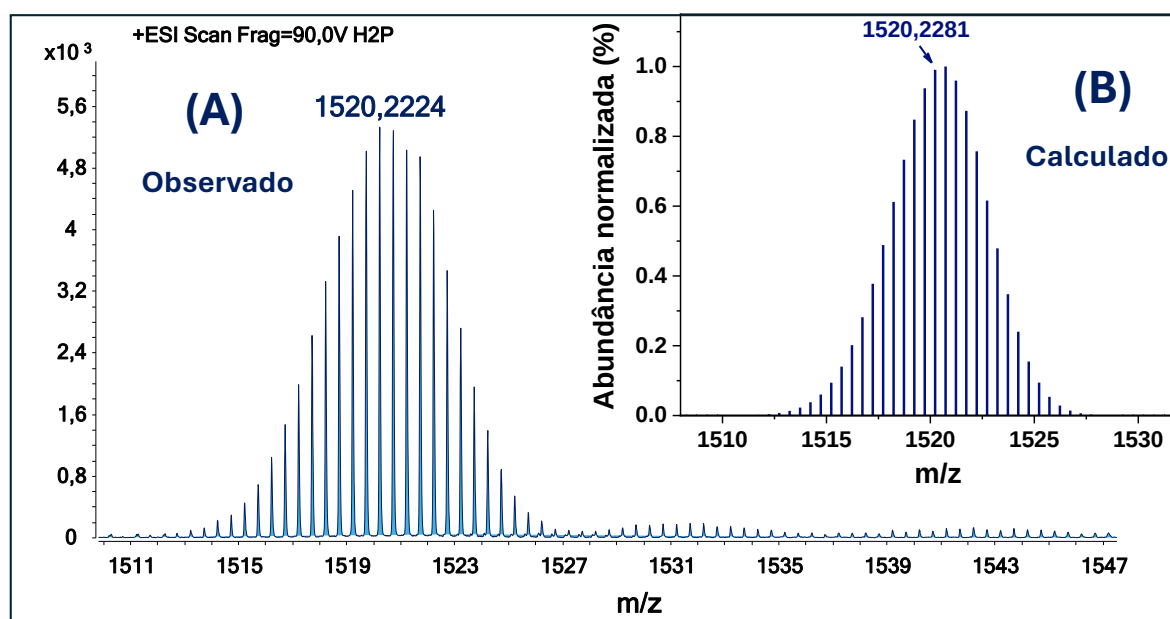


FIGURA 4.4 – Padrões isotópicos do espectro de massas (MS) para o íon-molecular $[M+2PF_6]^{2+}$ do composto H_2P : (A) experimental e (B) teórico.

Para o composto H_2P , foi realizado o experimento de MS/MS, que envolve uma segunda fragmentação de um íon selecionado. Neste caso, foi escolhido o pico base de $[M+2PF_6]^{2+}$ a 1520,2224 m/z . Foi observada a presença do íon a 533,0734 m/z , relacionado com o fragmento de rutênio coordenado ao p-

cimeno, cloreto e trifenilfosfina, FIGURA 4.5(A). Esse íon foi confirmado pelos padrões isotópicos observados e calculados, apresentados nas FIGURA 4.5(B) e 4.5(C), respectivamente.

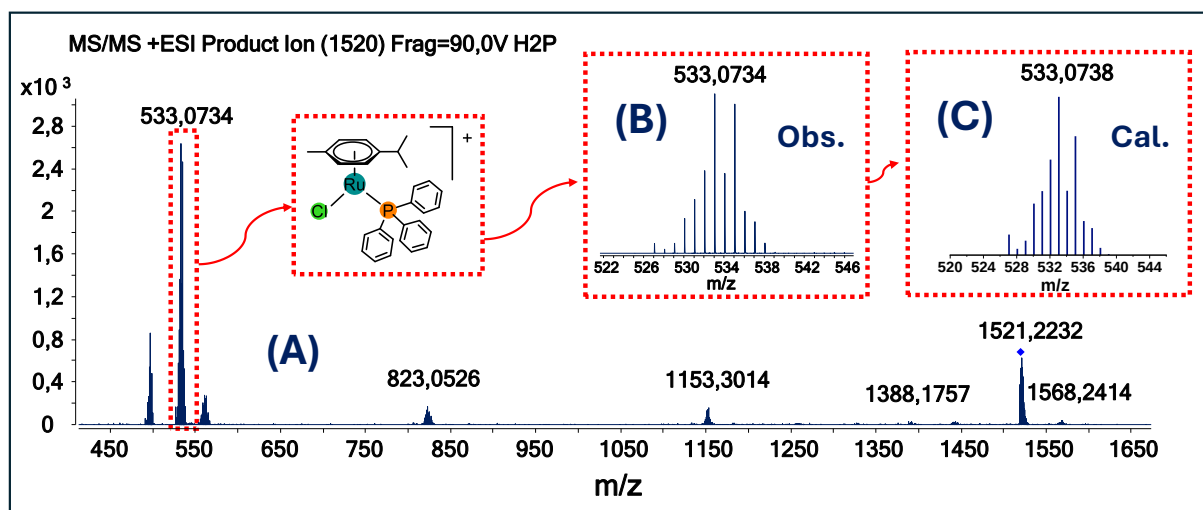


FIGURA 4.5 – Espectros de massas (MS/MS) para o composto H₂P: (A) experimental; (B) aproximação do padrão isotópico experimental para o íon contendo rutênio, areno e fosfina; (C) padrão isotópico teórico do íon em questão.

Para estabelecer a relação com a pureza dos compostos, é fundamental verificar o erro entre os íons dos padrões isotópicos calculados e observados. Nesse sentido, para os complexos H₂P, H₂P2, ZnP e ZnP2, foram observados erros de 3,7; 1,5; 4,3 e 2,1 ppm, respectivamente. Esses erros são considerados aceitáveis, pois são inferiores a 5 ppm. No entanto, os padrões isotópicos observados para os compostos ZnP e ZnP2 não apresentaram uma coincidência satisfatória, o que pode estar relacionado à fragmentação na fonte desses compostos. Dessa forma, a pureza foi confirmada pelos dados de análise elementar discutidos na seção anterior. Vale ressaltar que os padrões isotópicos dos compostos H₂P2, ZnP e ZnP2 estão disponíveis nos anexos.

4.1.4 – Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica essencial para a caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos. De forma simplificada, essa técnica baseia-se na aplicação de um campo magnético

externo, ao qual núcleos suscetíveis respondem alinhando seus spins nucleares de forma paralela ou antiparalela ao campo magnético⁸⁶. Posteriormente, uma radiação eletromagnética na faixa de radiofrequência é aplicada, promovendo a transição dos spins nucleares entre estados de energia devido à absorção de uma energia quantizada. Quando os spins retornam ao estado inicial em função do campo magnético aplicado, ocorre a liberação dessa energia, gerando sinais conhecidos como FID (*free induction decay*). Após a aplicação da transformada de Fourier, esses sinais são convertidos em um espectro de RMN, que fornece informações detalhadas sobre a estrutura molecular do composto analisado⁸⁶.

Diferentes núcleos, ao serem expostos a distintas densidades eletrônicas, sofrem variações no grau de blindagem devido ao ambiente químico em que se encontram. Como consequência, a quantidade de energia absorvida por cada núcleo varia, resultando em sinais diferenciados no espectro de RMN. Esses sinais são expressos numericamente em partes por milhão (ppm), correspondendo a 1 Hz em um campo de 100 MHz⁹⁰. A diferença entre o sinal de um núcleo e o sinal de referência é denominada deslocamento químico, que é um parâmetro importante para a interpretação dos espectros. Após essa introdução simplificada à técnica de RMN, torna-se possível compreender os termos e conceitos utilizados ao longo deste trabalho.

Os núcleos suscetíveis ao campo magnético são de spin nuclear fracionado, por exemplo: 1/2, 3/2, 5/2 e assim por diante. Se o isótopo apresenta um somatório de prótons e nêutron for ímpar, então esse núcleo é susceptível ao campo magnético promovidos pelo RMN⁸⁶. Os compostos sintetizados neste trabalho apresentam núcleos susceptíveis ao campo magnético como o isótopo de massa 1 do hidrogênio (^1H), o isótopo de massa 31 do fósforo (^{31}P) e o isótopo de massa 13 do carbono (^{13}C). Devido à abundância de átomos de hidrogênio nas moléculas analisadas, esses núcleos podem acoplar-se a outros, influenciando os espectros obtidos. Para evitar esse efeito nos experimentos envolvendo ^{31}P , foi

adotada a técnica de desacoplamento do ^1H , indicada pela notação $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, permitindo uma análise mais clara e simplificada das interações do fósforo.

Neste trabalho foi utilizado acetona- d_6 para aquisição dos espectros. Esse solvente apresenta sinais 2,02 e 2,80 ppm referentes à acetona residual e à água, respectivamente, nos espectros de RMN ^1H . Para o composto H_2P foi observado dois dubletos em 9,52 e 8,26 ppm atribuídos aos hidrogênios nas posições *orto* e *meta* dos grupos piridil da porfirina, FIGURA 4.6. Foi verificado dois singletos em 8,89 e -3,10 ppm referente aos hidrogênios β -pirrólicos e hidrogênios imínicos, respectivamente. Os hidrogênios imínicos em uma região negativas do espectro, está relacionada com o efeito anisotrópico presente em porfirinas, ou seja, na região interna da corrente de anel. Adicionalmente, uma vez que os hidrogênios β -pirrólicos estão na parte exposta da corrente de anel, esses sinais aparecem em regiões mais desblindadas do espectro de RMN ^1H .

Os hidrogênios referentes aos anéis aromáticos, presentes na fosfina, foram integrados em somente um ambiente químico, e atribuído como um multipletto entre 7,64-7,75 ppm. Eles aparecem entre as regiões mais blindadas quando comparado aos sinais referente à porfirina, com exceção dos imínicos, e regiões mais desblindadas, comparados aos sinais atribuídos ao areno. Ou seja, os hidrogênios da fosfina apresentam densidade eletrônica intermediária entre esses dois sistemas.

Uma evidência de coordenação do piridil no precursor é a duplicação dos sinais de hidrogênio referentes aos arenos, formando quatro dubletos em 6,37, 6,15, 6,08 e 5,80 ppm, FIGURA 4.6. É importante mencionar que quando comparado os sinais do *p*-cimeno coordenado com o *p*-cimeno livre, os sinais dos hidrogênios aparecem em regiões mais blindadas do espectro. Esse comportamento está relacionado com o mecanismo de retrodoação promovido pelo centro metálico de rutênio(II), após a coordenação com o ligante. Esse mecanismo enfraquece a ligação C—C presentes no areno, proporcionando um

aumento de densidade eletrônica no entre a ligação C—H, consequentemente um efeito de blindagem quando comparados ambos os sistemas.

O sinal dos hidrogênios alifáticos dos grupos arenos foi observado em 1,41 ppm, atribuído às posições **g**. Os outros sinais só foram atribuídos após a aquisição de mapas de contornos do tipo COZY.

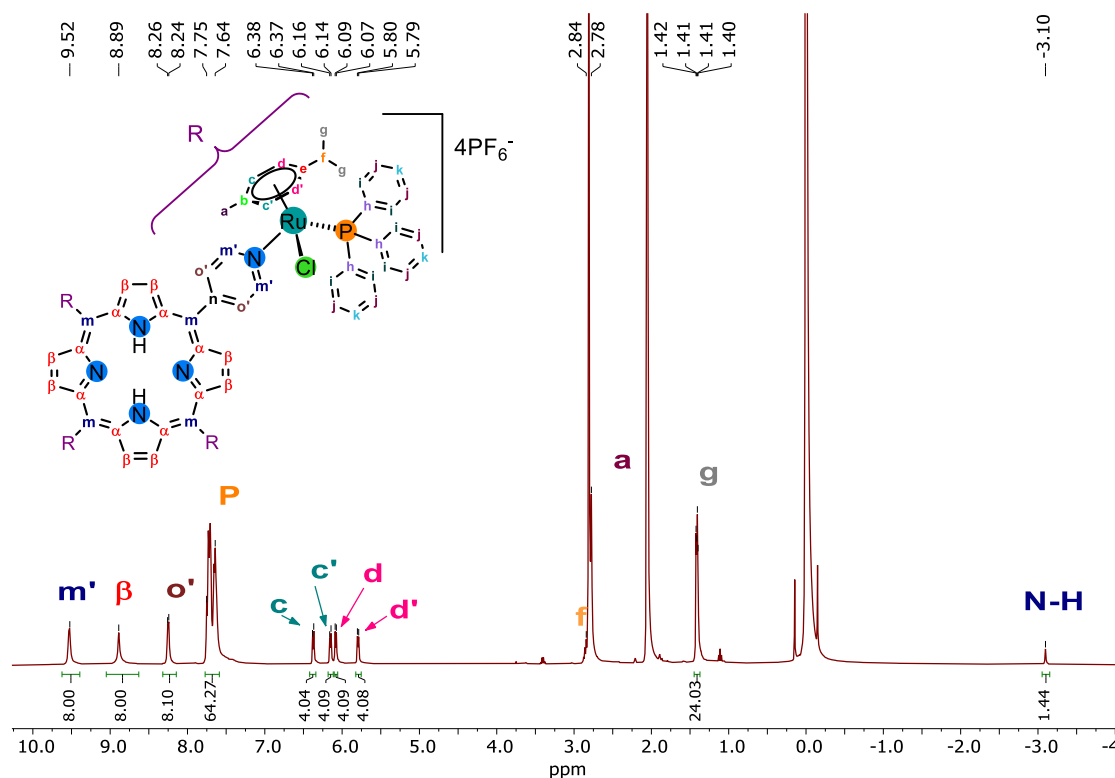


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ^1H para o composto H_2P em acetona- d_6 .

As atribuições dos sinais dos grupos arenos foram realizadas utilizando o experimento COSY, que fornece um mapa de contorno baseado na correlação homonuclear, neste caso, entre núcleos de ^1H - ^1H vicinais. Pelo experimento, os dubletos em 6,08 e 5,80 ppm atribuídos aos hidrogênios **d'** e **d** acoplam com seus respectivos pares em 6,37 e 6,15 ppm referentes aos hidrogênios **c'** e **c**, como mostra ampliação do quadrado cinza da FIGURA 4.7. A partir do mesmo experimento foi possível observar o acoplamento entre os hidrogênios referentes aos CH_3 nas posições **g** e um sinal sobreposto pelo sinal da

água, como observado pelo quadrado amarelo na FIGURA 4.7. Esse sinal foi interpretado sendo um septeto teórico, referente aos hidrogênios nas posições **f**.

Adicionalmente, foi verificado o acoplamento entre os hidrogênios **m'** e **o'** dos grupos piridil da 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina em 9,52 e 8,26 ppm, respectivamente, como mostra o quadrado azul da FIGURA 4.7. O hidrogênio na posição **m'** se difere do hidrogênio na posição **o'**, pois a posição **m'** está mais próximo ao nitrogênio do grupo piridil, que é um átomo mais eletronegativo. Uma vez que ocorre a retirada de densidade eletrônica do hidrogênio na posição **m'**, esse sinal é observado em regiões mais desblindadas do espectro de RMN ^1H .

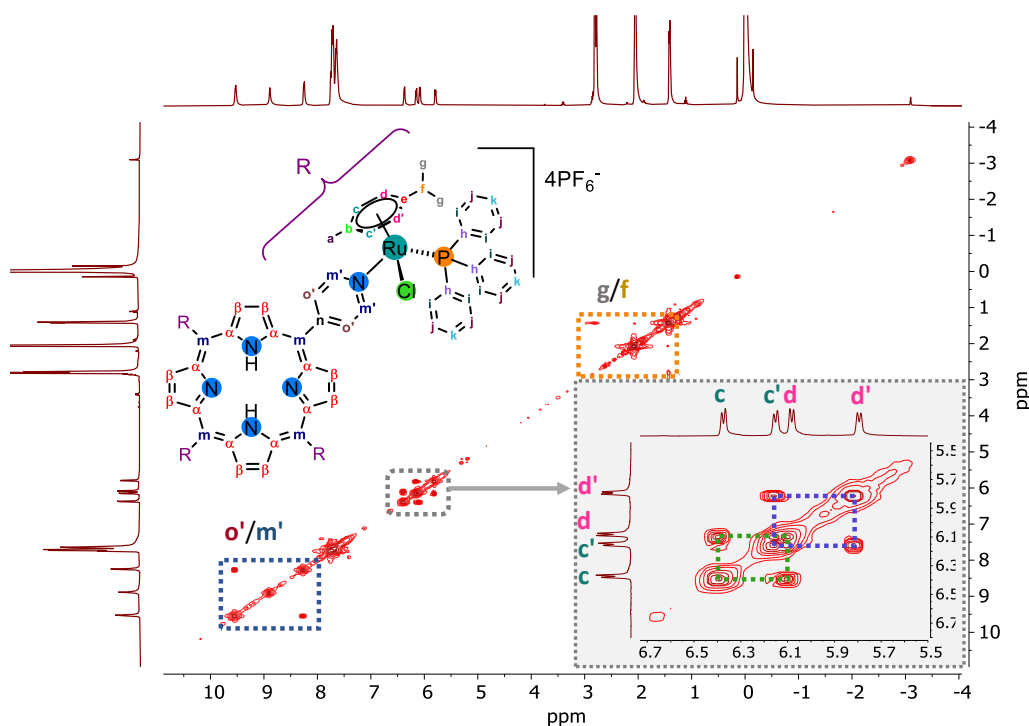


FIGURA 4.7 - Mapa de contorno de COZY para o complexo H₂P e ampliação da região referente aos hidrogênios aromáticos do areno em cinza.

A partir do mapa de contorno de COSY, os hidrogênios nas posições **a** foram os únicos não atribuídos, uma vez que eles não acoplam diretamente com outros hidrogênios. Então, recorreu-se ao experimento de HSQC, que está

relacionado ao mapa de contorno proveniente da correlação entre dois núcleos diferentes conectados por uma ligação, nesse caso ^1H - ^{13}C . Com este experimento, observou-se que o sinal residual da acetona acopla com dois carbonos distintos, em 29,8 e 17,3 ppm. Entretanto, ambos os acoplamentos não podem ocorrer, pois a acetona possui dois grupos CH_3 ligados a uma carbonila, que aparecem em 29,8 ppm no espectro de ^{13}C , FIGURA 4.8. Assim, concluiu-se que o sinal em 17,3 ppm no espectro de ^{13}C corresponde ao carbono CH_3 na posição **a**, confirmando que os sinais do solvente residual da acetona se sobrepõem aos dos hidrogênios nas posições **a**.

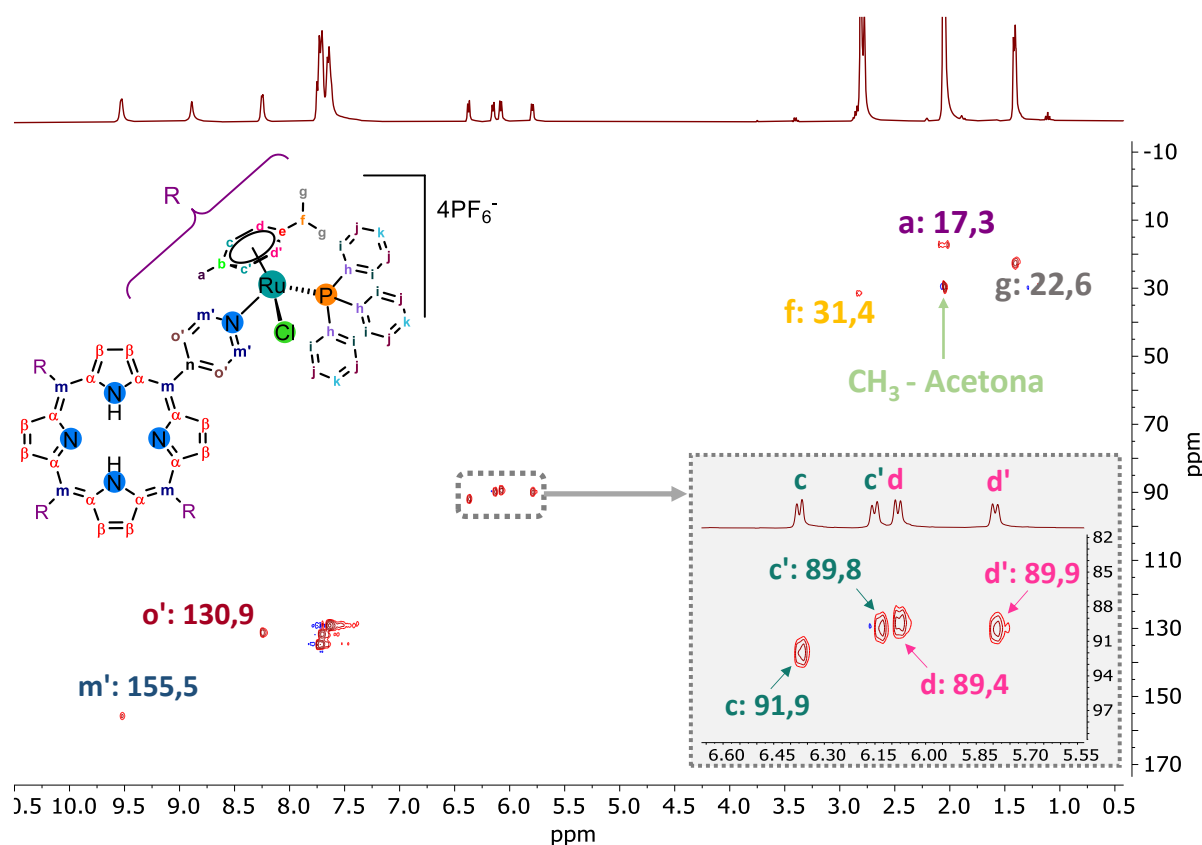


FIGURA 4.8 - Mapa de contorno de HSQC para o complexo H_2P e ampliação da região referente aos hidrogênios aromáticos dos arenos em cinza.

Para o complexo ZnP , foram observadas diferenças pouco significativas em relação aos hidrogênios do piridil, nas posições β -pirrólicas da porfirina, aos arenos e trifenilfosfinas em comparação com o complexo H_2P .

Porém, o desaparecimento do sinal em -3,10 ppm evidencia a coordenação do zinco(II) na cavidade da porfirina, FIGURA 4.9.

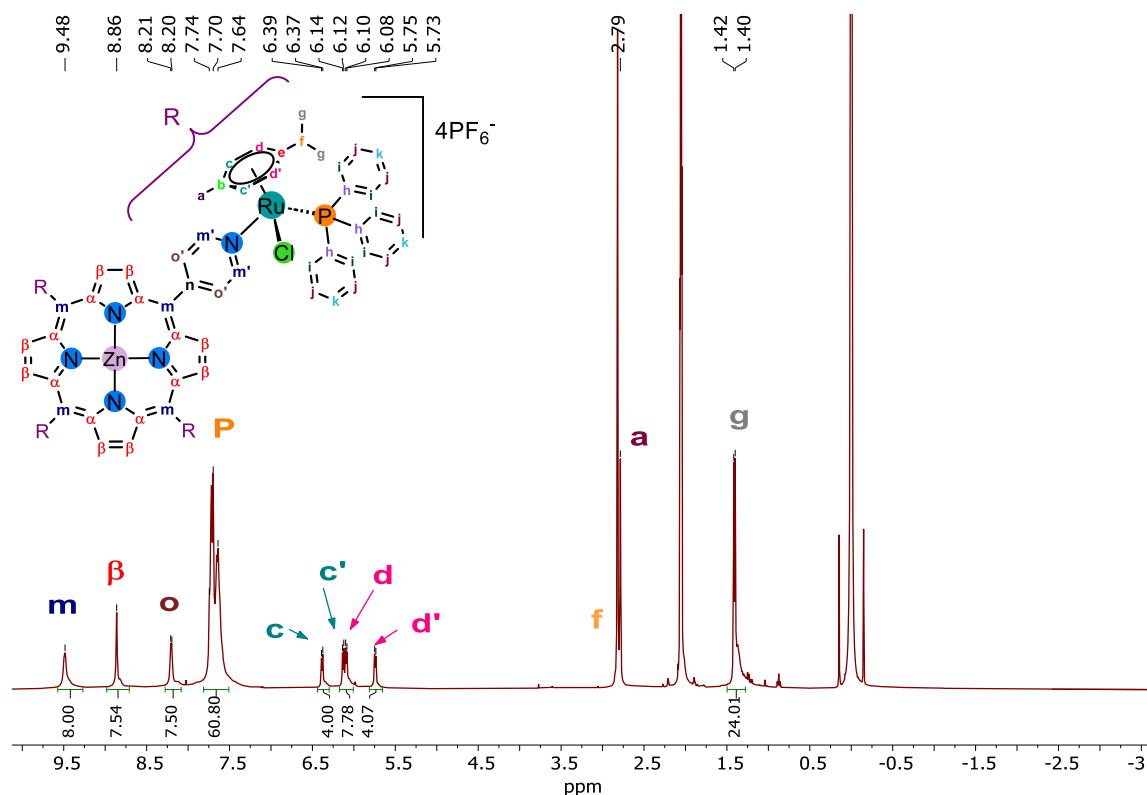


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ^1H para o composto ZnP em acetona- d_6 .

Na caracterização por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foi observado um singlete em 36,18 ppm e um septeto em -144 ppm atribuídos aos fósforos das fosfinas e dos contra-íons PF_6^- , respectivamente. Em comparação com o precursor, as fosfinas apresentam uma diferença de deslocamento químico de 11,6 ppm evidenciando a coordenação do 4-piridil do anel porfirínico ao centro metálico de rutênio(II), como mostra a FIGURA 4.10. O composto ZnP não demonstra diferença significativa no deslocamento químico dos átomos de fósforo presentes na estrutura quando comparado ao análogo H_2P .

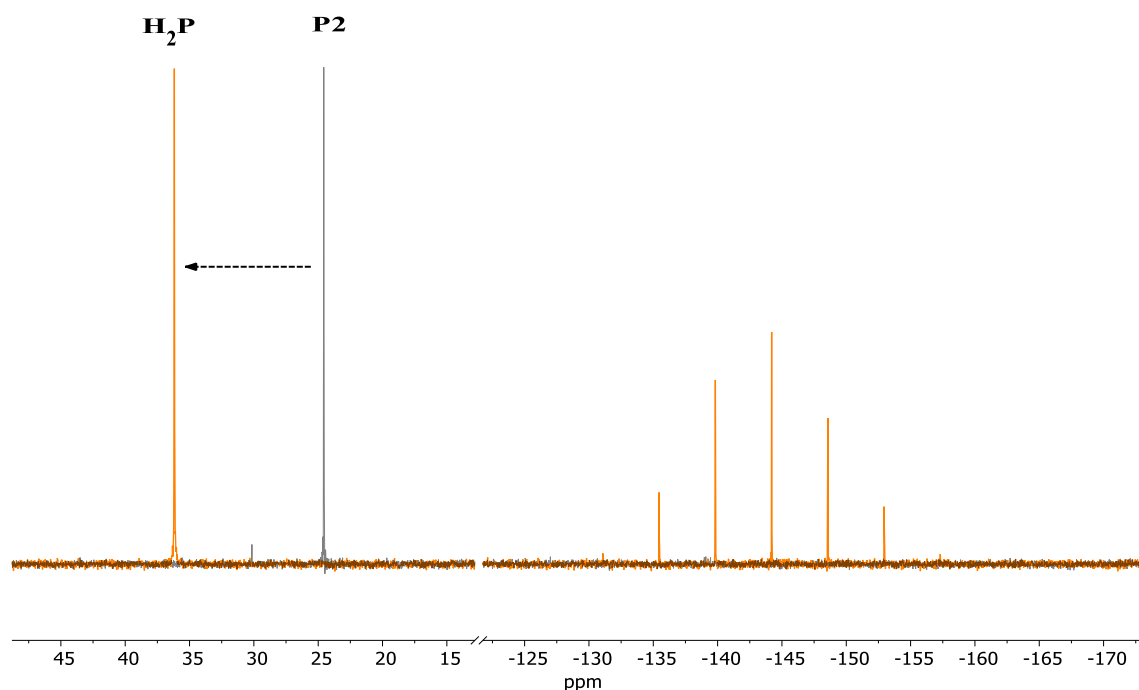


FIGURA 4.10 - Comparação entre os espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os compostos H_2P e $[\text{Ru}(\text{p-cim})(\text{PPh}_3)\text{Cl}_2]$ em acetona- d_6 .

Em relação aos espectros de RMN ^1H e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos derivados do ligante $\text{H}_2\text{T3PyP}$ ($\text{H}_2\text{P2}$ e ZnP2) foi observado a perda a multiplicidade dos sinais referentes a esses núcleos, FIGURA 4.11 e FIGURA 4.12. Esse comportamento pode estar relacionado o aumento do grau de liberdade de movimentação dos compostos após a coordenação com o precursor, conforme evidenciado pelas multiplicidades e integrais dos sinais dos hidrogênios referentes ao ligante $\text{H}_2\text{T3PyP}$, como mostra a FIGURA 4.13. Consequentemente, a presença de vários ambientes químicos devido à diminuição de simetria pode proporcionar a sobreposição de vários sinais, acarretando a diminuição da resolução do espectro de RMN ^1H , comparado aos espectros obtidos para os complexos derivados da $\text{H}_2\text{T4PyP}$.

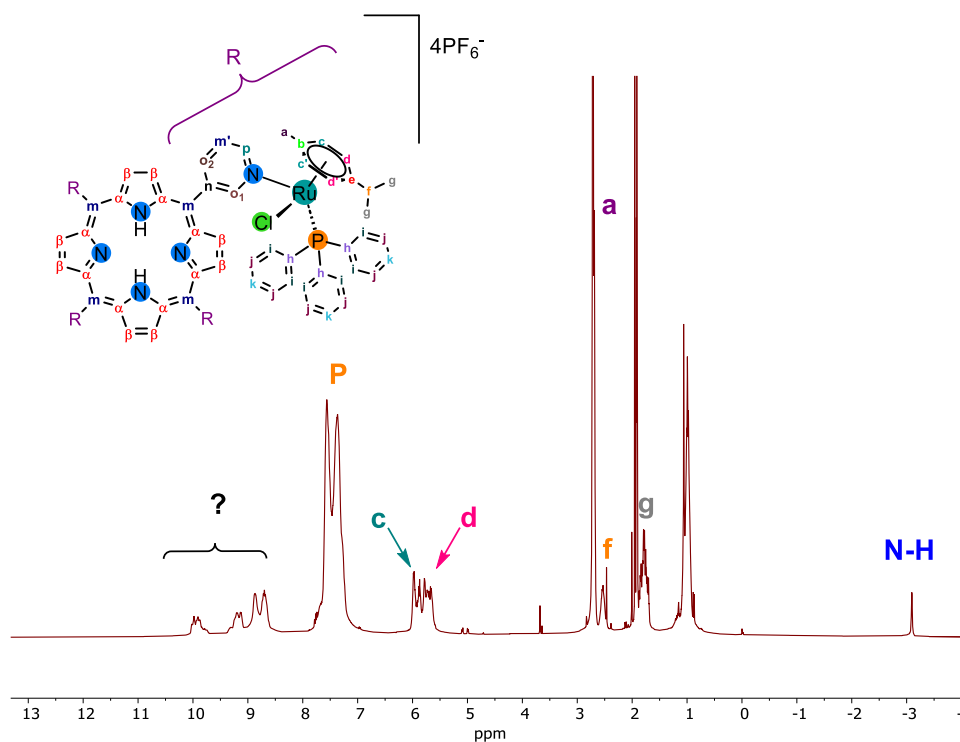


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN ^1H para o composto $\text{H}_2\text{P2}$ em acetona- d_6 .

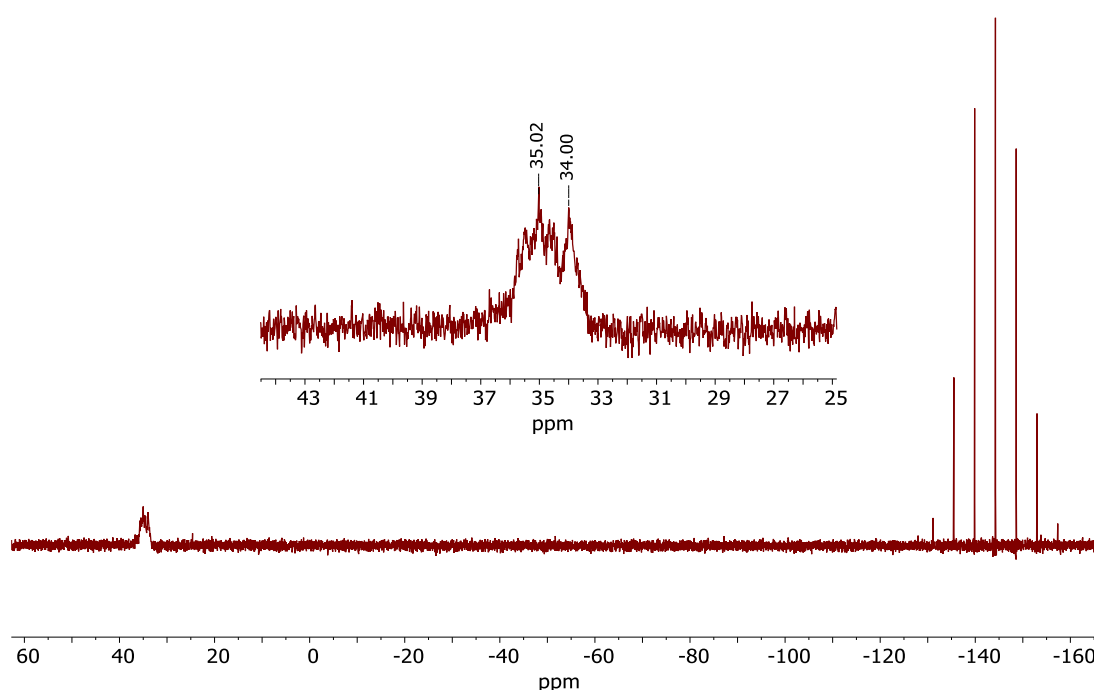


FIGURA 4.12 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o composto $\text{H}_2\text{P2}$ em acetona- d_6 .

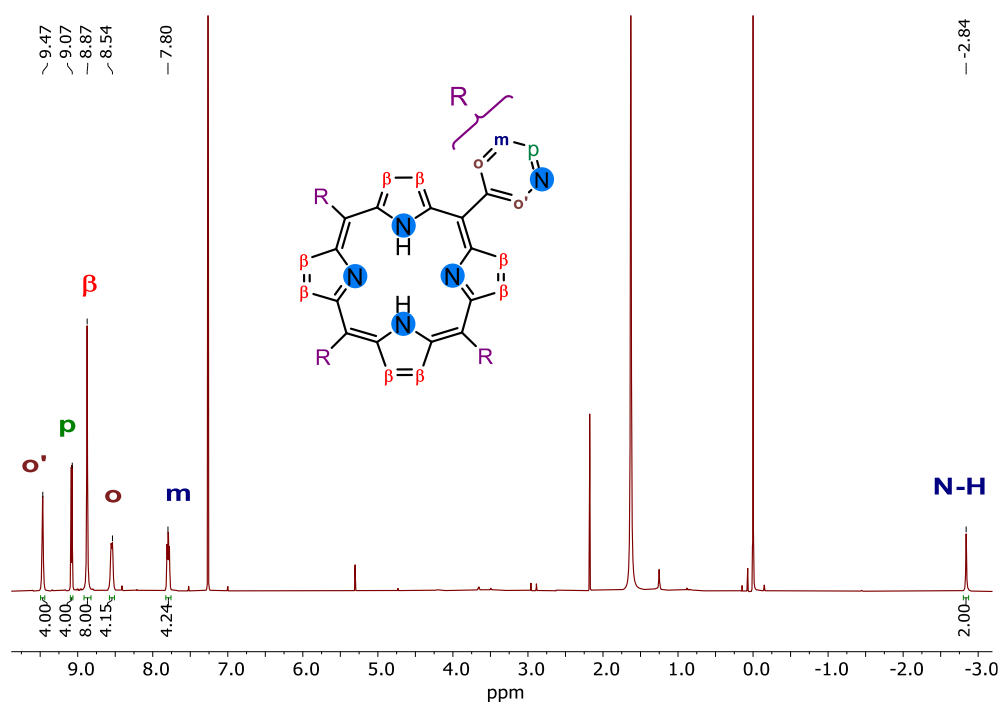


FIGURA 4.13 - Espectro de RMN ^1H para o composto $\text{H}_2\text{T3PyP}$ em CDCl_3 .

Embora, não seja possível atribuir os sinais dos hidrogênios para as porfirinas tetracatiônicas derivadas da $\text{H}_2\text{T3PyP}$, esse comportamento é importante para compreensão do sistema nos estudos de interação e estabilidade, que serão discutidos nas seções futuras.

4.1.5 – Difração de raios-X complexo mimético

A difração de raios-X em monocristal é uma ferramenta poderosa para a caracterização de pequenas e grandes moléculas⁹⁰. Neste trabalho, não foi possível a obtenção de monocristais para os complexos PRAP, porém foi obtido o monocristal para o complexo Mim que ajuda bastante na compreensão das interações estruturais e biomoleculares do nosso sistema, FIGURA 4.14.

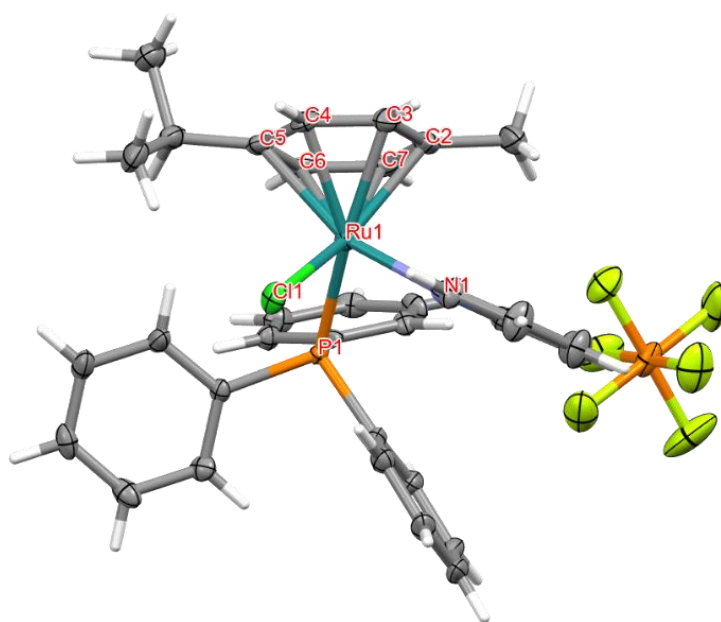


FIGURA 4.14 - Estrutura cristalográfica para o complexo Mim, átomos representados no modo ORTEP (elipsoides 50%).

Após a obtenção da estrutura cristalográfica do complexo Mim, foi possível determinar as distâncias e os ângulos de ligação. Vale ressaltar que os ângulos entre os átomos N1—Ru1—C e Cl1—Ru1—C estão disponíveis nos apêndices para melhor organização do texto. Observou-se que as distâncias entre o centro metálico e os átomos de carbono do areno apresentam valores distintos entre si, indicando a perda de simetria entre os átomos após a coordenação do precursor à piridina, TABELA 4.2. Esse dado corrobora com os espectros de RMN, nos quais foram observados quatro picos referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos dos arenos.

Por outro lado, os ângulos de ligação entre os átomos P1—Ru1—N1, P1—Ru1—Cl1 e Cl1—Ru1—N1 apresentaram valores de 90,7°; 85,19°; e 85,16°, TABELA 4.2. Ou seja, mais próximos de 90 ° que estabelece uma relação com estruturas pseudo-octaédrica. Os valores dos ângulos de ligação entre CX—Ru1—CY encontram-se nos apêndices.

TABELA 4.2 - Distâncias e ângulos de ligação dos entre os átomos da esfera de coordenação do rutênio(II) no complexo Mim, obtidos por difração de raios X em monocristal.

Átomos	Distâncias de ligação (Å)	Átomos	Ângulos de ligação (°)
Ru1—N1	2,127	P1—Ru1—N1	90,70
Ru1—Cl1	2,391	P1—Ru1—Cl1	85,19
Ru1—P1	2,376	Cl1—Ru1—N1	85,16
Ru1—C2	2,242	P1—Ru1—C2	127,42
Ru1—C3	2,250	P1—Ru1—C3	163,78
Ru1—C4	2,248	P1—Ru1—C4	147,33
Ru1—C5	2,262	P1—Ru1—C5	111,53
Ru1—C6	2,197	P1—Ru1—C6	91,09
Ru1—C7	2,211	P1—Ru1—C7	97,99

A fim de avaliar as interações intermoleculares, foram obtidas a superfície de Hirshfeld e os gráficos de *Fingerprint* para o complexo Mim, FIGURA 4.15(A) e (B). Observou-se que as interações H···H representam uma maior contribuição das interações, em aproximadamente 55%, visto que os hidrogênios são os átomos mais externos e os mais abundantes dessa estrutura, o que possibilita essas conexões, FIGURA 4.15(C). Por outro lado, as interações entre H···F e H···C proporcionaram contribuições significativas, de aproximadamente 19% cada, FIGURA 4.15(C). A interação H···F está relacionada com as interações estabelecidas entre o complexo e o contra-íon (PF_6^-). Adicionalmente, a interação H···C está relacionada com os dois átomos mais abundantes da estrutura.

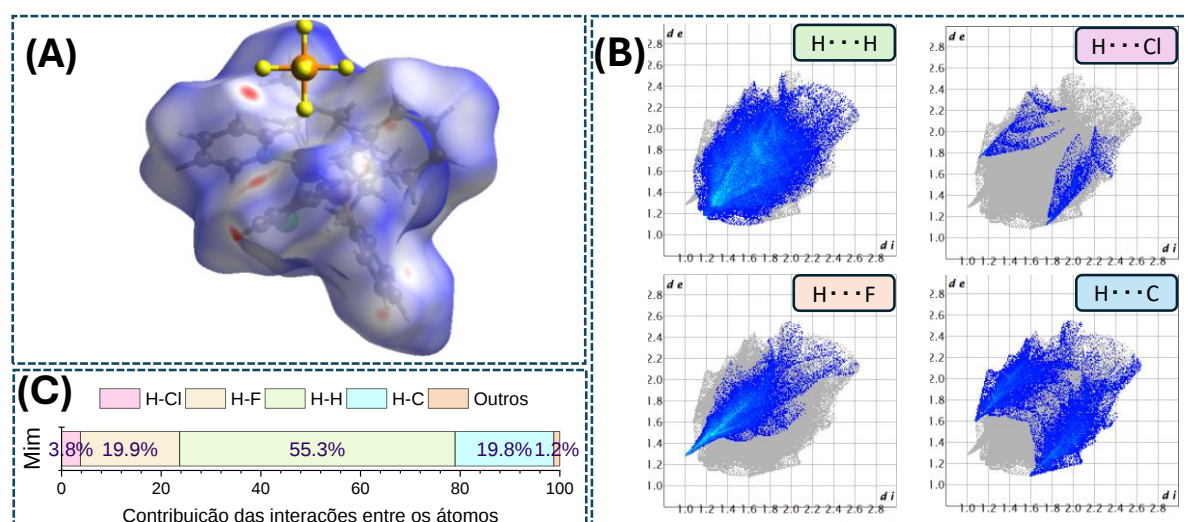


FIGURA 4.15 - Dados das interações intramoleculares para o complexo Mim. (A) Mapa de Hirshfeld. (B) gráfico *Fingerprint* dos principais átomos das interações intermoleculares. (C) gráfico da distribuição dos contatos intermoleculares.

4.1.6 – Espectroscopia eletrônica

A espectroscopia na região do UV-Vis é uma técnica amplamente utilizada para a caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos. Essa técnica emprega radiação com comprimentos de onda entre 180 e 800 nm, que, ao incidir sobre os compostos, permite que as moléculas absorvam quantidades específicas de energia. Essa absorção resulta em transições eletrônicas entre níveis de energia mais baixos e níveis mais elevados.

Cada molécula apresenta grupos funcionais que diferem entre si devido ao tipo de ligação, elementos químicos que participam da composição e consequentemente, podem apresentar absorções em diferentes comprimentos de onda. Sendo assim, essas transições podem ser de diversos tipos, como descritas na FIGURA 4.16, e o conjunto delas pode ser específico para um grupo de moléculas ou até mesmo uma característica intrínseca de determinadas moléculas.

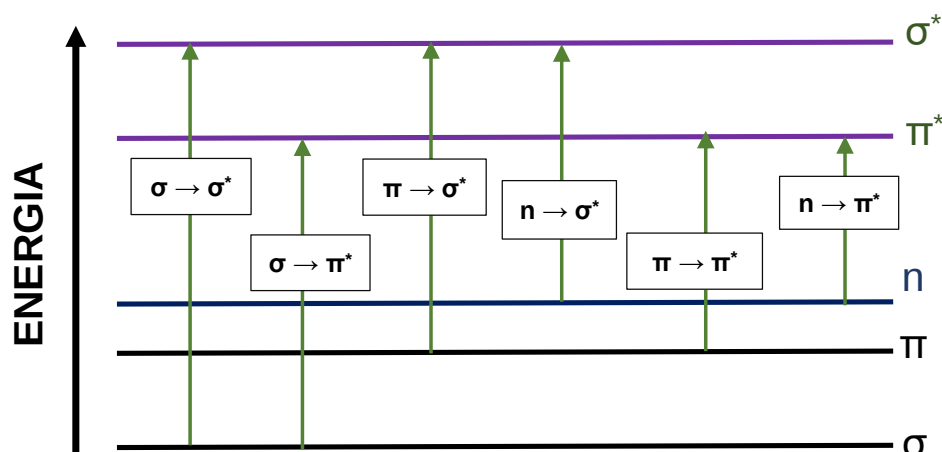


FIGURA 4.16 - Representação das transições eletrônicas possíveis entre os orbitais moleculares quando é incidido radiação eletromagnética na região referente ao UV-vis para compostos orgânicos.

Para os compostos de coordenação que apresentam metais, compostos orgânicos e inorgânicos em sua esfera de coordenação, essas transições eletrônicas podem ser do tipo transição de transferência carga metal-ligante (TCML) ou ligante-metal (TCLM), e transição entre os orbitais d do metal (d-d). As transições entre os orbitais d do metal apresentam baixa absorvidade molar, que é probabilidade dessas transições ocorrerem, levando em consideração um mol de composto (verificada pela absorbância da banda). Para os compostos sintetizados não foram evidenciadas essas transições. Possivelmente, essas transições podem ter sido sobrepostas pelas transições das porfirinas.

As porfirinas apresentam espectros bem específicos devido à alta conjugação do sistema π . Para essa classe de compostos, pode-se observar banda Soret ou banda B (de maior intensidade, aproximadamente em 420 nm) e bandas Q (quatro bandas de menor intensidade, entre 500-700 nm) do macrocíclo tetrapirrólico⁹¹. Essas bandas estão relacionadas com transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, sendo que a primeira banda mencionada está relacionada com a transição do estado fundamental para o segundo estado excitado ($S_0 \rightarrow S_2$) e as bandas Q estão relacionadas com transições do estado fundamental para o primeiro estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$).

As bandas Q podem ser descritas com base na teoria dos quatro orbitais de Gouterman, a qual propõe que essas bandas estão associadas às transições eletrônicas entre os orbitais HOMO-1 e HOMO para LUMO e LUMO+1⁹². Os orbitais de mais alta energia ocupados (HOMO) correspondem aos tipos a_{1u} e a_{2u} , enquanto os orbitais de menores energia desocupados (LUMO) pertencem ao tipo e_g ⁹². Para melhor compreensão, será adotada uma nomenclatura modificada, na qual os orbitais a_{2u} e a_{1u} serão designados como b_1 e b_2 , respectivamente, enquanto os orbitais e_g serão referidos como c_1 e c_2 FIGURA 4.17(A)⁹².

É importante mencionar que, embora os orbitais e_g sejam teoricamente degenerados, a presença dois hidrogênios ligados aos nitrogênios imínicos presentes no eixo x provoca uma quebra dessa degenerescência, FIGURA 4.17(B). Sendo assim, é importante observar que há uma maior densidade eletrônica nos nitrogênios presentes no eixo y para o orbital c_1 , do que os nitrogênios com a ausência de hidrogênio⁹². E para o orbital c_2 , a maior densidade eletrônica se encontra nos nitrogênios no eixo x . Além disso, a energia dos orbitais b_1 e b_2 pode variar em função dos substituintes presentes na porfirina⁹². De acordo com Gouterman, quando os hidrogênios imínicos estão posicionados no eixo x , as bandas Q_x apresentam menor energia em comparação com as bandas Q_y .

As bases livres e as metaloporfirinas sem ligantes axial, pertencem aos grupos D_{2h} e D_{4h} , respectivamente, FIGURA 4.17(C). Dessa forma, as metaloporfirinas não apresentam a quebra de degenerescência, quando comparado com as bases livres. Esse comportamento é atribuído ao aumento da simetria molecular, que passa de D_{2h} para D_{4h} , resultando em uma redução no número de bandas espectroscópicas.

Com base nessas informações, pode-se inferir que quatro bandas Q podem ser observadas: $Q_y(0,1)$, $Q_y(0,0)$, $Q_x(0,1)$ e $Q_x(0,0)$, FIGURA 4.17(D)⁹². No caso das metaloporfirinas de zinco(II), a simetria molecular mais elevada

resulta na formação de três bandas: $Q(0,2)$, $Q(0,1)$ e $Q(0,0)$, FIGURA 4.17(D)⁹². Essas bandas podem estar associadas a transições entre diferentes níveis de energia. No entanto, as componentes x e y não participam dessas transições, uma vez que, devido à simetria da molécula, não há distinção entre os eixos x e y .

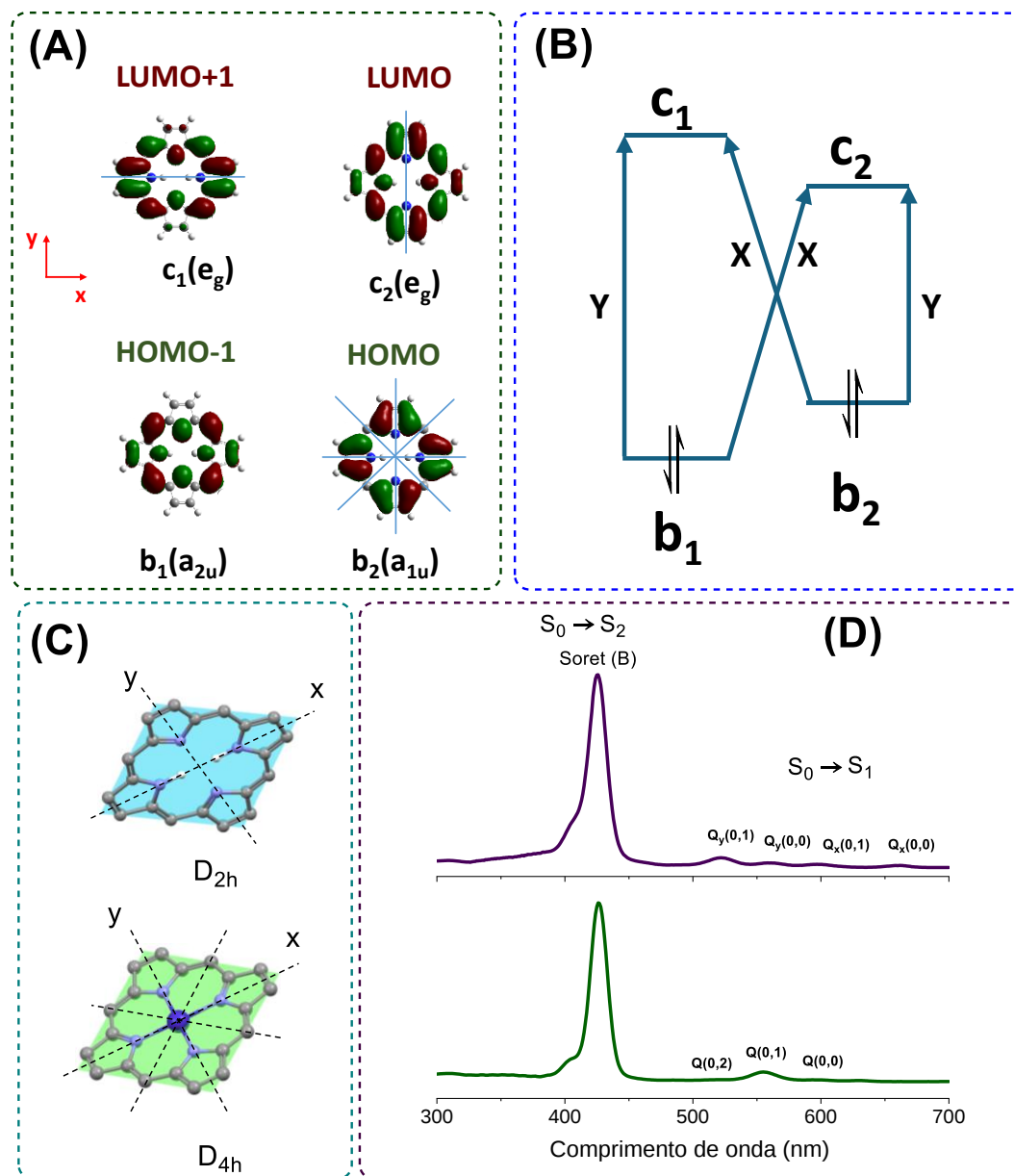


FIGURA 4.17 - (A) Orbitais envolvidos no modelo de quatro orbitais de Gouterman, podendo variar a energia dos HOMOs; (B) Diagrama de transição simplificado; (C) Diferença entre os grupos pontuais de bases livres e metaloporfirinas genéricas mostrando plano e rotações C_2 ; (D) espectros genéricos de bases livres e metaloporfirinas de zinco(II) com as atribuições das bandas Soret e Q.

A partir da compreensão das bandas de absorção, pode-se entender os resultados obtidos. É importante ressaltar que os espectros dos compostos H₂P2 e ZnP2 estão no material suplementar, e que os dados estão resumidos na TABELA 4.3.

Para o composto H₂P a banda Soret foi observada em 428 nm e as bandas Q em 520, 555, 593 e 648 nm, FIGURA 4.18(A). Em comparação com o ligante livre o composto H₂P apresentou um deslocamento de 12 nm da banda Soret e todas as bandas Q apresentaram um deslocamento batocrômico entre 10 e 3 nm. O mesmo comportamento foi verificado para o complexo H₂P2 com variações de aproximadamente 3 nm nos comprimentos de onda dessas bandas, em comparação ao complexo periférico análogo. Embora o complexo H₂P2 ainda seja considerado uma *etioporfirina* (em que seis ou mais grupos nas posições β -pirrólicas são alquilas proporcionando uma diminuição progressiva de absortividades molares, com o aumento do comprimento de onda, das bandas Q), o grupo piridil substituído na posição 3 proporciona absortividades molares das bandas III e II semelhantes.

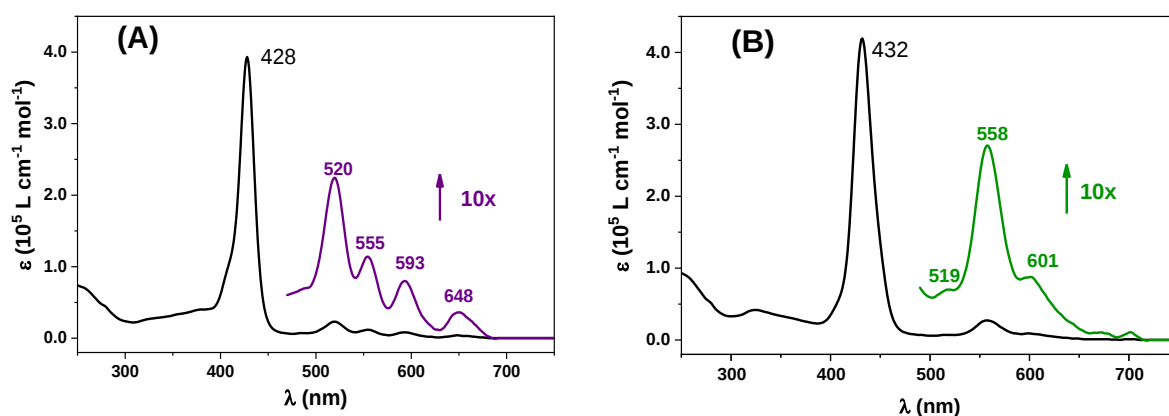


FIGURA 4.18 - Espectro na região do UV-vis para a H₂P (A) e ZnP (B) utilizando diclorometano como solvente em preto e ampliação em rosa.

Após a coordenação do zinco(II), foi observado que os compostos ZnP e ZnP2 apresentaram um efeito batocrômico de 4 e 7 nm em relação à banda

Soret dos seus respectivos complexos análogos, FIGURA 4.18(B). Também foi observada a diminuição da quantidade de bandas Q, seguida de um aumento da absortividade molar da banda média em torno de 560 nm.

Além disso, foram observadas bandas correspondentes a transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligantes em 258, 265, 271 e 278 nm, além de uma banda larga em aproximadamente 340 nm, atribuída à transição de carga do metal para o ligante (MLCT, do inglês, *metal-to-ligand charge transfer*). Um comportamento semelhante foi identificado nos espectros das porfirinas tetracatiônicas, nos quais foram verificadas bandas de maior energia atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, bem como uma banda larga em comprimentos de onda mais elevados, também associada ao processo MLCT. Essas bandas apresentam coeficientes de absortividade molar superiores às bandas Q. Adicionalmente, esse comportamento mostra que a espectroscopia na região do UV-Vis corrobora com a presença dos periféricos de rutênio(II) na estrutura molecular das porfirinas tetracatiônicas.

TABELA 4.3 - Atribuição das bandas, comprimento de onda e logaritmo da absorção molar do máximo das bandas de absorção na região do UV-vis para os compostos sintetizadas utilizando diclorometano como solvente.

H₂P					ZnP					Mim		
		H₂P2					ZnP2					
Banda	λ (nm)	Log ϵ	λ (nm)	Log ϵ	Banda	λ (nm)	Log ϵ	λ (nm)	Log ϵ	Banda	λ (nm)	Log ϵ
$\pi \rightarrow \pi^*$	257	4,85	257	4,86	$\pi \rightarrow \pi^*$	258	3,94	262	4,82	$\pi \rightarrow \pi^*$	258	4,21
$\pi \rightarrow \pi^*$	270	4,74	271	4,81	$\pi \rightarrow \pi^*$	270	3,82	271	4,78	$\pi \rightarrow \pi^*$	265	4,19
$\pi \rightarrow \pi^*$	279	4,65	278	4,76	$\pi \rightarrow \pi^*$	279	3,57	278	4,70	$\pi \rightarrow \pi^*$	271	4,14
MLCT	354	4,52	356	4,52	MLCT	324	3,62	357	4,40	$\pi \rightarrow \pi^*$	278	4,06
B(0,0)	428	5,60	425	5,65	B(0,0)	432	5,62	432	5,60	MLCT	340	3,28
Q _y (0,1)	520	4,36	517	4,37	Q(0,2)	519	4,84	516	3,68			
Q _y (0,0)	555	4,07	552	3,89	Q(0,1)	558	4,43	559	4,34			
Q _x (0,1)	593	3,90	591	3,87	Q(0,0)	601	3,94	599	3,68			
Q _x (0,0)	648	3,60	650	3,40								

4.1.7 – Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica importante para caracterização de grupos funcionais de compostos orgânicos e inorgânicos, a partir da identificação das vibrações caracterizadas como estiramentos de ligação (ν), ou seja: movimentações axiais das ligações (alteração no comprimento de ligação) do tipo simétrico e assimétrico, e deformações angulares (flexões), entre as formas mais conhecidas: tesoura, balanço, abano e torção⁸⁶.

Os espectros foram adquiridos em uma faixa de 4000 a 240 cm^{-1} utilizando CsI como solvente e se encontram nos anexos. Nesse sistema, foi possível identificar a coordenação das porfirinas com os centros metálicos de rutênio(II) a partir do deslocamento, do surgimento e do desaparecimento de bandas referentes a grupos funcionais importantes na molécula, descritos na detalhadamente na TABELA 4.4. Para visualizar as modificações nos espectros, foi realizado uma ampliação na região de 1450 a 240 cm^{-1} para as porfirinas tetracatiônicas derivadas das porfirinas $\text{H}_2\text{T4PyP}$, compradas com o ligante e o precursor P2, FIGURA 4.19. Os espectros de todos os complexos estão disponíveis nos anexos, inclusive a comparação dos espectros para o sistema derivado da $\text{H}_2\text{T3PyP}$.

Como ocorre a formação de uma espécie carregada positivamente após a coordenação, sendo necessário balancear a carga com um contra-íon, nesse caso foi utilizado o PF_6^- . Esse ânion apresenta vibrações características no infravermelho, como o estiramento P-F em 840 cm^{-1} e a deformação angular FPF em 559 cm^{-1} , ambos os estiramentos foram observados nos compostos metálicos. Adicionalmente, devido aos grupos alifáticos presentes no p-cimeno, foi observado estiramentos C-H em 2960-2860 cm^{-1} em todos os complexos contendo esse grupo.

TABELA 4.4 - Atribuição de bandas do espectro de infravermelho para o precursor, ligante e complexos tipo PRAP.

Compostos	Tentativa de Atribuição					
	$\nu\text{H-N}$	$\nu\text{N-C}$	$\pi\text{-Porphy}^*$	$\nu\text{Ru-P}$	$\nu\text{P-F}$	$\delta\text{P-F}$
Precursor	-	-	-	524	-	-
H₂T4PyP	3312	1593	973, 999, 1021	-	-	-
H₂T3PyP	3327	1564, 1585	966, 984, 1026	-	-	-
H₂P	3316	1609	971, 1000, 1030	526	841	559
H₂P2	3325	ND	999, 971, 1031	526	841	559
ZnP	-	1609	1030, 997	527	841	559
ZnP2	-	ND	997, 1033	526	841	559
Mim	-	1604	-	526	841	559

Para os complexos derivados do ligante H₂T4PyP, verificou-se que após, a coordenação do precursor nas periferias do ligante porfirínico, foi possível observar um deslocamento de 16 cm⁻¹ da banda referente ao estiramento axial das ligações CNC dos anéis piridil. Porém, para os complexos derivados do H₂T3PyP notou-se um desdobramento do $\nu\text{C=N}$, TABELA 4.4, que pode estar relacionado com perda de simetria comparado com o ligante H₂T4PyP. Após a complexação, o sinal referente ao $\nu\text{C=N}$ perdeu resolução, impossibilitando a atribuição seu número de onda.

Após a coordenação do zinco(II) no centro da porfirina, foi verificado o desaparecimento do estiramento N—H em torno de 3314 cm⁻¹ e a diminuição da quantidade de bandas relacionada com a deformação do anel porfirínico. A diminuição da quantidade de bandas está relacionada com o aumento da simetria do anel porfirínico após a coordenação passando de simetria D_{2h} para D_{4h}⁸⁴. Essas vibrações estão relacionadas com vibrações $\nu_{\text{C-C}}$, δ_{CCC} e/ou δ_{CCN} presentes no anel macrocíclo das porfirinas.

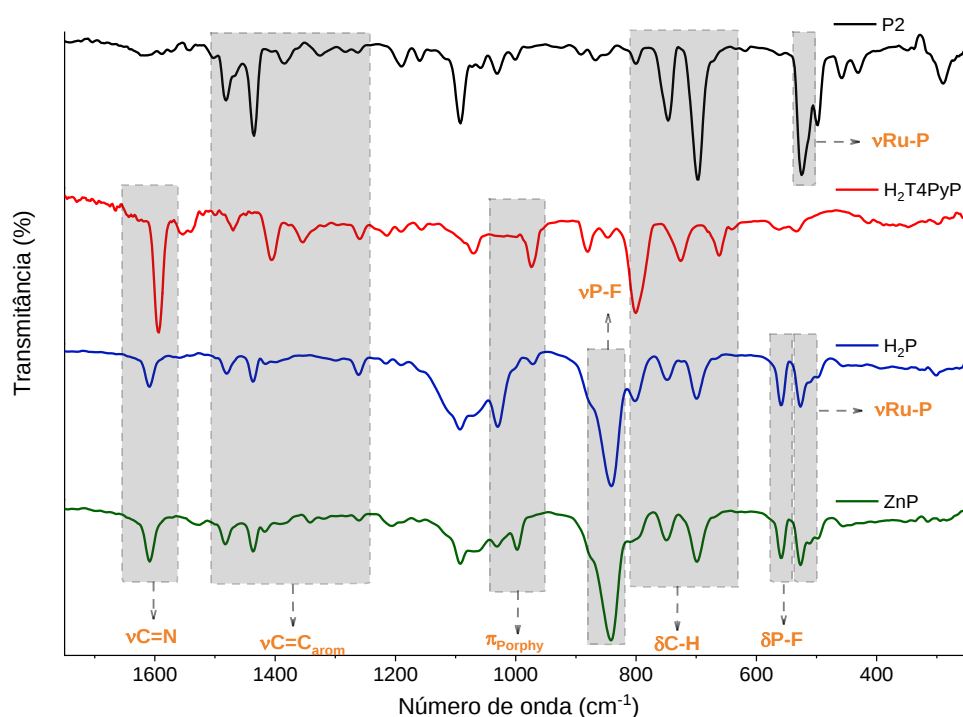


FIGURA 4.19 - Espectros na região do Infravermelho para o precursor P2 em preto, H₂T4PyP em vermelho, H₂P em azul e ZnP em verde, utilizando CsI como solvente.

4.1.8 – Estudo estrutural teórico

Devido a impossibilidade de obtenção de monocristais para os complexos do sistema PRAP, foram realizados os cálculos de estrutura otimizada por DFT (do inglês, *Density Functional Theory*) com o objetivo de proporcionar uma compreensão mais detalhada de como os compostos se comportavam de forma tridimensional. Com esse intuito, utilizou-se o programa ADF, e a base ADF TZP⁷⁵.

Os compostos de areno e rutênio(II) geralmente apresentam a chamada geometria de "banco de piano", que corresponde a uma configuração pseudo-octaédrica. Contudo, na literatura, essa estrutura também pode ser descrita como semelhante a uma geometria tetraédrica⁹³.

Para uma melhor compreensão de como é formada a ligação entre o precursor e a *meso*-tetra(piridil)porfirina, foi realizada uma simplificação

estrutural da ligação entre o areno e o rutênio(II), estabelecendo uma estrutura tetraédrica. Como todos os ligantes presentes no complexo de rutênio são distintos, eles podem ser considerados centros quirais, o que permite a definição da estereoquímica dos carbonos quirais (S, R). Considerando que as estruturas dos compostos PRAP contêm quatro centros quirais de rutênio, são possíveis seis combinações estereoquímicas: RRRR, SRRR, RSRS, RSSR, RSSS e SSSS. O objetivo deste estudo foi avaliar se diferentes conformações dos centros quirais em uma mesma estrutura poderiam proporcionar interações intramoleculares mais ou menos efetivas, alterando suas energias livres de Gibbs.

Ward e colaboradores observaram que a presença de dois ligantes (um π -aceptor e um σ -doador), em duas conformações na estrutura tipo “banco de piano” (com os ligantes voltados para a esquerda e para a direita), resultou em energias semelhantes⁹⁴. Nesse contexto, neste trabalho, foram estabelecidas algumas equivalências para reduzir o tempo de cálculo, como: RRRR equivalente a SSSS, e SRRR equivalente a RSSR. Assim, realizou-se a otimização estrutural das conformações de quatro conjuntos de centros quirais para o composto H₂P: RRRR, SRRR, RSRS e RSSR.

Após os cálculos, observou-se que a conformação SRRR é a mais estável para o composto H₂P, apresentando diferenças relativas de 146,44; 251,04; e 422,58 kJ mol⁻¹ em comparação com as conformações SRRS, RSRS e RRRR, respectivamente, TABELA 4.5. Essas diferenças são pouco significativas no contexto do meio reacional, sugerindo que os compostos existem como misturas dessas conformações. No entanto, para um estudo teórico, tais experimentos têm relevância devido à sua complexidade estrutural. Portanto, os compostos PRAP podem contribuir para a literatura com informações valiosas sobre estruturas teóricas relevantes.

Após a otimização de todas as estruturas dos compostos PRAP na conformação SRRR, observou-se que o composto H₂P2 apresenta a maior estabilidade entre as porfirinas tetracatiônicas, com uma diferença relativa de

803,33 kJ mol⁻¹ em comparação com seu isômero de posição, o H₂P. Por outro lado, metaloporfirina de zinco(II) derivada da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina se mostrou mais estável do que sua análoga, derivada da *meso*-tetra(3-piridil)porfirina, com diferença relativa de 422,58 kJ mol⁻¹. As energias livres de Gibbs, obtidas após a otimização estrutural, encontram-se nos apêndices.

TABELA 4.5 - Diferenças relativas das energias livre de Gibbs de diferentes conformações do complexo H₂P e dos compostos H₂P2 na conformação SRRR. Diferenças relativas considerando as estruturas mais estáveis.

Estruturas	Diferença relativa (kJ mol ⁻¹) ^a	Diferença relativa (kJ mol ⁻¹) ^b
H ₂ P - SRRR	0,0	803,33
H ₂ P - SRRS	146,44	949,77
H ₂ P - SRSR	251,04	1054,37
H ₂ P - RRRR	422,58	1225,91
H ₂ P2 - SRRR	-	0,0

^a - diferença relativa entre a conformação SRRR e as demais conformações do composto H₂P

^b - diferença relativa em relação ao composto mais estável, H₂P2 na conformação SRRR

Com as estruturas otimizadas no vácuo, foi possível determinar suas dimensões. Observou-se que o composto H₂P, na conformação SRRR, apresenta uma distância transversal e largura de aproximadamente 30 e 10 Å, ou 3 e 1 nm, respectivamente, FIGURA 4.20, indicando que esses compostos, no vácuo, possuem dimensões compatíveis com nanopartículas, proporcionando uma interação entre a química inorgânica e a ciência de materiais.

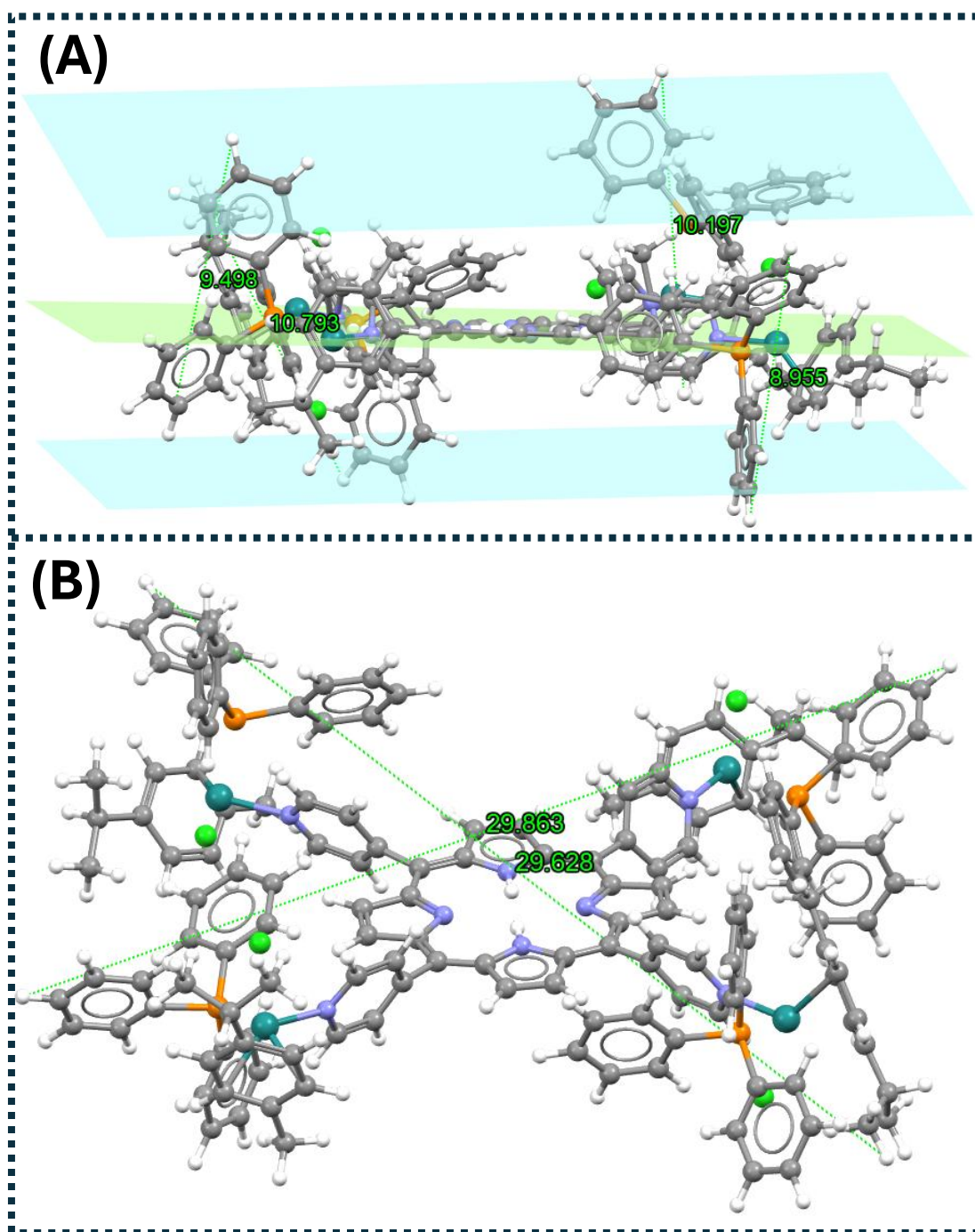
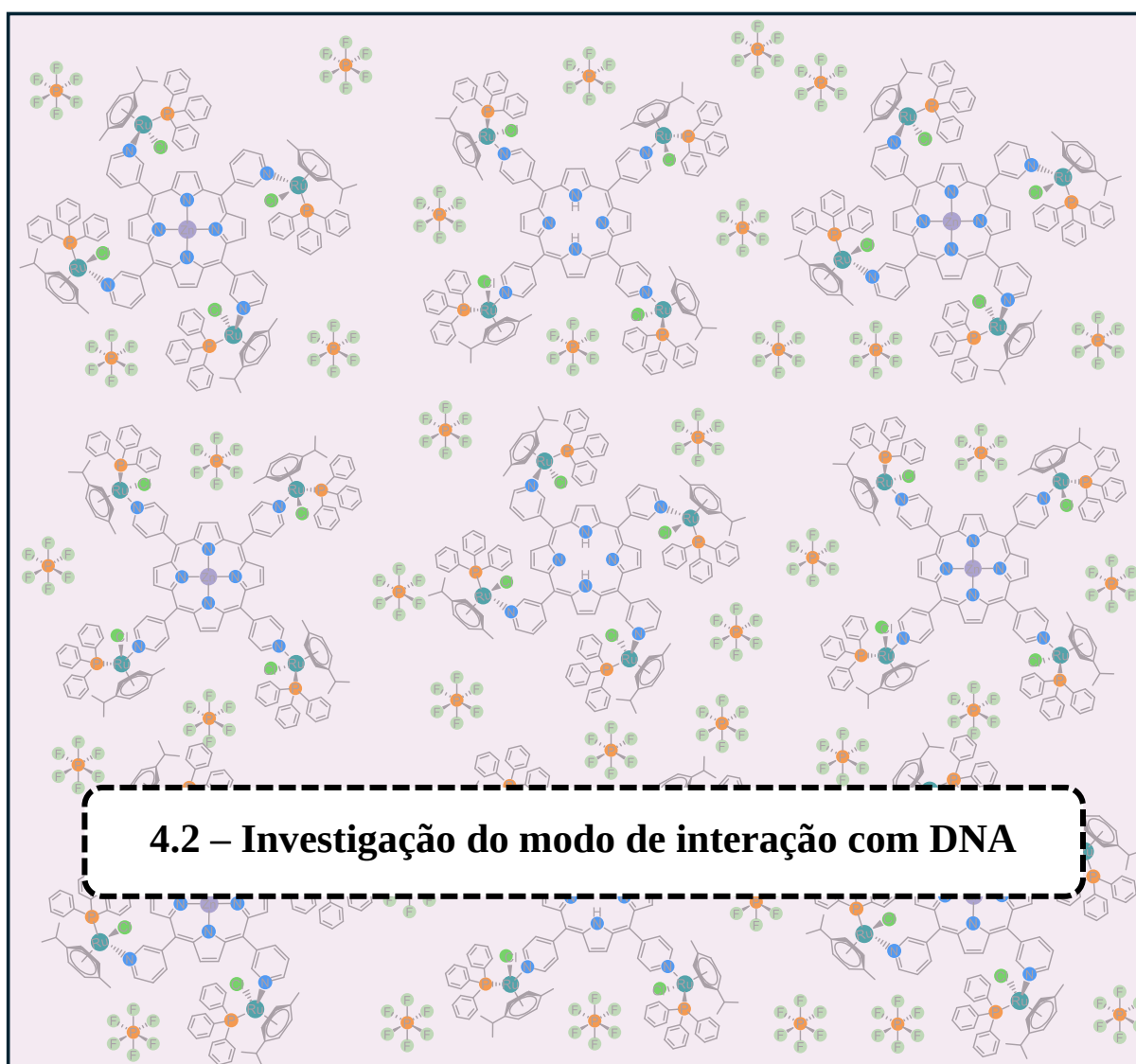


FIGURA 4.20 - Distância dos átomos nos periféricos de rutênio verificando a largura (A) e distância transversal (B) aproximada da molécula H₂P-SRRR em angstroms.

A partir da caracterização teórica e experimental, conclui-se que os compostos sintetizados neste trabalho apresentam as estruturas propostas. Com base nesse entendimento estrutural, os compostos podem ser aplicados na interação com o DNA, tema que será abordado de forma aprofundada na seção 4.2.



Esta seção aborda o estudo do modo de interação dos compostos PRAP com o DNA. Inicialmente, será investigado o comportamento de agregação desses compostos. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos com duas fontes de DNA: o ct-DNA e o plasmídeo pUC19. Para o ct-DNA, foram realizados experimentos de titulação espectrofotométrica, supressão de fluorescência com os sistemas ct-DNA/Hoechst 33342 e ct-DNA/laranja de tiazol, além de estudos de viscosidade e dicroísmo circular. No caso do plasmídeo pUC19, foi conduzido um experimento de mobilidade eletroforética. Complementarmente, para aprofundar a compreensão das interações entre os compostos e o DNA, foi realizada a análise da interação com guanosina por espectroscopia de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$.

4.2.1 – Estudo de agregação

As porfirinas são conhecidas por sua baixa solubilidade em água, atribuída às fortes interações intramoleculares do tipo π - π . No entanto, a modificação de substituintes na estrutura da porfirina pode alterar significativamente essa propriedade. Um exemplo é a adição de grupos metila à *meso*-tetra(4-piridil)porfirina ($\text{H}_2\text{T4PyP}$), resultando na formação da porfirina tetracatiônica *meso*-tetra(*N*-metil(4-piridil))porfirina⁹⁵.

É importante destacar que a *meso*-tetra(4-piridil)porfirina, obtida comercialmente, é insolúvel em dimetilsulfóxido, *N,N*-dimetilformamida, água, acetona, metanol, etanol e diclorometano, apresentando baixa solubilidade apenas em clorofórmio. Essa característica foi um dos fatores determinantes para a escolha do clorofórmio como solvente nas sínteses dos compostos PRAP descritos neste trabalho. Após a coordenação, observou-se um aumento significativo na solubilidade em dimetilsulfóxido, *N,N*-dimetilformamida, diclorometano e acetona, evidenciando uma vantagem importante para a realização de testes biológicos.

Com base nesse entendimento, torna-se essencial avaliar a solubilidade desses compostos tetracatiônicos em sistemas aquosos e tamponados que mimetizem o ambiente biológico. Para isso, os experimentos foram realizados em tampão Tris-HCl (pH 7,4), contendo 20% de DMF, esse meio foi utilizado nos testes de interação com ct-DNA. A análise foi conduzida por espectroscopia na região do UV-Vis, com monitoramento das bandas Q.

Nas condições analisadas, verificou-se que o aumento da concentração dos compostos PRAP até 40 μM não resultou em modificações significativas na linearidade da curva obtida entre as concentrações e a absorbância, conforme exemplificado para o composto H_2P na FIGURA 4.21. Esse resultado indica que os complexos não proporcionam um efeito de agregação nas concentrações utilizadas nesse experimento. Embora seja possível que os tamanhos das partículas nas condições utilizadas possam se permanecer constantes durante os experimentos, corroborando com linearidade da curva obtida. Assim, este ambiente experimental é adequado para a realização dos ensaios de interação com ct-DNA.

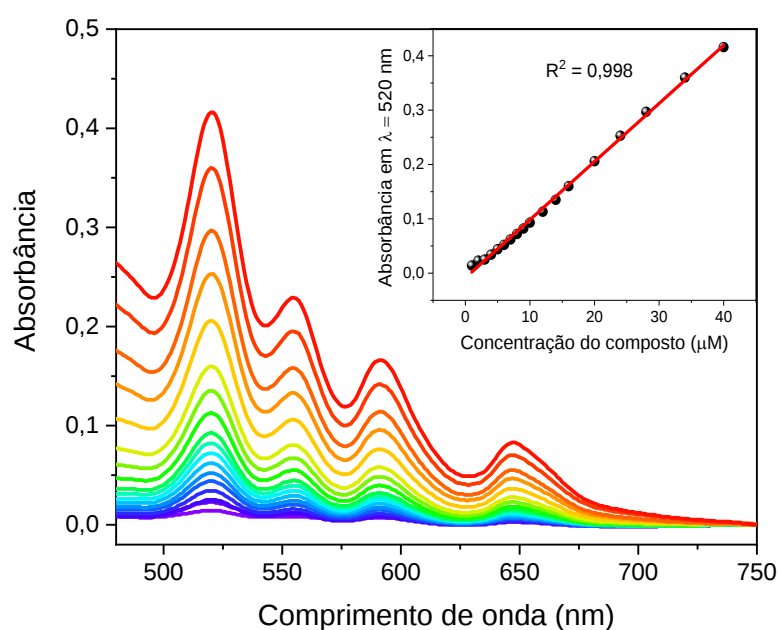


FIGURA 4.21 - Estudo de agregação do composto H_2P em tampão Trisma e DMF (4:1) UV-vis.

4.2.2 – Titulação espectrofotométrica

O ensaio de titulação espectrofotométrica é amplamente utilizado para compreender a interação entre compostos e DNA. Devido à alta sensibilidade da espectroscopia na região do UV-vis, é possível analisar parâmetros de ligação, bem como observar efeitos espectroscópicos, como batocromismo, hipsocromismo, hipercromismo e hipocromismo⁹⁶. Na interação com ct-DNA, esses efeitos estão diretamente relacionados à forma de interação estabelecida entre pequenas moléculas e o DNA

Para compostos derivados de porfirinas, a intercalação com DNA é caracterizada por deslocamentos batocrômicos iguais ou superiores a 15 nm e hipocromismo de pelo menos 35%^{96,97}. Em contrapartida, interações eletrostáticas ou por ligação no sulco apresentam deslocamentos batocrômicos e hipocromismo de menor intensidade, sendo inferiores ou iguais a 8 nm e 10%, respectivamente.

Para todos os compostos sintetizados, foram observadas constantes de ligação na ordem de 10^5 M^{-1} , deslocamentos batocrômicos entre 1 e 6 nm e hipocromismo variando de 22% a 49%, TABELA 4.6. As constantes de ligação seguem a ordem: $\text{ZnP2} < \text{H}_2\text{P2} < \text{ZnP} < \text{H}_2\text{P}$. Por outro lado, o hipocromismo apresenta a seguinte ordem decrescente: $\text{ZnP2} > \text{H}_2\text{P} > \text{ZnP} > \text{H}_2\text{P2}$. Já os deslocamentos batocrômicos seguem a ordem crescente: $\text{H}_2\text{P2} < \text{ZnP2} < \text{H}_2\text{P} < \text{ZnP}$.

Esses resultados indicam que, por meio dessa técnica, não é possível determinar conclusivamente qual composto apresenta maior interação com o ct-DNA. No entanto, os compostos derivados da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina destacaram-se nos efeitos batocrômicos e nas constantes de ligação dentro do sistema analisado. É importante ressaltar que todas as curvas de titulação apresentaram pontos isobésticos, evidenciando que, após a adição de ct-DNA, novos adutos são formados devido à interação com as porfirinas tetracatiônicas, FIGURA 4.22.

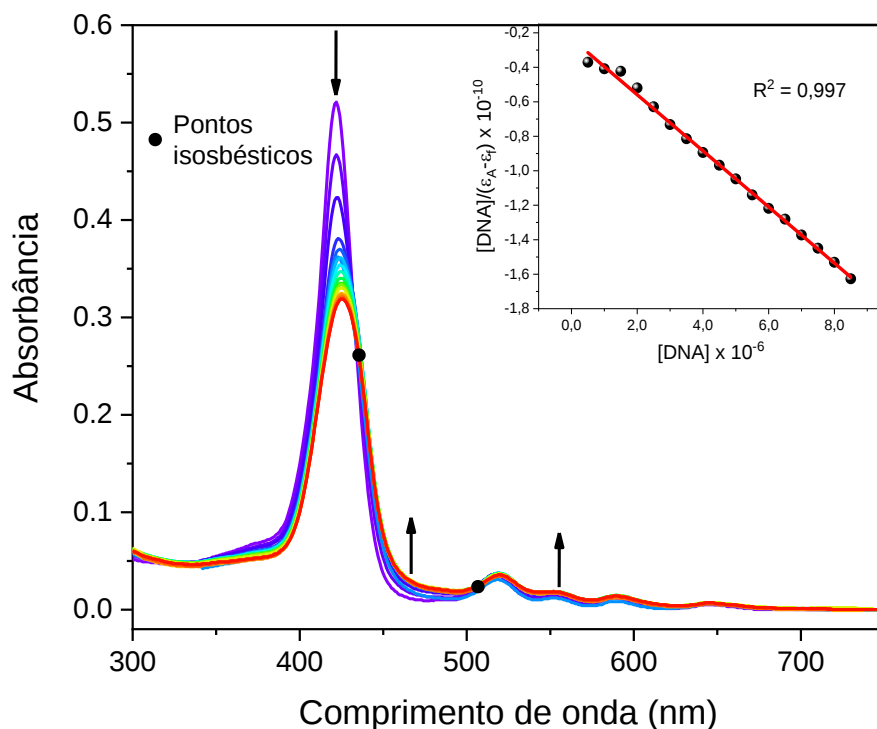


FIGURA 4.22 - Sobreposição dos espectros na região do UV-vis da titulação espectrofotométrica do complexo H_2P (6 μM) variando concentração do ct-DNA a fim de obter a razão molar de 0,1-2,0. O experimento foi realizado em tampão Trizma e DMF (4:1).

Estudos anteriores indicam que as porfirinas tetracatiônicas derivadas de compostos de coordenação nas periferias apresentam valores de constante de ligação inferiores ou na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos neste trabalho (TABELA 4.6). Por outro lado, os valores de hipocromismo observados são inferiores ou dentro da faixa registrada por Oliveira⁶⁰, Iglesias⁵⁹ e colaboradores. De acordo com esses valores, os autores atribuíram esse comportamento a interações via sulco⁶⁰. Além disso, o efeito batocrômico de 16 nm observado no composto 4 foi associado a uma possível intercalação dos ligantes bipyridina coordenados ao platina(II).

TABELA 4.6 - Parâmetros físico-químicos obtidos pela interação de ct-DNA com os complexos do tipo PRAP.

Complexos	$K_b \times 10^5 (M^{-1})$	H%	$\Delta\lambda$ (nm)	Referência
H ₂ P	6,97	39	3	Este trabalho
H ₂ P2	5,23	22	1	Este trabalho
ZnP	3,80	37	6	Este trabalho
ZnP2	3,20	49	2	Este trabalho
H ₂ RuTPyP	4,69	51	0	60
ZnRuTPyP	6,67	42	2	60
PdTThPor	0,16	44	0	59
PtTThPor	0,14	40	0	59
4	76,7	40	16	58

Embora se observe um efeito hipocrômico significativo, esses compostos, com carga molecular 4+, aumentam a possibilidade de interações eletrostáticas e via sulco. É importante destacar que o tamanho dos grupos substituintes dificulta a intercalação desses compostos com o DNA. Além disso, a possível labilização de algum ligante periférico poderia permitir a formação de uma ligação covalente com as bases nitrogenadas do ct-DNA. Devido a essas características, são necessárias outras técnicas para investigar se essas interações realmente ocorrem.

4.2.3 – Supressão de fluorescência do ct-DNA/Hoechst 33342 e ct-DNA/laranja de tiazol

A supressão de fluorescência na interação entre o DNA e um marcador é um experimento eficaz para estudar o tipo de interação dos compostos com a biomolécula, devido às características de interação desses marcadores⁵⁹. Esses experimentos consistem, inicialmente, na interação entre a sonda e o DNA, resultando na fluorescência do sistema (DNA/marcador). Em seguida, o composto

a ser investigado é adicionado, e observa-se uma possível alteração na fluorescência após o composto interagir com o sistema.

Neste trabalho, foram realizados estudos de interação com ct-DNA utilizando as sondas Hoechst 33342 e laranja de tiazol. O Hoechst 33342 é um marcador de DNA que interage preferencialmente com o sulco menor, especificamente em regiões ricas em adenina e timina (A—T)⁹⁸. Por outro lado, o laranja de tiazol interage com o DNA por meio de intercalação⁹⁹.

A partir das interações com o DNA, observou-se uma diminuição significativa da fluorescência do sistema DNA/Hoechst e DNA/laranja de tiazol após a adição das porfirinas tetracatiônicas. Por outro lado, para o complexo mimético, mesmo em concentrações quatro vezes superiores às porfirinas, não foram identificadas alterações expressivas. Houve apenas uma leve flutuação na fluorescência do sistema DNA/Hoechst. No caso do sistema DNA/laranja de tiazol, o complexo mimético provocou mudanças mínimas na fluorescência inicial.

No sistema DNA-Hoechst, verificou-se que, entre os compostos PRAP, o H₂P apresentou uma variação menos intensa na fluorescência do sistema DNA-Hoechst, FIGURA 4.23(A). Em contrapartida, o composto ZnP2 mostrou uma alteração mais significativa, com uma redução de aproximadamente 95% da fluorescência inicial na razão molar [Complexo]/[DNA] de 0,2, FIGURA 4.23(B).

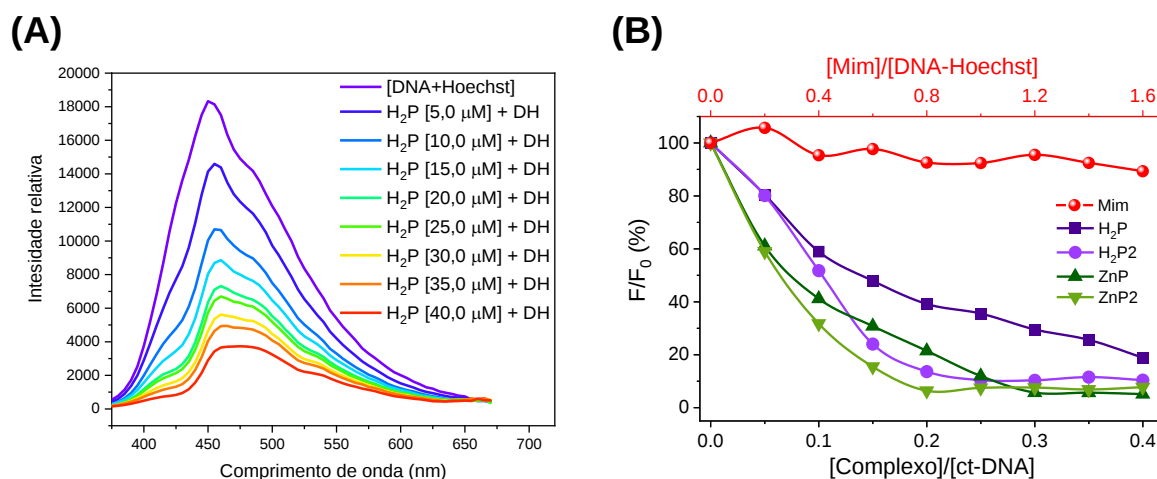


FIGURA 4.23 - Ensaio de supressão de fluorescência de DNA-Hoechst (DH) fixando a concentração de ct-DNA (100,0 μM) e Hoechst 33342 (5,0 μM), em tampão Trizma:DMF (4:1). (A) Espectros de supressão de fluorescência na ausência e presença do composto H₂P, variando a concentração entre 0 e 40,0 μM . (B) Supressão de fluorescência (F/F_0) sendo F e F_0 a intensidade de fluorescência relativa em 450 nm na presença e na ausência dos complexos, respectivamente. Variando a razão molar $[\text{PRAP}]/[\text{ct-DNA}]$ e $[\text{Mim}]/[\text{ct-DNA}]$ em 0 - 0,4 e 0 - 1,6, respectivamente. O eixo superior (em vermelho) está relacionado com a variação da razão molar do complexo mimético, exclusivamente.

Para o sistema DNA-laranja de tiazol, entre os complexos PRAP, o composto ZnP apresentou a menor variação na fluorescência com o aumento da concentração da porfirina, FIGURA 4.24(A). De maneira semelhante ao observado no sistema DNA-Hoechst, o composto ZnP2 exibiu uma redução de aproximadamente 96% na fluorescência inicial, destacando-se como o complexo que mais impactou a fluorescência no sistema DNA-laranja de tiazol, FIGURA 4.24(B).

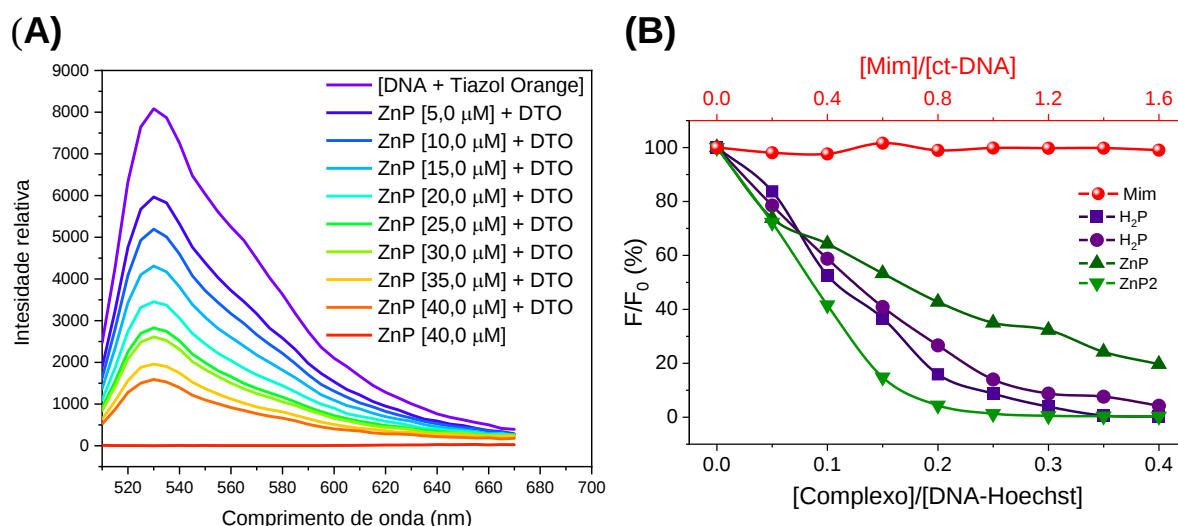


FIGURA 4.24 - Ensaio de supressão de fluorescência de DNA-Laranja de tiazol (DTO) fixando a concentração de ct-DNA (100,0 μM) e Laranja de tiazol (5,0 μM), em tampão Trizma:DMF (4:1). (A) Espectros de supressão de fluorescência na ausência e presença do composto H₂P, variando a concentração entre 0 e 40,0 μM. (B) Supressão de fluorescência (F/F_0) sendo F e F_0 a intensidade de fluorescência relativa em 530 nm na presença e na ausência dos complexos, respectivamente. Variando a razão molar [PRAP]/[ct-DNA] e [Mim]/[ct-DNA] em 0 - 0,4 e 0 - 1,6, respectivamente. O eixo superior (em vermelho) está relacionado com a variação da razão molar do complexo mimético, exclusivamente.

Com base nos experimentos de supressão de fluorescência, foi possível observar que o complexo mimético apresenta uma leve capacidade de interação via sulcos do DNA nas concentrações testadas. Para os compostos PRAP, não foi possível determinar com precisão o modo de interação com a biomolécula, pois eles exibiram comportamentos semelhantes em ambos os sistemas avaliados. Uma possível explicação para esse fenômeno é que a forte interação entre os compostos e o DNA pode levar à formação de adutos, o que reduz significativamente a fluorescência nos dois sistemas testados. O composto ZnP2 destacou-se, apresentando a maior redução de fluorescência em ambos os sistemas analisados.

4.2.4 – Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 em gel de agarose

Com o objetivo de investigar as interações com o DNA, foram realizados experimentos de mobilidade eletroforética em gel de agarose utilizando o plasmídeo pUC19, derivado da bactéria *E. coli*. Essa técnica baseia-se na separação de moléculas pela aplicação de um campo elétrico¹⁰⁰. As diferentes velocidades de migração observadas decorrem da relação carga-tamanho das distintas conformações presentes no plasmídeo¹⁰⁰. Como o DNA possui carga parcial negativa, essa biomolécula tende a migrar em direção ao eletrodo de carga oposta¹⁰⁰.

Além do campo elétrico, o suporte utilizado na eletroforese desempenha um papel crucial na separação das moléculas. Geralmente, emprega-se um gel com concentração de agarose entre 1% e 8%, que permite a formação de poros com diâmetros variando entre 100 e 500 nm. Esses poros são altamente eficientes na separação de ácidos nucleicos com tamanhos entre 0,1 e 20 kbp (do inglês *base pair*, pares de bases)¹⁰⁰. Neste estudo, utilizou-se um gel contendo 1% de agarose, adequado para a análise do plasmídeo pUC19, que possui aproximadamente 2,6 kbp, estando, dentro da faixa ideal para separação.

A proporção e a presença das diferentes conformações do plasmídeo podem variar conforme a fonte do plasmídeo. Neste estudo, verificou-se que mais de 90% do plasmídeo estava na conformação superenovelada. Nos experimentos realizados, foram identificadas bandas correspondentes às conformações circular (CC), linear (CL) e superenovelada (SE), apresentando mobilidade eletroforética em ordem crescente, conforme ilustrado na FIGURA 4.25.

Os experimentos foram conduzidos comparando-se um controle negativo, contendo plasmídeo, *N,N*-dimetilformamida e água, e um controle positivo, contendo plasmídeo e cisplatina (5,0 μ M). Observou-se que todos os compostos PRAP foram capazes de alterar a mobilidade eletroforética do plasmídeo nas concentrações de 1,0 μ M e 10,0 μ M. Contudo, na concentração de

0,1 μM , não foram detectadas alterações significativas, FIGURA 4.25. O gel contendo os resultados para as metaloporfirinas de zinco(II) está nos apêndices.

O composto mimético apresentou comportamento semelhante ao das porfirinas nas concentrações de 0,4 μM , 4,0 μM e 40,0 μM , equivalentes às concentrações de rutênio em relação às porfirinas tetracatiônicas, FIGURA 4.25. Nas maiores concentrações, foi observado o desaparecimento de todas as conformações do plasmídeo, para todos os compostos. Já nas concentrações intermediárias, ocorreu o desaparecimento completo da banda correspondente à conformação superenovelada, com um aumento na intensidade da banda relativa ao DNA linear para os compostos H_2P e Mim. Adicionalmente, verificou-se que, na concentração intermediária do composto H_2P , todas as bandas estavam deslocadas, indicando um possível arraste. Esse comportamento pode estar relacionado à fragmentação do DNA, sugerindo alterações estruturais significativas.

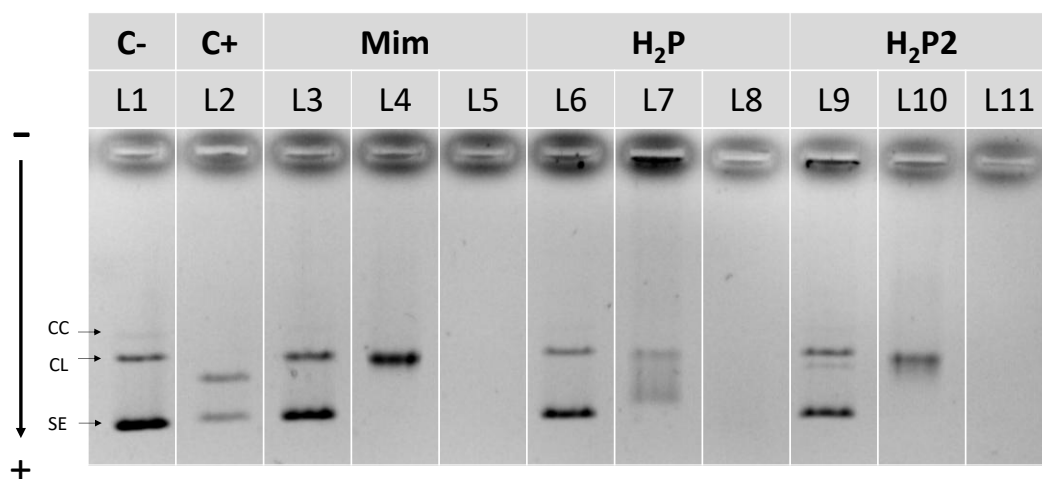


FIGURA 4.25 - Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 com período de incubação de 24 h e 10 % de DMF. Sendo que L1 ou C- é o controle negativo contendo plasmídeo (0,25 μg) e DMF. L2 ou C+ é o controle positivo contendo plasmídeo e cisplatina (5 μM). Para o complexo Mim foram variadas as concentrações, seguindo a ordem: L3 = 0,4; L4 = 4,0; L5 = 40 μM . Para o complexo H_2P (L6 = 0,1; L7 = 1,0; L8 = 10 μM) e $\text{H}_2\text{P2}$ (L9 = 0,1; L10 = 1,0; L11 = 10 μM).

Entre os testes realizados, a mobilidade eletroforética foi o que apresentou o comportamento mais semelhante entre as porfirinas tetracatiônicas e o complexo mimético. Dessa forma, a presença dos grupos periféricos de rutênio(II) nos compostos PRAP e no complexo mimético pode estar promovendo esse comportamento na interação com o DNA.

A determinação da forma de interação entre os compostos e o plasmídeo por eletroforese é uma tarefa desafiadora. No entanto, devido às características dos complexos, pode-se levantar a hipótese de que a diminuição da intensidade das bandas esteja relacionada à formação dos adutos (compostos PRAP/plasmídeo) com diâmetros maiores do que 500 nm. Esses adutos poderiam impedir a visualização das bandas do plasmídeo nas concentrações mais altas dos compostos, devido à possibilidade desses adutos não ultrapassarem os poros do gel de agarose. Segundo Grau e colaboradores, o desaparecimento da banda pode estar relacionado com a fragmentação do plasmídeo, decorrente de ligações covalentes entre os compostos e o DNA¹⁰¹. Essa interação pode ser tão eficiente que inviabilize a detecção da biomolécula¹⁰¹. Além disso, os compostos podem interagir com o plasmídeo por meio de interações eletrostáticas, impedindo a intercalação do brometo de etídio com o DNA, o que resultaria no desaparecimento das bandas, como sugerido por Cunha e colaboradores¹⁰². Dessa forma, outros testes são necessários para elucidar os modos de interação entre os compostos e o DNA.

4.2.5 – Viscosidade Relativa

A técnica de viscosidade é um método hidrodinâmico eficaz para estudar a interação de compostos com ct-DNA¹⁰³. Através desse experimento, é possível analisar a variação da viscosidade do DNA em resposta à interação com o composto em diferentes concentrações. De acordo com a literatura, os resultados podem indicar diferentes tipos de interação: a intercalação, que, devido ao alongamento da dupla hélice, provoca um aumento na viscosidade do ct-DNA¹⁰⁴;

a ligação covalente, que leva à fragmentação da dupla hélice e resulta na diminuição da viscosidade do ct-DNA¹⁰⁴; e as interações fracas (como interações via sulco ou eletrostáticas), que causam poucas modificações no ct-DNA, resultando em variações mínimas na viscosidade da biomolécula.

O experimento de viscosidade foi realizado com todos os complexos sintetizados neste trabalho. O complexo mimético foi utilizado em uma concentração quatro vezes maior para garantir que as mesmas quantidades de íons estivessem presentes em solução, além de manter a proporção equivalente dos grupos periféricos da porfirina. Como controle positivo, foi utilizado o laranja de tiazol, que intercala com os pares de bases nitrogenadas do DNA, conforme mostrado na FIGURA 4.26.

Após a realização do experimento, observou-se uma diminuição significativa da viscosidade quando o ct-DNA foi submetido a concentrações crescentes dos compostos PRAP, FIGURA 4.26. Inicialmente, esse comportamento sugere que os compostos podem estar formando ligações covalentes com o ct-DNA. No entanto, devido à carga dos compostos, uma hipótese alternativa foi levantada, sugerindo que eles poderiam induzir um efeito de nucleação. Esse efeito resultaria na aglomeração de moléculas de ct-DNA ao redor das moléculas de composto, o que provocaria a diminuição da viscosidade do sistema devido à formação de adutos e uma diminuição da interação do ct-DNA com o vidro do viscosímetro.

Para o complexo mimético, não foi observado o mesmo comportamento de formação de adutos. Na verdade, a pequena variação na viscosidade pode ser atribuída a interações eletrostáticas ou via sulco. Esses resultados corroboram com os experimentos anteriores, sugerindo que o arcabouço estrutural das porfirinas tetracatiônicas desempenha um papel fundamental na formação dos adutos.

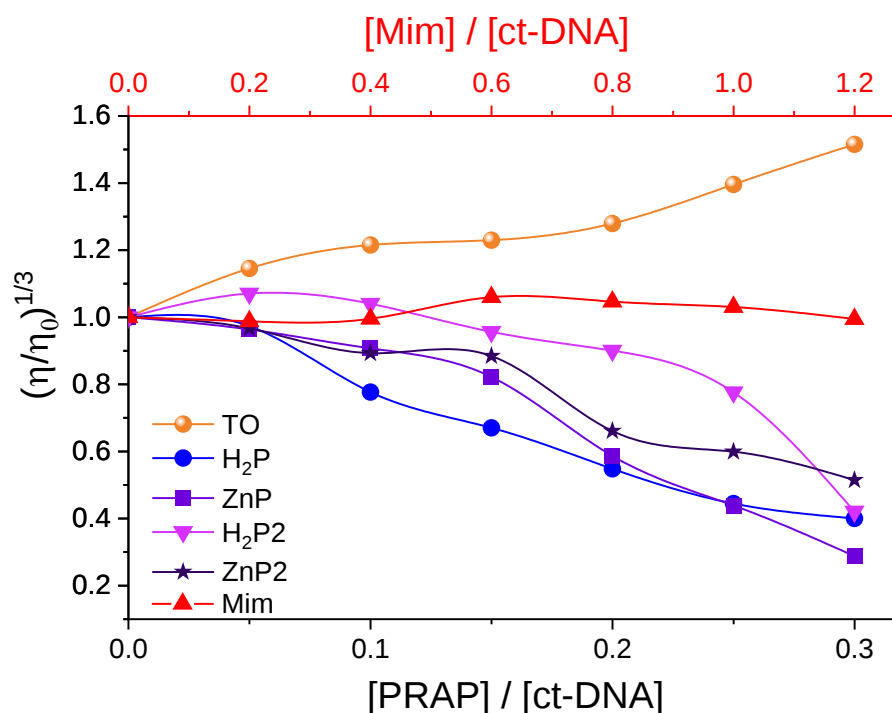


FIGURA 4.26 -Verificação da viscosidade relativa do ct-DNA (80 μ M) a partir da variação de tempo de escoamento no viscosímetro de Ostwald para os complexos PRAP e laranja de tiazol de 0-0,3 e para o complexo mimético variando a razão molar entre 0-1,2. O eixo superior (em vermelho) está relacionado com a variação da razão molar do complexo mimético, exclusivamente.

4.2.6 – Interação com ct-DNA por dicroísmo circular

A espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular é uma ferramenta amplamente utilizada para estudar mudanças na quiralidade de biomoléculas, como DNA, RNA e proteínas¹⁰⁵. Essa técnica é particularmente fundamental no estudo das interações com o DNA devido às características específicas dos espectros de dicroísmo circular. A conformação B-DNA, que é a mais prevalente nas células, é caracterizada pela presença de duas bandas no dicroísmo circular: uma banda positiva em torno de 275 nm, associada ao empilhamento das bases nitrogenadas, e uma banda negativa aproximadamente a 245 nm, relacionada à helicidade do DNA¹⁰⁶. Dentre as várias conformações do DNA, destaca-se a conformação Z, que difere do B-DNA principalmente pela rotação da dupla hélice. No B-DNA, a hélice gira para a direita, enquanto no Z-DNA, o sentido de

rotação é para a esquerda¹⁰⁶. Essas diferenças são refletidas no perfil do espectro, sendo que as bandas de menor e maior energia do Z-DNA são negativas e positivas, respectivamente. Essa característica é de grande importância na análise das conformações do DNA utilizando essa técnica.

Neste trabalho, utilizou-se ct-DNA, que apresenta a conformação B-DNA como predominante. Assim, foi observada uma banda positiva a 275 nm; no entanto, a banda negativa não foi totalmente identificada devido às condições experimentais. Para permitir uma comparação experimental entre as técnicas empregadas neste estudo, o experimento foi conduzido em tampão Tris-HCl: DMF (4:1). Mesmo assim, foi possível observar os efeitos da interação dos compostos com ambas as bandas do ct-DNA. Devido à robustez da técnica para verificar as conformações do DNA, os experimentos foram realizados com incubação de 10 minutos e 24 horas. Essa abordagem foi adotada para avaliar a importância do tempo nos experimentos e para compreender as possíveis mudanças nas conformações do DNA ao longo de cada experimento.

Para o composto Mim, com o período de incubação de 10 minutos, observou-se um aumento na intensidade da banda negativa, FIGURA 4.27(A), enquanto após 24 horas, o efeito foi inverso, FIGURA 4.27(B). Por outro lado, não foram observadas modificações significativas na banda positiva. Assim, em ambos os tempos de incubação, verificou-se que o composto mimético tem a capacidade de modificar a helicidade do ct-DNA. É importante destacar que as alterações nos espectros em diferentes tempos indicam que dois efeitos podem estar ocorrendo ao longo do tempo.

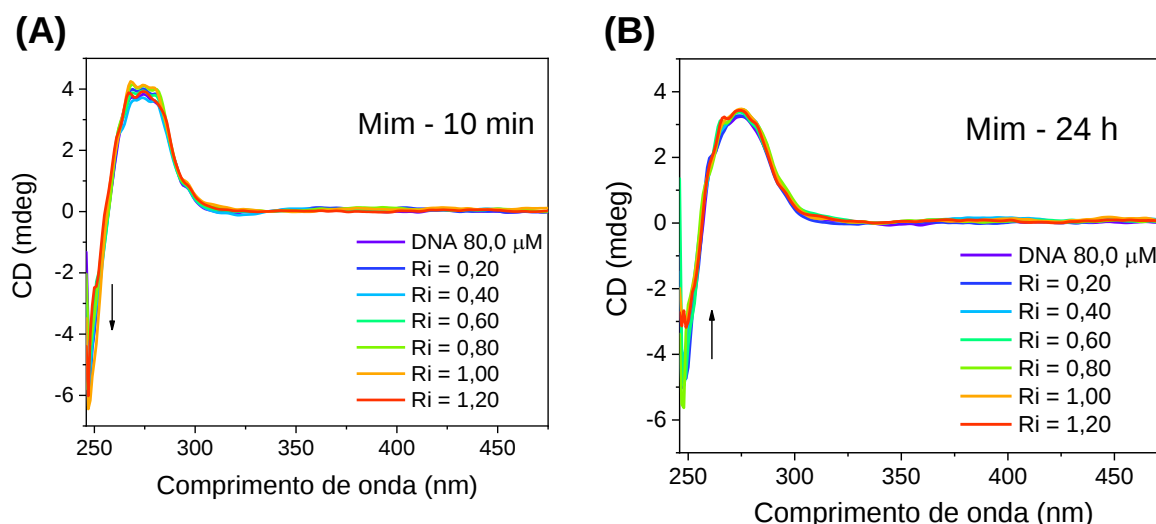


FIGURA 4.27 - Espectros de dicroísmo circular de ct-DNA (80,0 μM) em tampão Trizma:DMF (1:4), na presença complexo mimético nas concentrações de 0, 16, 32, 48, 64, 80, 96 μM obtendo razão molar de 0; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20. (A) com período de incubação de 10 minutos temperatura ambiente; (B) incubação durante 24 h, a 37 °C.

Os compostos PRAP, por sua vez, apresentaram uma modificação significativa nas bandas positivas e negativas do espectro de dicroísmo circular tanto após 10 minutos quanto 24 horas. Inicialmente, observou-se uma diminuição na intensidade da banda positiva, enquanto a banda negativa exibiu variações aleatórias, como ilustrado pelo composto ZnP2, FIGURA 4.28(A). Após 24 horas, foi registrada uma diminuição ainda mais acentuada em ambas as bandas, FIGURA 4.28(B). Entre 400 e 450 nm, foram observadas bandas de dicroísmo induzido, associadas à banda Soret das porfirinas. Vale destacar que o perfil das bandas variou ao longo do tempo, indicando que as porfirinas estão de fato interagindo com o DNA. Esses resultados sugerem que a interação entre o ct-DNA e as porfirinas tetracatiônicas é dependente do tempo e, a partir dos espectros de dicroísmo circular, é possível concluir que os compostos PRAP podem alterar a estrutura secundária do DNA de maneira mais intensa e diferente quando comparado ao complexo Mim.

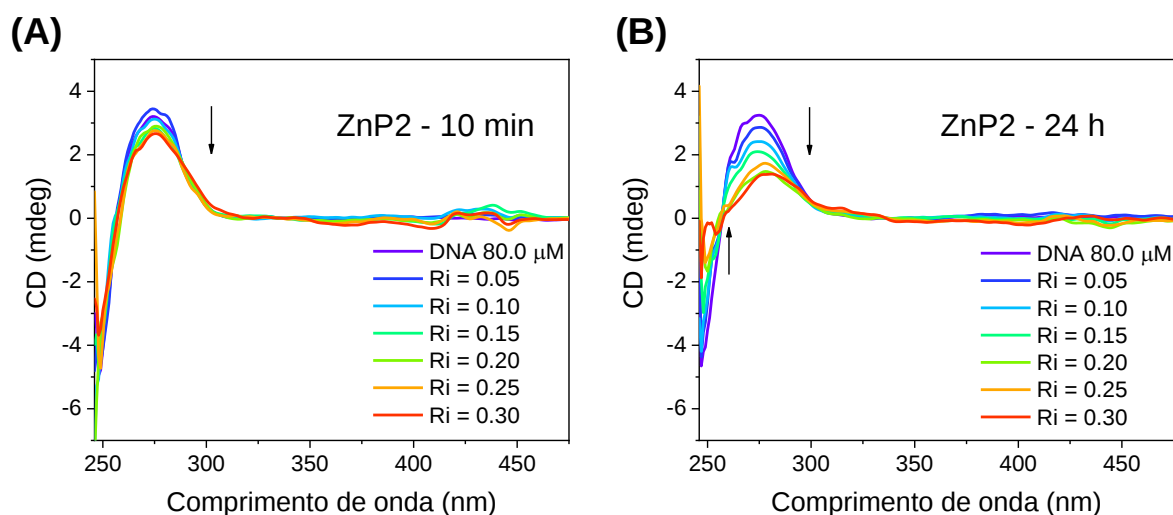


FIGURA 4.28 - Espectros de dicroísmo circular de ct-DNA (80,0 μM) em tampão Trizma:DMF (1:4), na presença complexo ZnP2 nas concentrações de 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 μM obtendo razão molar de 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30. (A) com período de incubação de 10 minutos temperatura ambiente; (B) incubação durante 24 h, a 37 °C.

A interação com ct-DNA por meio de dicroísmo circular é uma ferramenta importante, embora a sua interpretação possa gerar algumas divergências na literatura. De acordo com o conceito geral, mudanças significativas nas bandas de dicroísmo circular estão frequentemente associadas a interações fortes ou podem ser interpretadas como uma alteração na conformação do DNA¹⁰⁶. Tarai e Kaplanis relatam que um aumento nas intensidades das bandas positiva e negativa é característico da interação por intercalação de compostos com o DNA, enquanto interações eletrostáticas ou via sulco não geram efeitos significativos^{107,108}. Além disso, Tarai sugere que a modificação observada em seu estudo está relacionada à transição da conformação B-DNA para a Z-DNA¹⁰⁷. A diminuição das bandas de dicroísmo circular do DNA após a titulação de compostos é geralmente atribuída à interação desses compostos com o DNA, sendo descrita de maneiras distintas na literatura. Mahadevan e Fu associam a redução das bandas ao deslocamento da conformação B-DNA para a C-DNA^{109,110}, enquanto Palmeira-Mello e colaboradores concluíram que a diminuição drástica das bandas se deve a uma ligação forte dos compostos com as bases nitrogenadas do DNA¹¹¹.

Ao comparar com estruturas semelhantes descritas neste trabalho, como as porfirinas tetracatiônicas derivadas de compostos de coordenação, Oliveira e colaboradores observaram uma diminuição exclusiva da banda negativa, o que foi atribuído a uma interação eletrostática¹¹². Iglesias e colaboradores, por sua vez, sugerem que a diminuição das bandas pode ser decorrente de uma interação que afeta a estrutura do DNA, especialmente nas regiões aromáticas. Os autores acrescentam que tal interação pode modificar a absorvidade molar das bandas do DNA em relação à luz circular polarizada.

É evidente que as modificações nas bandas de dicroísmo circular em relação ao B-DNA são geralmente associadas a interações de alta magnitude, embora a natureza exata dessas interações ainda não seja claramente definida. A diminuição das bandas oferece poucas evidências sobre o tipo de interação entre os compostos e a biomolécula; por isso, em muitos casos, é necessário utilizar um conjunto de técnicas para elucidar essa interação. Neste trabalho, essa diminuição será inicialmente atribuída a uma interação eletrostática, seguida por uma interação mais forte, que pode ocorrer por meio de ligações covalentes. Para investigar essa hipótese, foi realizado o experimento de interação com a guanosina.

4.2.7 – Interação com guanosina

A estrutura do DNA é composta por duas classes de bases nitrogenadas: as pirimidinas e as purinas. As purinas incluem as moléculas de guanina e adenina, que possuem o nitrogênio N7 como o sítio mais disponível para formar ligações covalentes, conforme ilustrado na FIGURA 4.29(A). A cisplatina, por exemplo, se liga preferencialmente à guanina, motivo pelo qual a guanosina foi escolhida para os experimentos realizados neste trabalho, FIGURA 4.29(B). A guanosina, por sua vez, é formada pela junção de uma molécula de guanina com um anel de ribose, FIGURA 4.29(C). No contexto do DNA, as guanosinas estão ligadas a grupos fosfato, formando moléculas denominadas

guanosina 5'-monofosfato (5'-GMP, do inglês *guanosine 5'-monophosphate*). Essas unidades interagem entre si, contribuindo para a formação das fitas de DNA¹¹³, FIGURA 4.29(D).

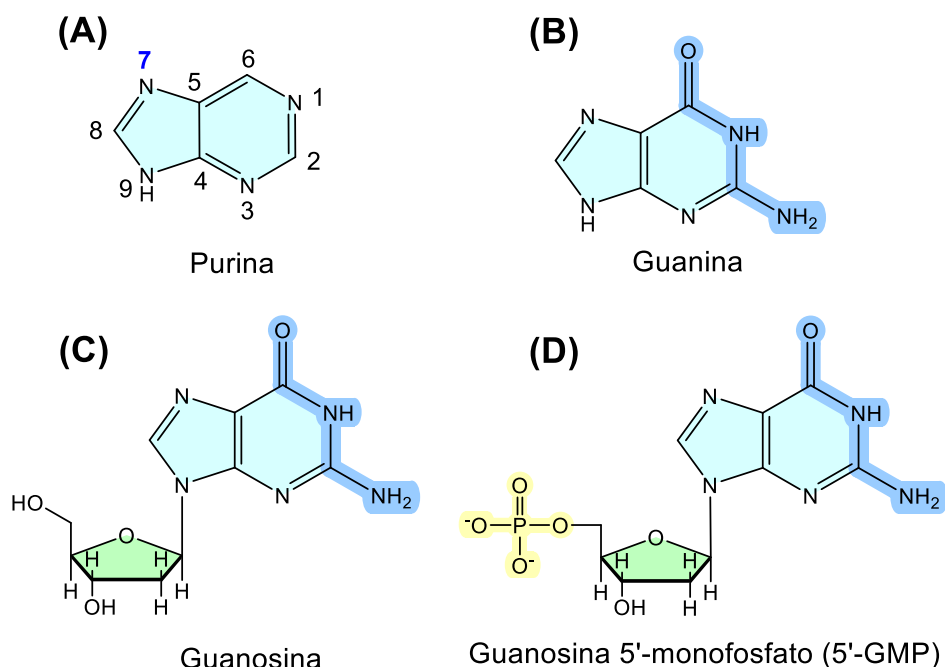


FIGURA 4.29 - Estrutura química da purina (A), da guanina (B), da guanosina (C) e guanosina 5'-monofosfato (5'-GMP) (D).

Uma forma para realizar o ensaio com a guanosina é utilizar RMN de ^1H e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, caso a molécula contenha esses núcleos em sua estrutura. Esse experimento foi conduzido com o composto H_2P e guanosina em uma proporção de 1:2, utilizando como solventes uma mistura acetona- d_6 e DMSO-d_6 (9:1), nos tempos 0, 24 e 48 horas, FIGURA 4.30. Esses solventes foram utilizados pois o complexo é estável em acetona e a guanosina apresenta alta solubilidade em DMSO . Infelizmente, a presença de DMSO foi requerida para este experimento, mesmo sabendo que o composto não apresenta estabilidade nesse solvente, que será investigado na subseção 4.3.1. Para minimizar possíveis erros de interpretação dos dados, foi realizado um experimento controle (branco), sem a presença de guanosina. Os espectros obtidos nesse controle estão apresentados na subseção 4.3.1, relacionadas ao estudo da estabilidade do composto em DMSO .

Após a aquisição dos espectros, foi identificado um desdobramento do singuleto em 36 ppm, associado ao complexo. Esse sinal também foi observado no ensaio de estabilidade em DMSO. No entanto, dois singletos adicionais foram observados em 37 ppm, os quais não estavam presentes no estudo de estabilidade com DMSO. Esses sinais foram atribuídos à formação de novas espécies resultantes da ligação covalente entre o rutênio e a guanosina, FIGURA 4.30. É relevante destacar que o complexo mimético apresentou comportamento semelhante ao composto H_2P . Os espectros de RMN $^{31}P\{^1H\}$ referentes ao complexo mimético estão disponíveis nos apêndices.

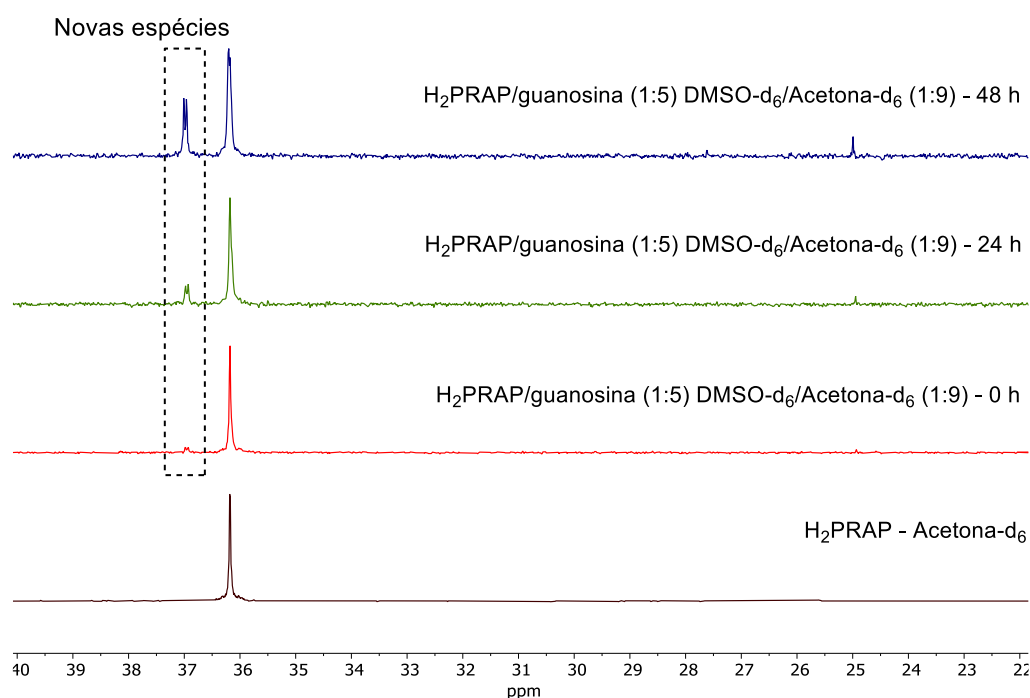


FIGURA 4.30 - Espectros de $^{31}P\{^1H\}$ RMN da interação do composto H_2P e guanosina na proporção 5:1, no período de 0-48 h utilizando acetona- d_6 e DMSO- d_6 (9:1).

Para uma maior compreensão do sistema, foi realizado um estudo de interação utilizando o composto H_2P2 . Observou-se que sua interação com a guanosina resultou na formação das mesmas espécies observadas na interação com o complexo H_2P , FIGURA 4.31. Esse comportamento levanta a hipótese de que ocorre o rompimento da ligação entre o rutênio(II) e o piridil da *meso*-tetra(3-

piridil)porfirina. Se o produto formado tivesse origem na liberação de outro ligante, como cloreto ou areno, seria esperado que o composto resultante, envolvendo a coordenação entre a *meso*-tetra(3-piridil)porfirina e a guanosina, apresentasse um sinal de fósforo de baixa resolução no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. No entanto, esse comportamento não foi observado, sugerindo que o rompimento ocorre especificamente na ligação com o piridil.

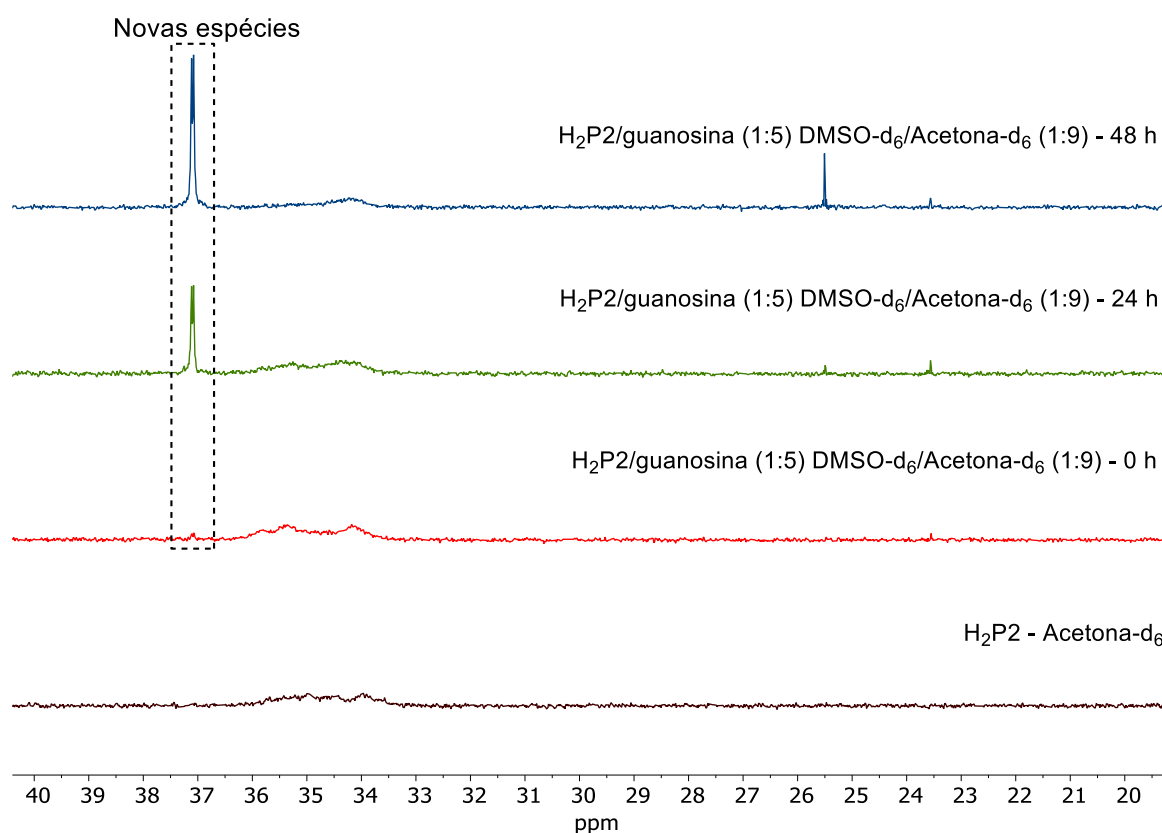


FIGURA 4.31 - Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN da interação do composto $\text{H}_2\text{P2}$ e guanosina na proporção 5:1, no período de 0-48 h utilizando acetona- d_6 e DMSO-d_6 (9:1).

Na tentativa de isolar o complexo formado pela interação dos compostos PRAP com a guanosina, realizou-se uma reação entre o complexo mimético e a guanosina, seguida de esforços para cristalizar a espécie resultante, sem sucesso. Paralelamente, foi realizada uma síntese utilizando o precursor $[\text{Ru}(\text{p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$ para confirmar a hipótese mencionada anteriormente.

Observou-se a presença do mesmo sinal em maior intensidade, porém acompanhada da formação de diversos subprodutos no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Esses resultados reforçam a hipótese de que ocorre a labilização da ligação entre o piridil e o centro metálico no processo de interação com a guanosina.

4.2.8 – Interação por DLS e discussão geral da interação com o DNA

Para confirmar a formação de adutos com o ct-DNA, foi realizado um estudo preliminar utilizando a técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS), amplamente reconhecida por sua eficácia na análise do tamanho de partículas ¹¹⁴. O composto ZnP2 foi selecionado para esse experimento, pois demonstrou uma diminuição mais acentuada na fluorescência nos sistemas DNA-Hoechst e DNA-Laranja de tiazol. Além disso, também apresentou redução significativa das bandas associadas ao empilhamento das bases nitrogenadas e à helicidade do DNA, conforme observado nos ensaios de interação por dicroísmo circular descritos nas subseções 4.2.3 e 4.2.6, respectivamente.

A partir do experimento de *Dynamic Light Scattering* (DLS), foi observado que o composto ZnP2 não provoca alterações significativas no diâmetro das partículas em tampão Tris:DMF (4:1), mesmo com o aumento da concentração. O diâmetro médio permaneceu em torno de 330 nm, na ausência de ct-DNA, conforme demonstrado nos gráficos disponíveis nos apêndices. Esses resultados indicam que o composto ZnP2 formam partículas maiores do que as descritas no vácuo, porém o tamanho dessas partículas mantém-se estável, corroborando os dados obtidos no estudo de agregação por UV-vis, descrito na subseção 4.2.1.

Vale destacar que o tamanho das partículas determinado experimentalmente é consideravelmente diferente dos dados teóricos obtidos por cálculos de DFT, que estimaram um diâmetro de aproximadamente 3 nm (seção

0). Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que os cálculos teóricos não consideram as interações intermoleculares presentes no sistema experimental.

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS), foi observado que o ct-DNA (80,0 μM) apresentou partículas com um raio hidrodinâmico de aproximadamente 630 nm, correspondendo à maior intensidade relativa. Após a interação com o composto ZnP2, na concentração de 20,0 μM , houve um aumento significativo no raio hidrodinâmico, atingindo cerca de 3500 nm, FIGURA 4.32. Esses resultados preliminares sugerem que houve a formação de adutos entre o composto ZnP2 e o ct-DNA.

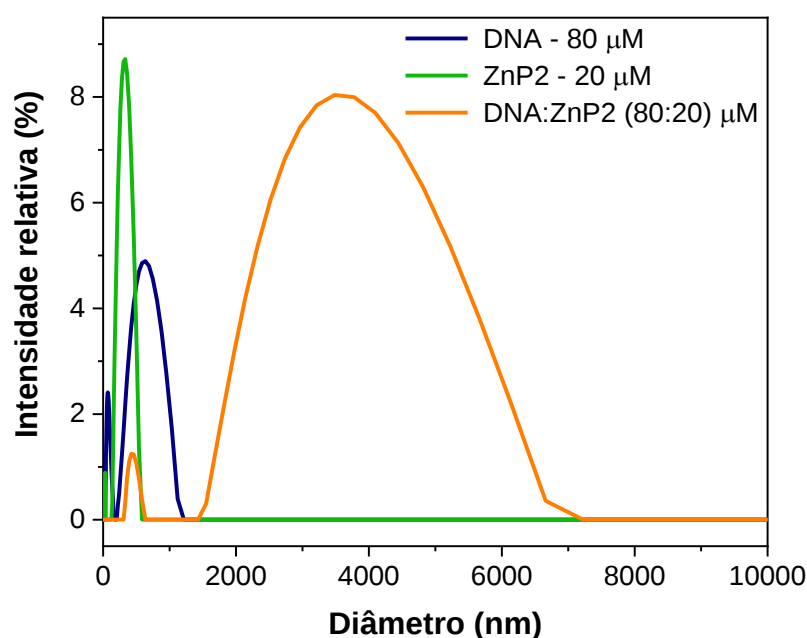


FIGURA 4.32 - Medidas da dispersão do tamanho de partículas por DLS de ct-DNA (80,0 μM ; azul), do complexo ZnP2 (20,0 μM ; verde) e da interação ct-DNA:ZnP2 (80:20 μM ; laranja).

Embora diversas técnicas clássicas de interação com DNA tenham sido aplicadas neste estudo, também foi analisado as características das soluções preparadas para a realização dos ensaios. Sendo assim, foram preparadas soluções do complexo ZnP2 em diferentes concentrações, tanto na presença quanto na ausência de ct-DNA (80,0 μM), utilizando tampão Trisma:DMF (4:1). As soluções foram incubadas por 24 horas, e comportamentos distintos foram

registrados. Na ausência de ct-DNA, observou-se um aumento na intensidade da coloração das soluções do composto ZnP2, com o aumento da concentração, FIGURA 4.33(A). Por outro lado, na presença da biomolécula, verificou-se uma maior formação de precipitados, acompanhada por uma redução da coloração da solução nas mesmas condições, FIGURA 4.33(B).

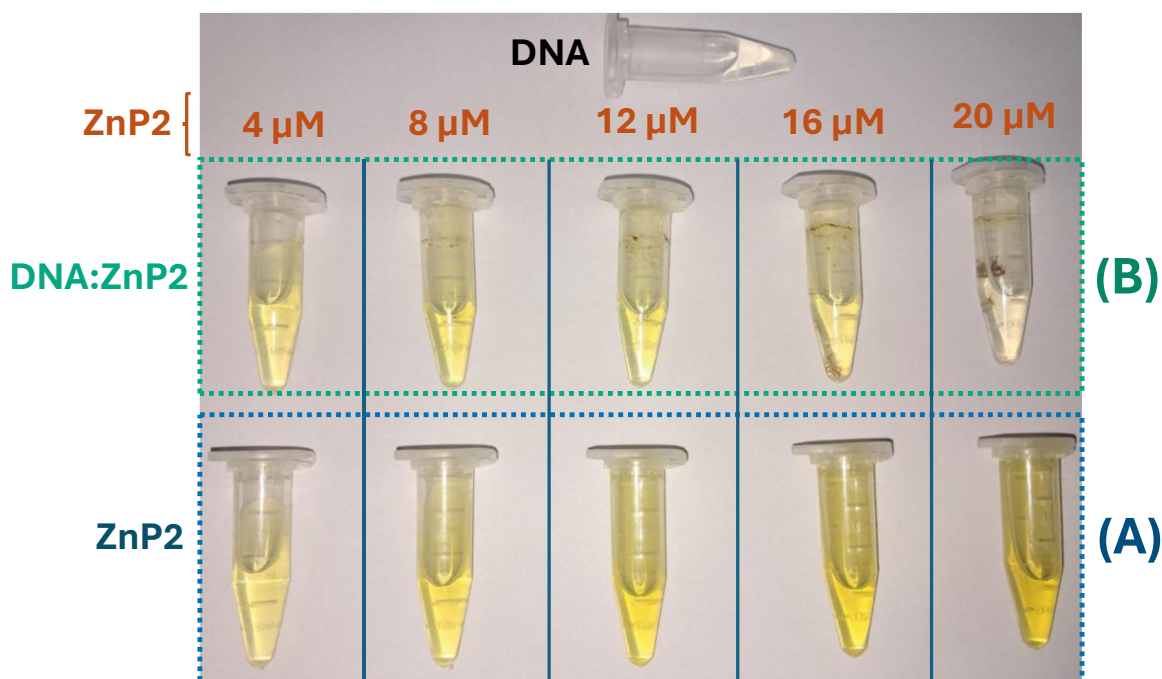


FIGURA 4.33 - Aspecto visual das soluções de ZnP2 em diferentes concentrações (4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 μM) na ausência (A) e presença de ct-DNA (80,0 μM) em tampão Trisma e 20% DMF (B), incubando por 24 horas a 37 °C.

Os ensaios realizados evidenciam, de forma inequívoca, que os compostos sintetizados neste trabalho interagem com o DNA nas condições experimentais estabelecidas. No entanto, algumas formas de interação, como a intercalação, foram descartadas com base nas características estruturais dos compostos PRAP. A distância entre as bases nitrogenadas do B-DNA é de aproximadamente 3,4 $\text{\AA}$ ⁴⁰, enquanto a largura das moléculas dos compostos PRAP é cerca de 9 $\text{\AA}$, o que inviabiliza o encaixe necessário para a intercalação. Além disso, os compostos PRAP não apresentam grupos aromáticos condensados na periferia que poderiam favorecer esse tipo de interação. Esse entendimento é corroborado pelos resultados da titulação espectrofotométrica, que não

evidenciaram deslocamentos batocrômicos característicos de ligação por intercalação. Adicionalmente, a largura dos compostos PRAP também reduz a possibilidade de interação pelo sulco menor do DNA, uma vez que a distância entre as fitas desse sulco varia entre 4,6 e 7,6 Å¹¹⁵.

A partir dessas informações, foi proposto um mecanismo simplificado para a interação entre o DNA e os compostos PRAP, conforme ilustrado na FIGURA 4.34(C). Inicialmente, a interação ocorre por meio do sulco maior ou de forças eletrostáticas, resultando na formação de adutos não específicos, um comportamento suportado pelas medidas de DLS e visualização do teste descrito na FIGURA 4.33. Posteriormente, pode ocorrer a labilização da ligação entre o piridil da porfirina e o centro metálico, seguida pela formação de uma ligação covalente entre o centro metálico e o nitrogênio N7 presente na guanossina, FIGURA 4.34(D). Este último processo foi sugerido pelo experimento de interação com guanossina utilizando RMN ³¹P{¹H}, descrito na seção 4.2.7.

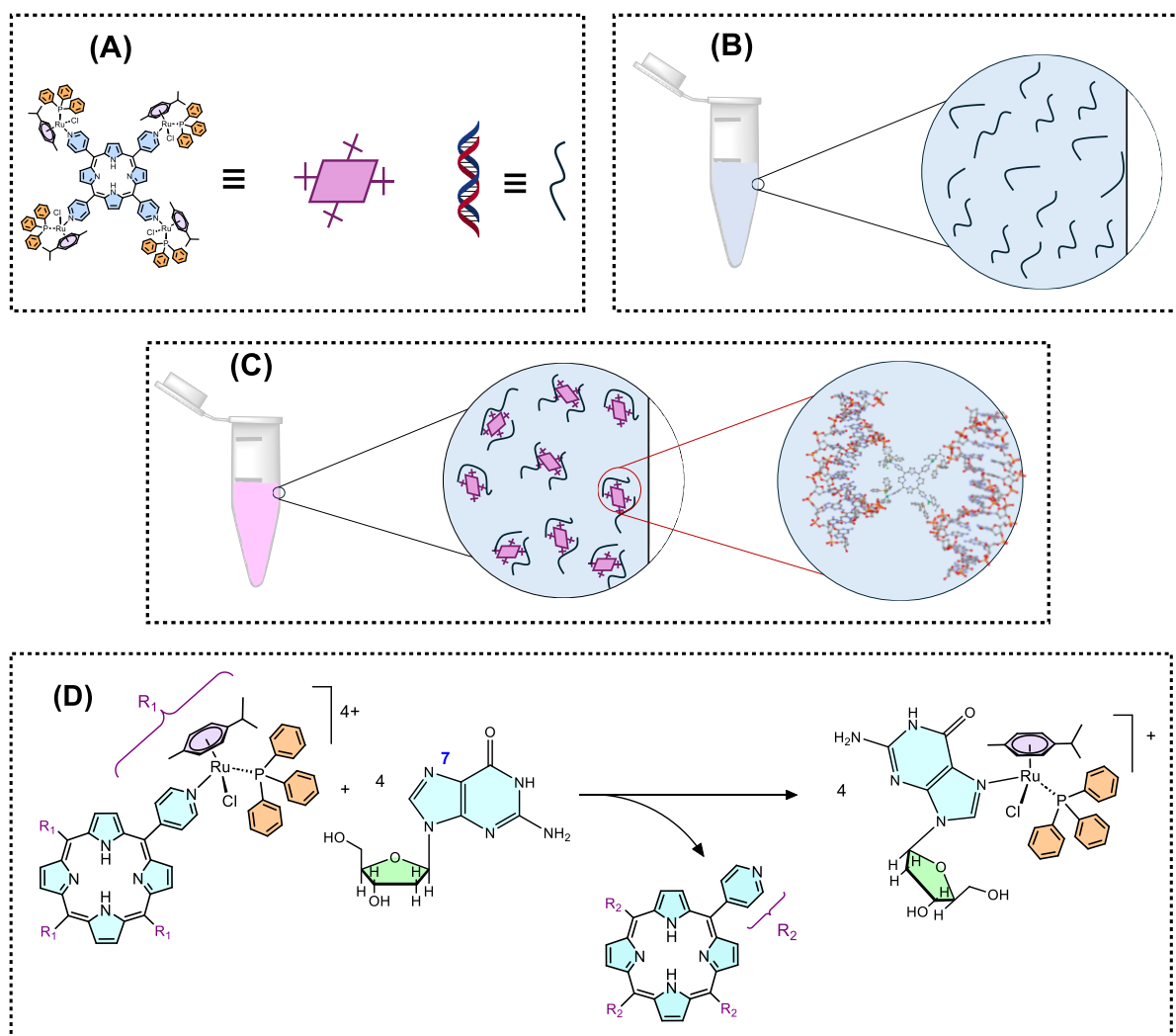
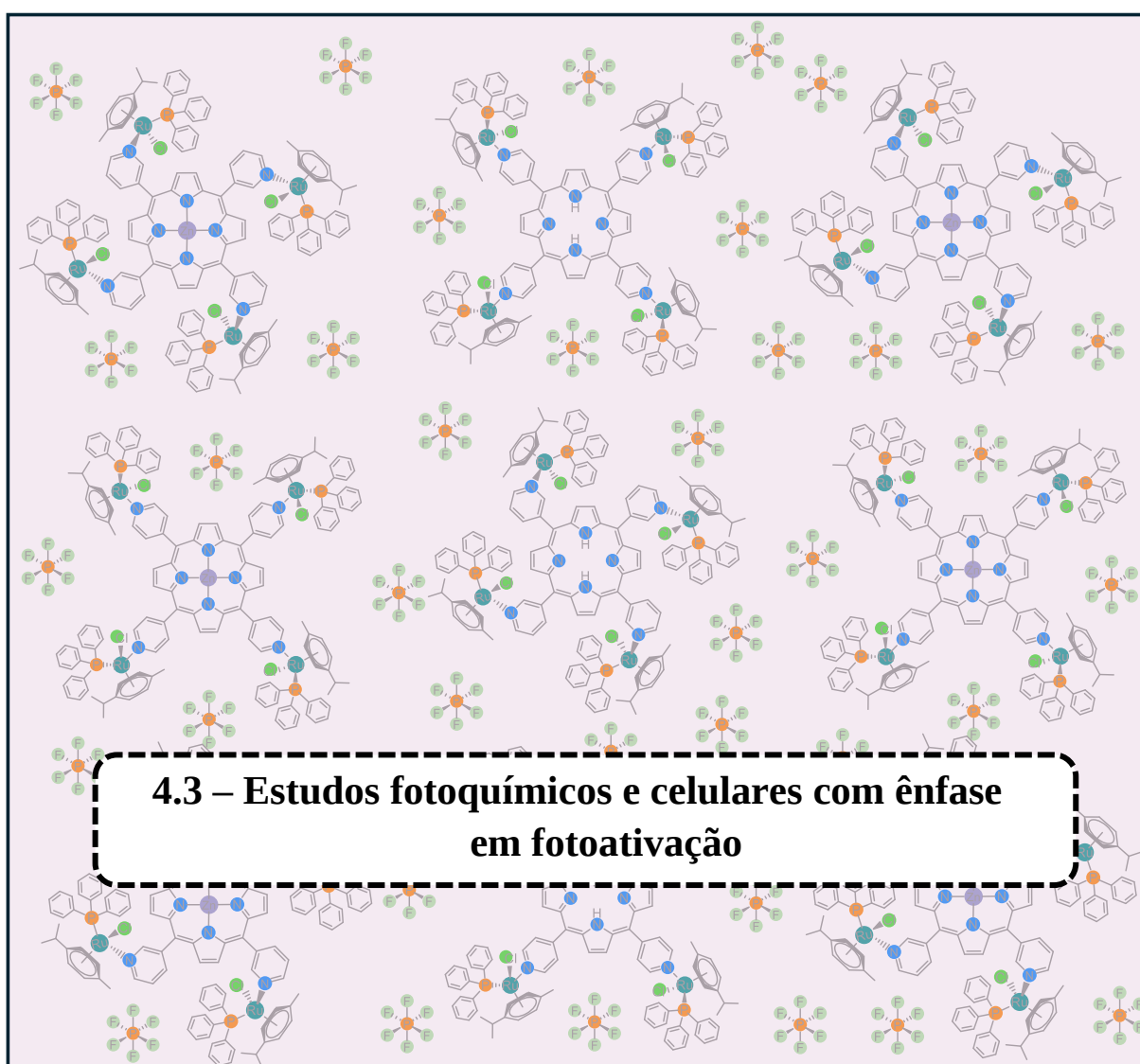


FIGURA 4.34 - Proposta de interação dos compostos PRAP com o DNA. A) representação da simplificação dos compostos PRAP e do DNA. B) Representação do DNA em solução. C) representação do DNA com os compostos PRAP promovendo a formação de adutos. D) esquema reacional dos compostos PRAP com a guanossina, como uma hipótese de ligação covalente.

Com base nos dados apresentados, os compostos PRAP demonstram grande potencial para aplicações envolvendo interação com o DNA. Na literatura, é amplamente documentado que compostos nanoestruturados, como as porfirinas tetracatiônicas sintetizadas neste trabalho, são frequentemente utilizados na formação de adutos com DNA, especialmente para a confecção de biossensores¹¹⁶. Dessa forma, esses compostos mostram-se promissores para aplicações relevantes na área de química de materiais.

Na próxima seção, será avaliada a atividade celular dos compostos PRAP, considerando sua capacidade de interagir com o DNA e potencialmente

reduzir a viabilidade celular. Adicionalmente, suas propriedades fotoquímicas serão investigadas, com o objetivo de verificar se a combinação entre os compostos PRAP e a irradiação de luz pode gerar espécies reativas capazes de promover a diminuição da viabilidade celular.



Nesta seção, serão apresentados os estudos físico-químicos relacionados à estabilidade e lipofilicidade das porfirinas tetracatiônicas. Em seguida, essas moléculas serão caracterizadas por espectroscopia de fluorescência, e sua fotoestabilidade será avaliada utilizando a fonte de irradiação aplicada nos experimentos. Por fim, serão discutidos os ensaios celulares com foco na fotoativação, incluindo testes de viabilidade celular, análises morfológicas em culturas bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D), ensaios de morte celular por citometria de fluxo, e investigações sobre possíveis danos ao núcleo celular por meio do ensaio de fotoclivagem do plasmídeo pUC19.

4.3.1 – Estabilidade por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

O estudo de estabilidade dos compostos é um teste fundamental para avaliar o comportamento dos complexos em soluções contendo diferentes solventes. Considerando que esses compostos serão utilizados em ensaios biológicos, torna-se crucial verificar a formação de subprodutos ao entrarem em contato com os solventes ou com o meio de cultura celular, como o DMEM, utilizado nesses experimentos¹¹⁷. Para isso, foi avaliada a estabilidade do composto H_2P em misturas de DMSO, acetona- d_6 e meio de cultura, empregando a técnica de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para identificar a possível formação de novas espécies químicas.

Primeiramente, foi realizado o estudo de estabilidade em acetona- d_6 em 48 horas, e o composto H_2P se mostrou estável. Porém, foi observado que o complexo H_2P proporcionou a formação de algumas espécies química, contendo fósforo em sua estrutura, após a interação com DMSO. Pelo espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foi verificado a formação de novos sinais em aproximadamente 23, 25 e 28 ppm, FIGURA 4.35.

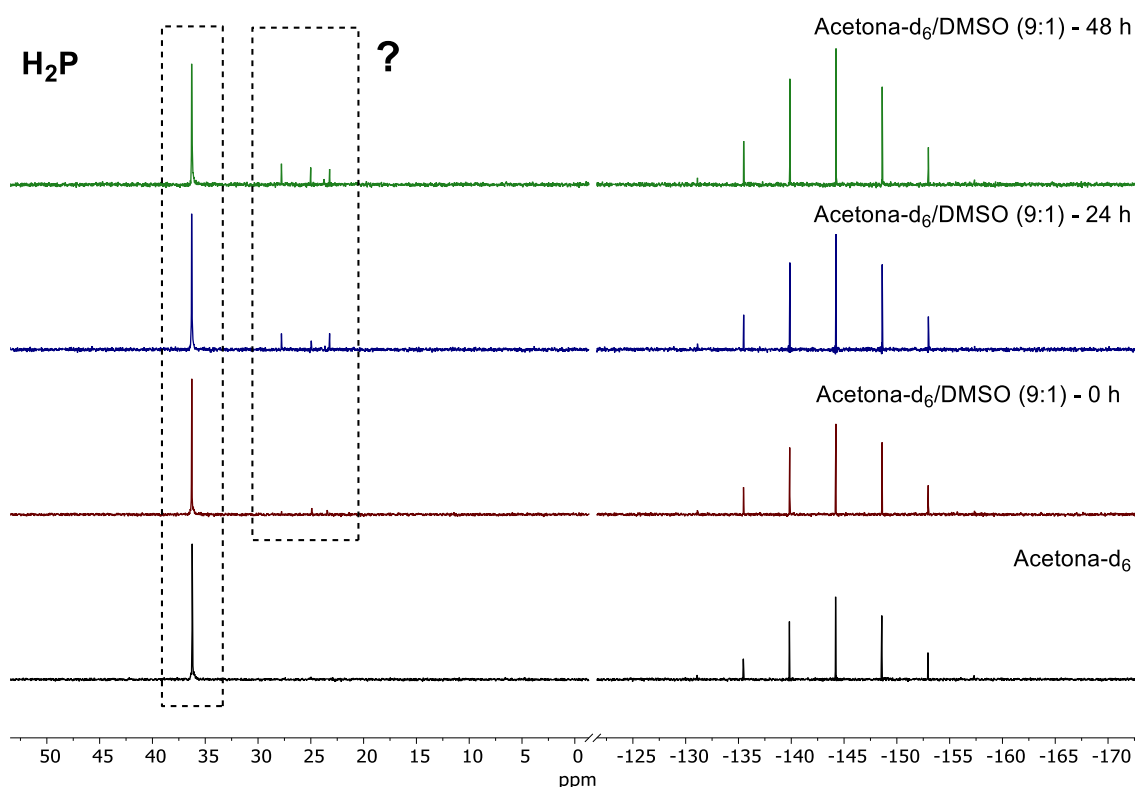


FIGURA 4.35 - Estudo de estabilidade para H_2P por RMN $^{31}P\{^1H\}$ em acetona/DMSO (9:1).

Também foi realizado o teste de estabilidade do composto H_2P em uma mistura de solventes contendo acetona- d_6 :DMEM:DMSO (85:10:5), onde foram observados quatro sinais em aproximadamente 23, 28, 33 e 41 ppm. A FIGURA 4.36 apresenta uma comparação das espécies formadas a partir do composto H_2P nos diferentes meios utilizados para os testes de estabilidade. Verificou-se que a espécie química correspondente ao sinal em aproximadamente 25 ppm é um subproduto exclusivo da presença de DMSO. Por outro lado, as espécies químicas correspondentes aos sinais em aproximadamente 23 e 28 ppm estão presentes em ambos os testes de estabilidade. Já os sinais em 41 e 33 ppm estão associados a subprodutos formados pela interação com compostos presentes no meio de cultura.

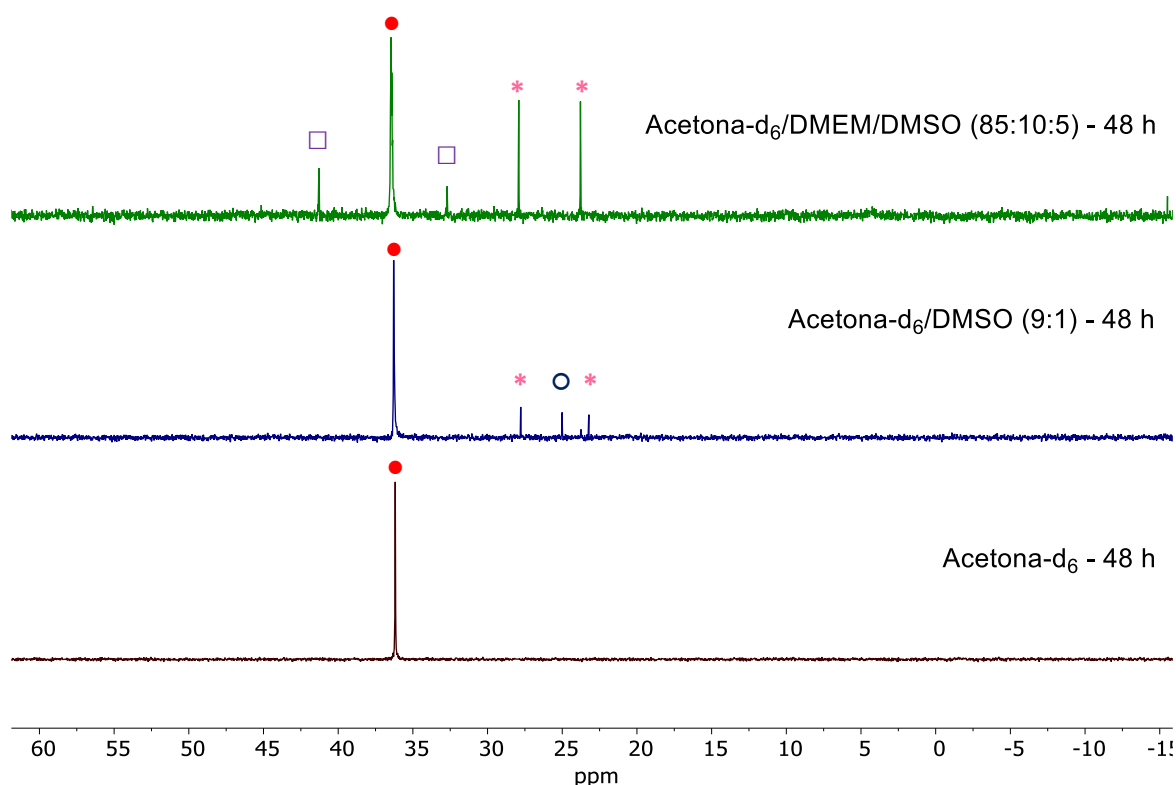


FIGURA 4.36 - Estabilidade do complexo H_2P por RMN $^{31}P\{^1H\}$ após 48 h de interação com acetona- d_6 (marrom), acetona- d_6 /DMSO (9:1) (azul), acetona- d_6 /DMEM/DMSO (85:10:5) - 48 h (verde). Com as marcações das espécies químicas presentes em cada condição.

Infelizmente, não foi possível a caracterização desses subprodutos, resultantes da instabilidade do complexo H_2P , embora tenham sido realizadas tentativas de cristalização e experimentos de HPLC acoplado à espectrometria de massas. Apesar de esses testes representarem um ponto negativo para o sistema, em um primeiro momento, a reatividade dos compostos também é uma característica importante de complexos bem-sucedidos, como os metalofármacos. Um exemplo disso é a cisplatina, que labiliza ligantes para a formação de ligações covalentes com o DNA¹¹⁸. Outro ponto relevante é que o processo de labilização de compostos pode favorecer a formação dos chamados “*Drug Deliveries*”, que são compostos responsáveis pela liberação de fármacos para interação com alvos biológicos específicos¹¹⁹. Sendo assim, essa característica confere ao sistema um potencial ainda mais desafiador e promissor para outras aplicações.

4.3.2 – Coeficiente de partição

O coeficiente de partição é uma medida físico-química que caracteriza a lipofilia de substâncias, uma característica importante que influencia as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de compostos biologicamente ativos¹²⁰. A determinação desse parâmetro pode ser realizada experimentalmente por meio da interação do composto com dois solventes imiscíveis. Como solvente hidrofílico, utiliza-se água ou uma solução tamponada¹²⁰. Por outro lado, como solvente lipofílico, utiliza-se n-octanol, que tem a capacidade de mimetizar os fosfolipídios encontrados na membrana celular^{120,121}.

Para calcular esse parâmetro, primeiramente foi realizada uma curva analítica por UV-vis dos compostos PRAP. Em seguida, os compostos foram quantificados em triplicata na fase orgânica. A concentração na fase aquosa foi obtida pela subtração da concentração total teórica pela concentração na fase orgânica^{120,122}. Por fim, o coeficiente de partição foi calculado utilizando a EQUAÇÃO 4.1:

EQUAÇÃO 4.1 – Cálculo realizado para obtenção do coeficiente de partição sendo que $[n - octanol]$ e $[H_2O]$ são as concentrações das porfirinas em n-octanol (fase orgânica) e água, respectivamente.

$$P = \frac{[n - octanol]}{[H_2O]}$$

Após obter o coeficiente de partição, foi calculado o log P, que é a grandeza que se relaciona com a lipofilicidade de uma substância. Sendo assim, neste trabalho foi verificado que os compostos PRAP apresentam valores de lipofilicidade que variam entre 0,66 e 1,04, TABELA 4.7. Esses valores de log P estão entre -1 e 5, sugerindo que os compostos apresentam boa permeabilidade na membrana celular¹²³. Adicionalmente, os valores de log P estão dentro da faixa de 0 a 3, o que indica que os compostos são biodisponíveis¹²³.

TABELA 4.7 - Logaritmo dos valores de coeficiente de partição dos compostos PRAP sintetizados nesse trabalho.

Complexo	LogP
H ₂ P	0,86
ZnP	0,66
H ₂ P2	0,73
ZnP2	1,04

4.3.3 – Estudos fotoquímicos

As porfirinas apresentam comportamento fluorescente, o que possibilita diversas aplicações, como sensores ópticos¹²⁴, células solares¹²⁵ e fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica¹²⁶. A espectroscopia de fluorescência é a técnica capaz de identificar a emissão de luz de moléculas após serem excitadas por radiação eletromagnética em comprimentos de onda na região do visível.

A partir da caracterização dos complexos do sistema PRAP, foi observado que os compostos H₂P emitem duas bandas com intensidades máximas em aproximadamente 720 e 660 nm, FIGURA 4.37(A); para os complexos ZnP, foram observadas bandas próximas a 655 e 615 nm, FIGURA 4.37(B). Os complexos derivados da H₂T3PyP apresentam o mesmo comportamento. Essas características estão de acordo com dados da literatura referentes a porfirinas em forma de base livre e metaloporfirinas de zinco(II)^{127,128}.

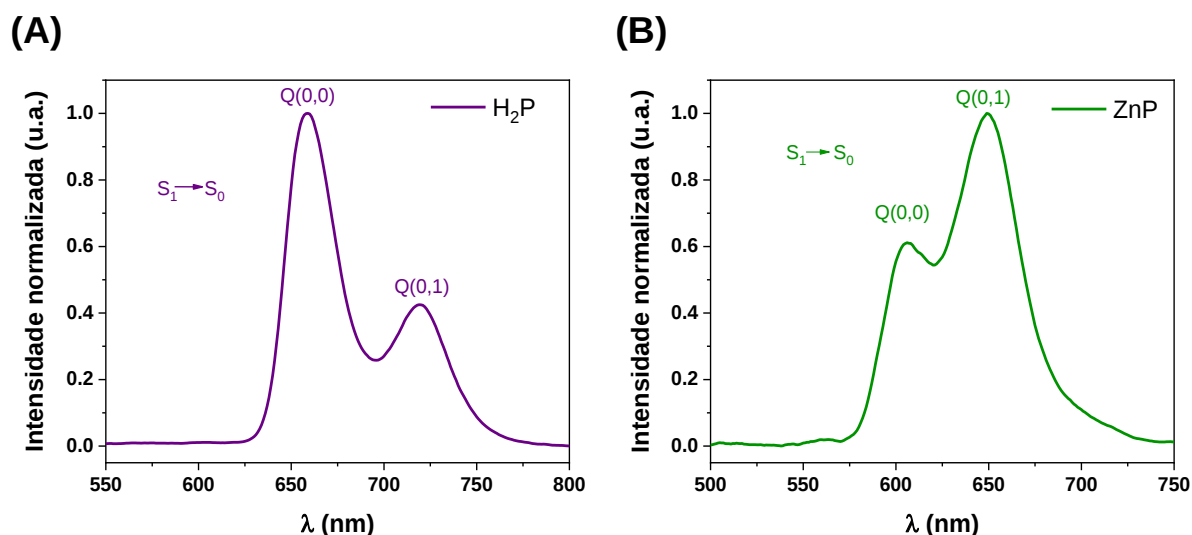


FIGURA 4.37 - Espectros de emissão dos compostos H_2P (A), e ZnP (B), utilizando diclorometano como solvente e comprimento de excitação nas respectivas bandas Soret.

Os valores de rendimento quântico foram obtidos utilizando a H_2TPP como padrão. Foi observado que os compostos derivados das bases livres proporcionaram um maior rendimento quântico quando comparados com as respectivas metaloporfirinas de zinco(II) (TABELA 4.8). Neste sistema, o zinco(II) reduz a fluorescência; no entanto, como já foi mencionado, esse cátion não provoca uma supressão total desse efeito, possibilitando o estudo de seu comportamento fotoquímico.

TABELA 4.8 - Dados de fotoluminescência em diclorometano para as porfirinas sintetizadas.

Composto	FL _{max} (nm)	ϕ_f^a
H₂P	658	0,0181
H₂P2	653	0,0140
ZnP	649	0,0042
ZnP2	660	0,0051

^a Rendimento quântico utilizando H_2TPP como padrão $\phi_{H_2TPP} = 0,13^{69,70}$.

4.3.4 – Estudo de fotoestabilidade

O estudo de fotoestabilidade é mais um teste importante para entender a eficiência de um fotossensibilizante. Muitos compostos tetrapirrólicos podem passar por um processo de fotodegradação (entre eles o fotobranqueamento), que é a diminuição da absortividade molar, fenômeno que pode ser identificado pela espectroscopia na região do UV-vis, FIGURA 4.38.

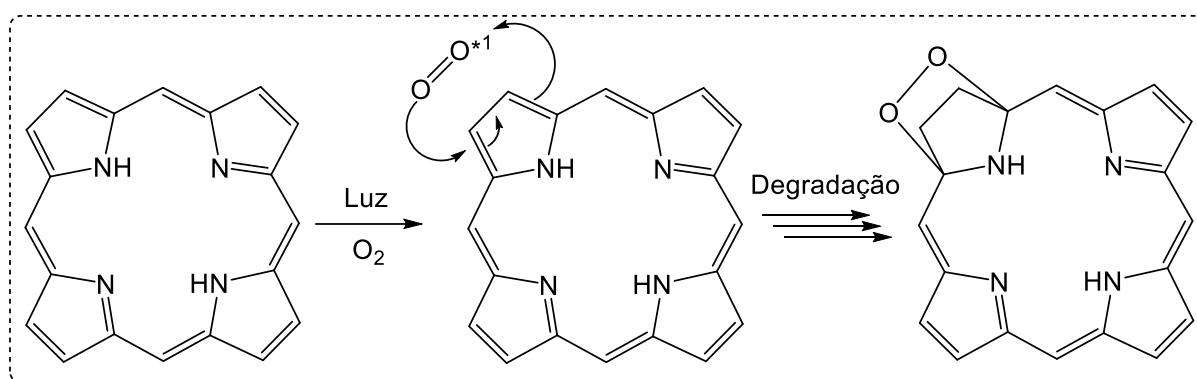


FIGURA 4.38 - Exemplo de fotodegradação de porfirina com oxigênio singlete.

A fotodegradação, no primeiro momento da aplicação de fotossensibilizantes em PDT, era compreendida como um processo indesejável. Porém, com a evolução da PDT, foi verificado que o tratamento excessivo poderia trazer alguns malefícios ao paciente⁵¹. Com isso, é importante também o desenvolvimento de compostos que podem funcionar como dosímetros, ou seja, compostos que respondem à dosagem de radiação eletromagnética, perdendo assim suas características de fotossensibilizantes⁵¹. No entanto, ambas as características ainda são importantes para o entendimento e desenvolvimento de novos fotossensibilizantes, devido às aplicações em diferentes tecidos⁵¹.

Para o composto H₂P, foi observado que, a partir da exposição à radiação eletromagnética de LED em 415 nm durante 15 minutos, ocorreu a diminuição da banda Soret em aproximadamente 15% em comparação ao espectro da solução não irradiada, FIGURA 4.39(A) e (B). Para as porfirinas de base livre,

foi observada a formação de uma nova banda entre as bandas Soret e Q, mais energética, sendo interpretada como o surgimento de uma nova espécie em solução. Para o composto ZnP, foi observada uma variação de aproximadamente 10% na banda Soret, com o passar do tempo de exposição, FIGURA 4.39(C) e (D). Com cinco minutos de exposição, a variação foi de aproximadamente 3% para todos os compostos PRAP. Pode-se considerar que, nessas condições experimentais, esses compostos se mostraram fotoestáveis.

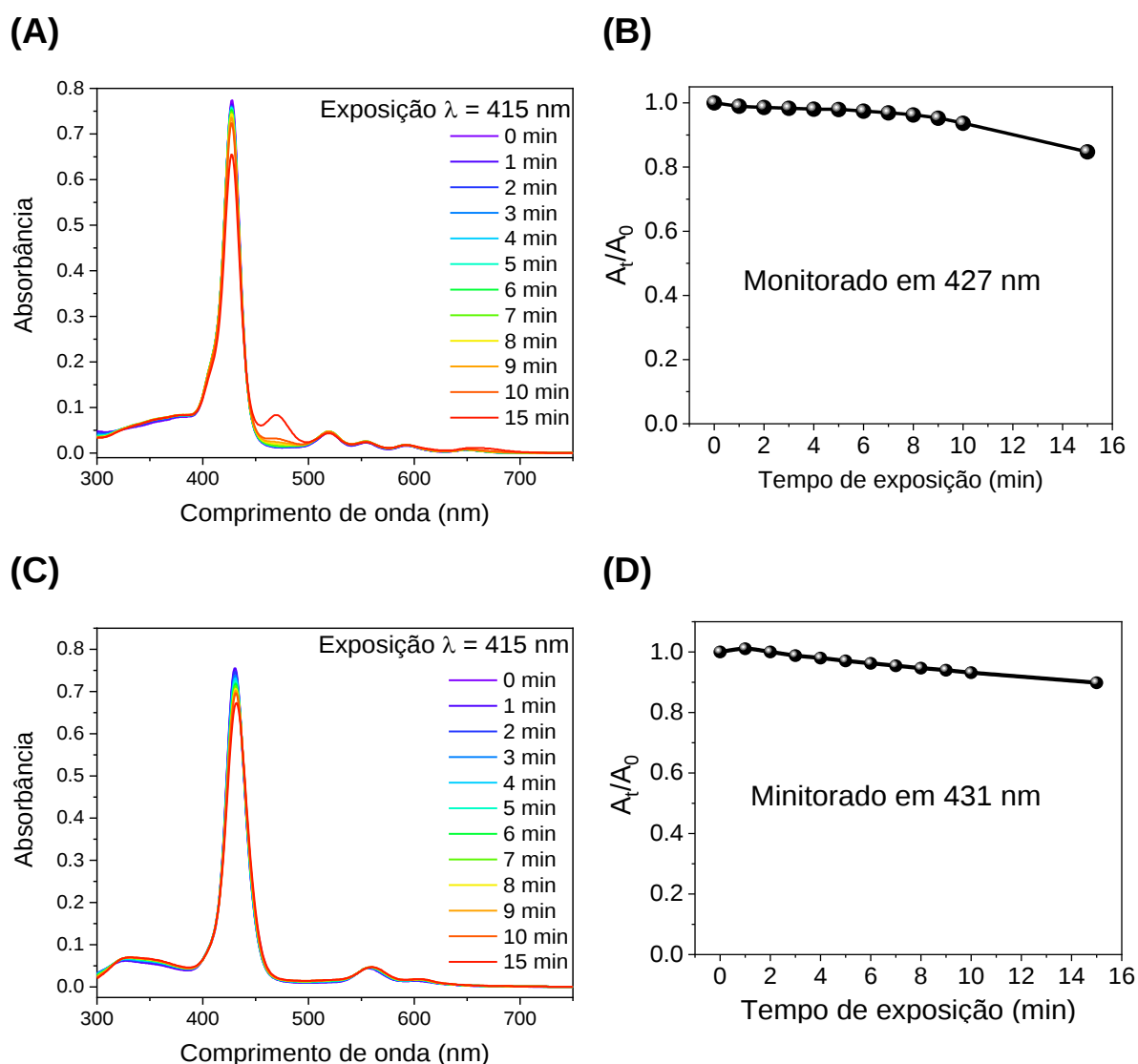


FIGURA 4.39 - Estudo de fotoestabilidade dos compostos H₂P (A) e ZnP (C) com tempo de exposição de 15 minutos, com suas respectivas curvas monitoradas na banda Soret dos compostos H₂P (B) e ZnP (D), usando diclorometano como solvente.

A partir desses resultados, observou-se que o centro metálico na cavidade da porfirina exerce pouca influência no comportamento de fotoestabilidade dentro da mesma classe de compostos sintetizados, nas condições avaliadas. Essas pequenas diferenças reforçam a viabilidade desses compostos como candidatos a novos fotossensibilizantes, ampliando as perspectivas para aplicações em diferentes linhagens celulares, derivadas de diversos tecidos do corpo. Assim, nos testes de viabilidade celular, foi adotada a dose de 5 minutos de irradiação, considerando que, nas condições experimentais realizadas, os compostos PRAP demonstraram-se fotoestáveis.

4.3.5 – Viabilidade celular

Para avaliar a toxicidade dos compostos, inicialmente foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando o método baseado em resazurina nas linhagens A2780 (tumoral de ovário) e MRC-5 (não tumoral de pulmão). A resazurina é um corante não tóxico, de coloração azul e baixa fluorescência, que sofre redução devido à atividade metabólica mitocondrial em células viáveis, formando um composto rosa de alta fluorescência¹²⁹, conforme ilustrado na FIGURA 4.40. Devido a essas características, a intensidade de fluorescência relativa é quantificada e utilizada para determinar os valores da concentração inibitória que reduz 50% da viabilidade celular (IC_{50}), em relação ao controle.

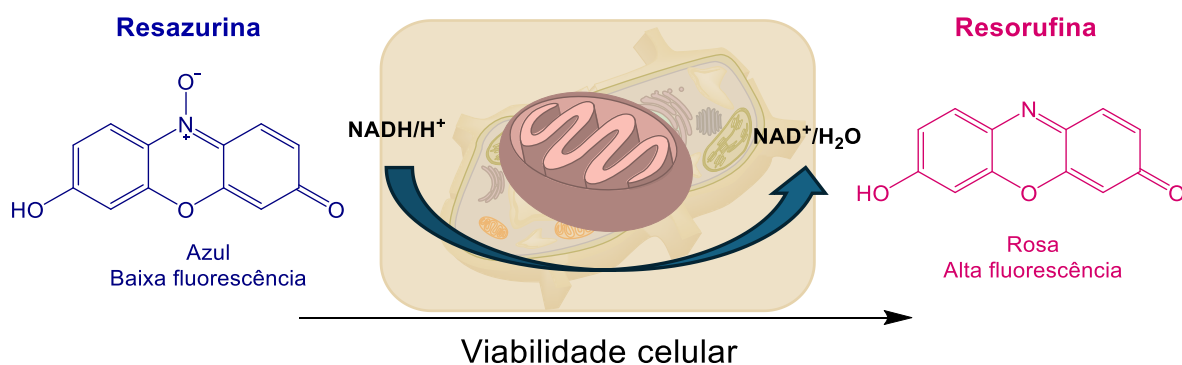


FIGURA 4.40 - Esquema ilustrativo da reação da resazurina, na mitocôndria de células viáveis, para a formação da resorufina.

Após a determinação dos valores de IC_{50} , verificou-se que os compostos não apresentam atividade em concentrações inferiores a 50 μM na linhagem não tumoral MRC-5. Esse comportamento é considerado um ponto positivo, indicando que os compostos não reduzem a viabilidade celular de uma linhagem não tumoral nas concentrações testadas.

Posteriormente, foi realizado o teste de viabilidade celular para todos os compostos de coordenação sintetizados neste trabalho, utilizando a linhagem A2780, inicialmente no escuro e com um tempo de tratamento de 48 horas. Observou-se que os compostos não apresentaram atividade em concentrações inferiores a 50 μM , com exceção dos compostos H_2P2 e Mim, que exibiram valores de IC_{50} de $12,71 \pm 2,10 \mu M$ e $16,67 \pm 2,97 \mu M$, respectivamente. Assim, esses compostos apresentam índices de seletividade de 3,9 e 2,9. Na literatura mostra que esses índices de seletividade acima de 1 ou 2 podem indicar potencialidade para estudos como possíveis agente quimioterápicos¹³⁰⁻¹³².

Após o ensaio no escuro, foi realizado o ensaio de viabilidade celular sob incidência de luz no comprimento de onda de 415 nm durante 5 minutos, correspondente a uma dose de 9 J cm^{-2} . Durante esses experimentos, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, nas quais os compostos foram adicionados. Após períodos de tratamento variáveis, de 6, 12 e 24 horas, os compostos remanescentes no meio de cultura foram removidos, seguido da adição de um novo meio de cultura antes da irradiação. Esse procedimento foi adotado para evitar que moléculas não internalizadas pela célula formassem espécies reativas no meio de cultura após a irradiação, as quais poderiam causar morte celular devido à interação dessas espécies com biomoléculas presentes na membrana celular. A variação no tempo de incubação dos compostos com as células teve como objetivo avaliar se essa variável influencia a viabilidade celular.

Para o complexo mimético, curiosamente, foi observada uma foto-inativação. Ou seja, houve um aumento do valor de IC_{50} após a irradiação, passando de $16,67 \pm 2,97 \mu M$ para valores superiores a 50 μM , conforme

apresentado na TABELA 4.9. Esse comportamento pode estar relacionado à fotodegradação do complexo Mim, resultando na formação de um composto inativo. Reações desse tipo já foram reportadas para a cisplatina, que é fotodegradada em tricloaminoplatinato(II) quando exposta a luz com comprimentos de onda inferiores a 490 nm¹³³.

Após a irradiação nos diferentes períodos de incubação, foi verificado que as porfirinas tetracatiônicas reduziram a viabilidade celular da linhagem A2780 em todos os tempos de tratamento, quando comparadas às viabilidades celulares no escuro, conforme apresentado na TABELA 4.9. Os valores de IC₅₀ variaram de superiores a 50 µM para inferiores a 25,27 ± 0,82 µM, como exemplificado pelo composto ZnP após 6 horas de tratamento.

Ao comparar os valores de IC₅₀ obtidos após 6 horas com aqueles após 12 e 24 horas de tratamento, observou-se que os compostos se tornaram mais ativos, evidenciando uma relação tempo-dependente no período de tratamento, possivelmente relacionada ao aumento da permeabilização da membrana celular¹³⁴. Além disso, verificou-se que não há diferenças significativas nos valores de IC₅₀, dentro do desvio padrão, ao comparar os períodos de 12 e 24 horas de tratamento para os compostos H₂P, H₂P2 e ZnP2. Esse resultado sugere que a permeabilização máxima dos compostos na membrana celular ocorre em algum momento entre 6 e 12 horas de incubação, embora sejam necessários outros testes celulares como o *uptake* celular tempo-dependente.

Após a obtenção de todos os valores de IC₅₀, foi possível observar que as metaloporfirinas de zinco(II) apresentaram menor atividade em comparação às porfirinas de base livre, conforme mostrado na TABELA 4.9. Esse resultado está em concordância com os estudos fotoquímicos descritos na seção 4.3.3, nos quais os valores de rendimento quântico são menores para os compostos ZnP e ZnP2 em relação aos compostos H₂P e H₂P2. Ou seja, uma vez que o composto H₂P tem maior rendimento quântico de fluorescência, a energia emitida tem uma maior possibilidade de gerar espécies reativas que são necessárias para

o aumento da fototoxicidade, quando comparado com os compostos PRAP análogos. Embora o centro metálico de zinco(II) tenha sido complexado na cavidade da porfirina, para um aumento da índice fototóxico, ou seja, realizando modificações estruturais com esse propósito, tendo como base os trabalhos do Prof. Spingler, não foi possível observar esse comportamento neste sistema.

Logo, verificou-se que o composto H₂P apresentou o maior índice fototóxico (IF), variando entre 833 e 1250, conforme demonstrado na TABELA 4.9. Com base nesses resultados, especialmente devido ao seu elevado índice fototóxico, o composto H₂P foi identificado como o mais indicado para a investigação de seu comportamento frente à linhagem celular A2780. Embora outros compostos também apresentem potencial, essa porfirina tetracatiônica exibe características fototóxicas para a principal aplicação abordada neste trabalho.

TABELA 4.9 - Valores médios de IC₅₀ em µM com os índices de seletividade e índice fototóxico para os complexos sintetizados nesse trabalho na presença e ausência de irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) linhagens A2780, MRC-5 em diferentes tempos de tratamento.

Compostos	Citotoxicidade IC ₅₀ (µM)					IS	IF ₄₁₅ ^a	IF ₄₁₅ ^b	IF ₄₁₅ ^c
	A2780 (escuro)	A2780 (415 nm) ^a	A2780 (415 nm) ^b	A2780 (415 nm) ^c	MRC-5 (escuro)				
H₂P	> 50	12,43 ±0,91	0,04 ± 0,01	0,06 ±0,01	> 50	-	> 4,0	> 1250	> 833
H₂P2	12,71 ±2,10	0,63 ±0,08	0,03 ± 0,01	0,04 ±0,01	> 50	> 3,9	20,1	> 492	> 369
ZnP	> 50	25,27 ±0,82	0,91 ±0,08	0,36 ±0,08	> 50	-	> 2,0	> 55	> 138
ZnP2	> 50	22,78 ±1,10	0,36 ±0,06	0,27 ±0,09	> 50	-	> 2,2	> 139	> 185
Mim	16,67 ±2,97	> 50	> 50	> 50	> 50	> 2,9	< 0,33	< 0,33	< 0,33

período de tratamento: ^a - 6 hora; ^b - 12 horas; ^c - 24 horas.

4.3.6 – Ensaio de morfologia celular

O ensaio de morfologia celular é fundamental para avaliar as alterações morfológicas das células após o tratamento com os compostos. Os experimentos foram realizados utilizando o composto H₂P na linhagem celular A2780.

Neste estudo, observou-se que o composto H₂P, em concentrações de $\frac{1}{4} \times IC_{50}$, $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ e IC_{50} , não modificou o formato das células nem reduziu a densidade celular em comparação ao controle negativo, corroborando os dados de viabilidade celular. Por outro lado, após a incidência de luz ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}), verificou-se que, na concentração de $\frac{1}{4} \times IC_{50}$, não houve alterações significativas na morfologia celular. Contudo, nas concentrações de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ e IC_{50} , foi observada uma alteração marcante, evidenciada pelo aumento no número de células com formato arredondado. As imagens referentes a esses resultados encontram-se nos apêndices.

Em muitos estudos, mudanças na morfologia celular são frequentemente associadas a indícios de morte celular, com conclusões baseadas em imagens obtidas por microscopia invertida^{135–137}. Essa interpretação pode ser fortalecida quando comparada ao controle. No entanto, essa análise é frequentemente evitada, pois outros processos celulares, distintos da morte celular, podem causar alterações morfológicas semelhantes. Um exemplo é o efeito da tripsina, que promove a clivagem de proteínas responsáveis pela adesão celular às placas, resultando em células com formato arredondado, mas ainda viáveis.

Sendo assim, para evitar interpretações equivocadas, foi realizado o ensaio de morfologia celular utilizando o corante PI (do inglês *propidium iodide*, ou iodeto de propídio). Esse corante catiônico interage com o DNA ao se intercalar entre as bases nitrogenadas, emitindo fluorescência vermelha em células com membranas rompidas. No entanto, o PI não permeia membranas celulares íntegras^{138–140}. Esse método é eficaz na detecção de células em necrose

e apoptose¹⁴⁰. No presente estudo, foi observado que a concentração de $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ apresentou alterações morfológicas pouco significativas quando comparada ao controle, evidenciadas por uma marcação pouco intensa das células. Contudo, ao aumentar a concentração para $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, verificou-se um aumento expressivo na intensidade de fluorescência do corante PI após o tratamento com o composto H₂P e a irradiação, confirmando seu efeito fototóxico, conforme ilustrado na FIGURA 4.41.

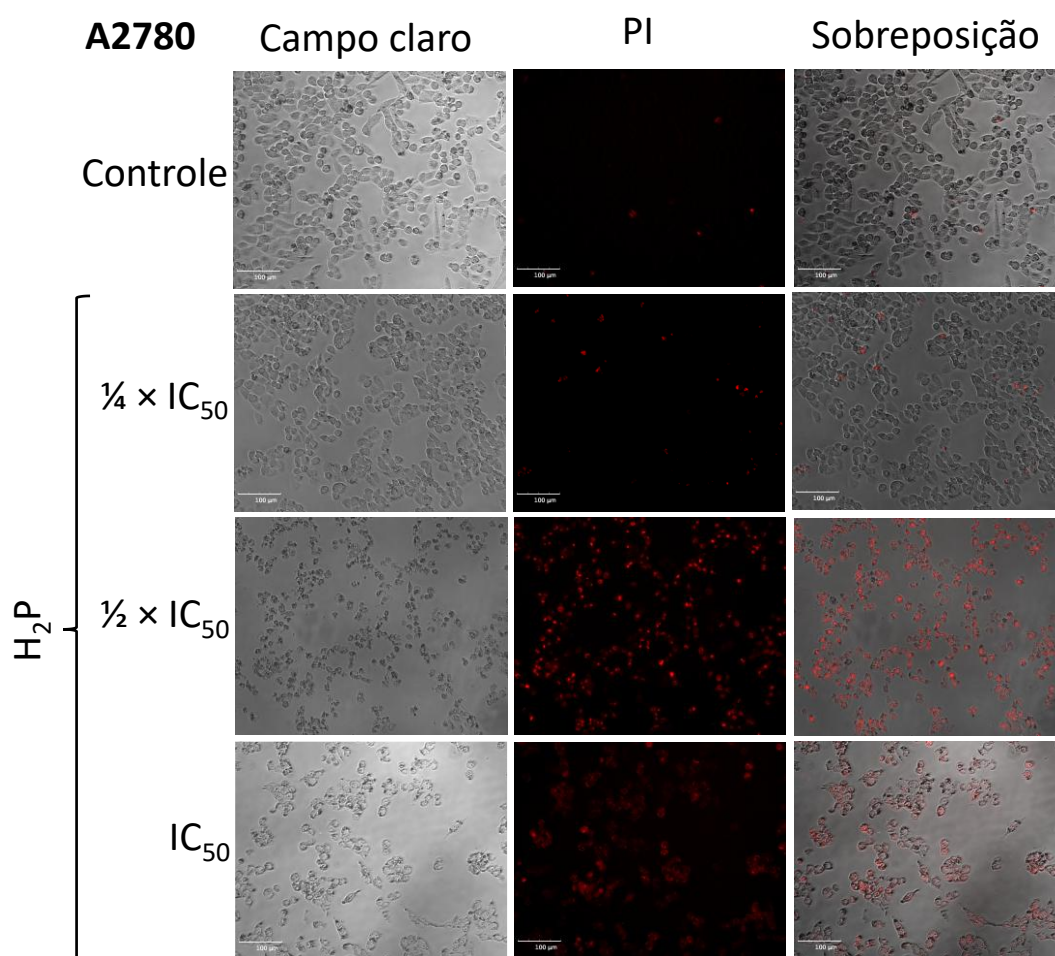


FIGURA 4.41 - Ensaio morfológico para a linhagem A2780 marcado com o corante PI (300 nM) para verificação de morte celular do controle (sem o composto H₂P) e após o tratamento com o composto H₂P nas concentrações do $IC_{50} = 0,06 \mu M$; $\frac{1}{2} \times IC_{50} = 0,03 \mu M$; $\frac{1}{4} \times IC_{50} = 0,015 \mu M$ e irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação, em campo claro, fluorescência e suas respectivas sobreposições, utilizando o equipamento CELENA[®] S.

É importante destacar que, na concentração correspondente ao IC_{50} , foi observada uma diminuição e um espalhamento da fluorescência do iodeto de

propídio, embora grande parte das células estivesse marcada. Esse comportamento sugere a possibilidade do composto H₂P estar interferindo no núcleo das células. Para investigar essa hipótese, foram realizados experimentos utilizando os corantes DAPI e *CellMask Green Plasma Membrane*, FIGURA 4.42. O DAPI é um marcador específico para núcleos celulares, enquanto o *CellMask Green Plasma Membrane* é um marcador de membrana plasmática¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

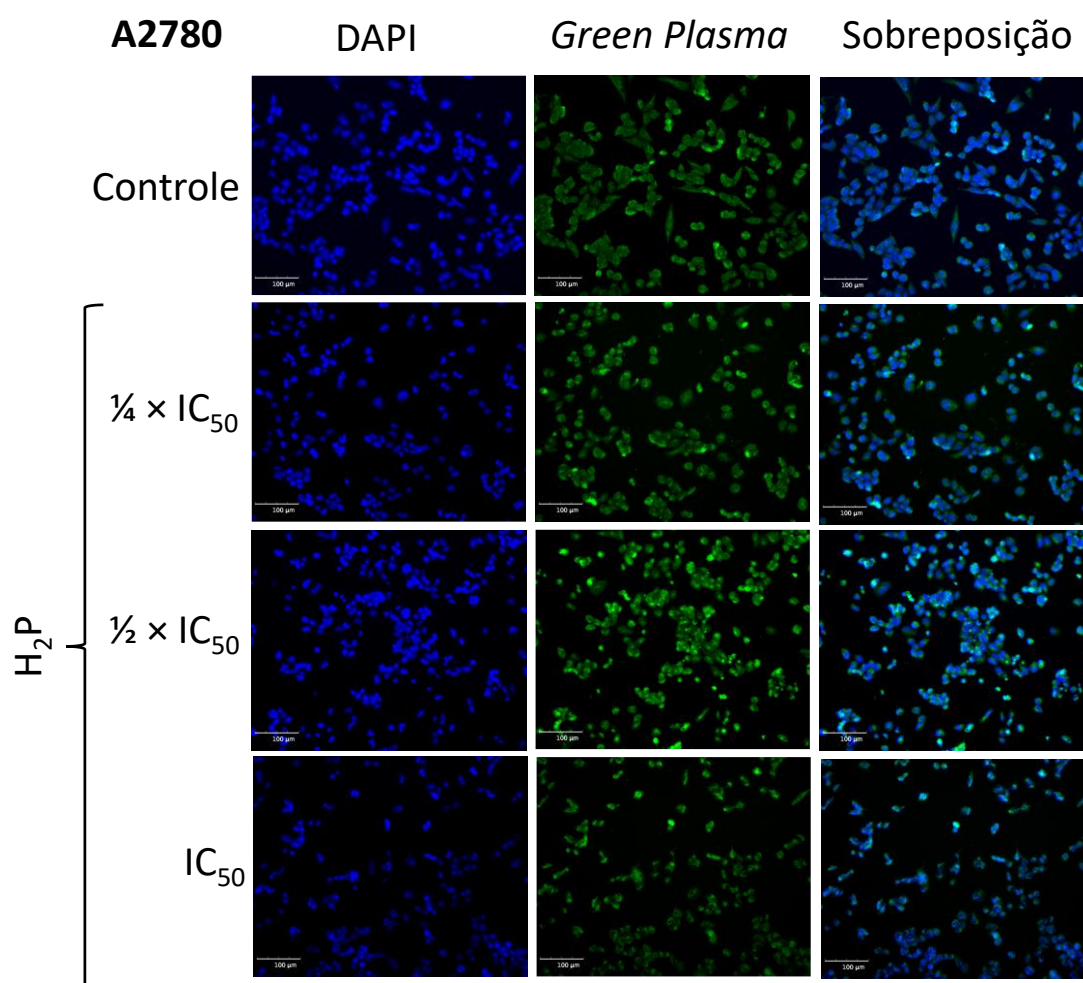


FIGURA 4.42 - Ensaio morfológico para a linhagem A2780 marcado com os corantes DAPI (para a marcação de núcleo) e *CellMask Green Plasma Membrane* (para a marcação da membrana celular) do controle (sem o composto H₂P) e após o tratamento com o composto H₂P nas concentrações do IC₅₀ = 0,06 μM; $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$ = 0,03 μM; $\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50}$ = 0,015 μM e irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação, em campo claro, fluorescência e suas respectivas sobreposições, utilizando o equipamento CELENA[®] S.

Pela FIGURA 4.42 observou-se que a membrana celular foi afetada, evidenciado pelo enrugamento das células, especialmente nas concentrações de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ e IC_{50} . No entanto, foi ainda mais evidente a alteração no núcleo das células, caracterizada pela redução da fluorescência do marcador DAPI e pelo aumento na quantidade e no tamanho das vacâncias nessas organelas, FIGURA 4.43. Assim, com base nesses indícios, que corroboram com o espalhamento da fluorescência do PI, fica claro que o tratamento com o composto H_2P , seguido de irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}), afeta significativamente o núcleo das células da linhagem A2780. Esse comportamento pode ser atribuído à geração de espécies reativas que podem reagir com o núcleo celular^{145–147}. Com essa finalidade, realizou-se o ensaio de fotoclivagem do DNA pUC19, descrito na subseção 4.3.7.

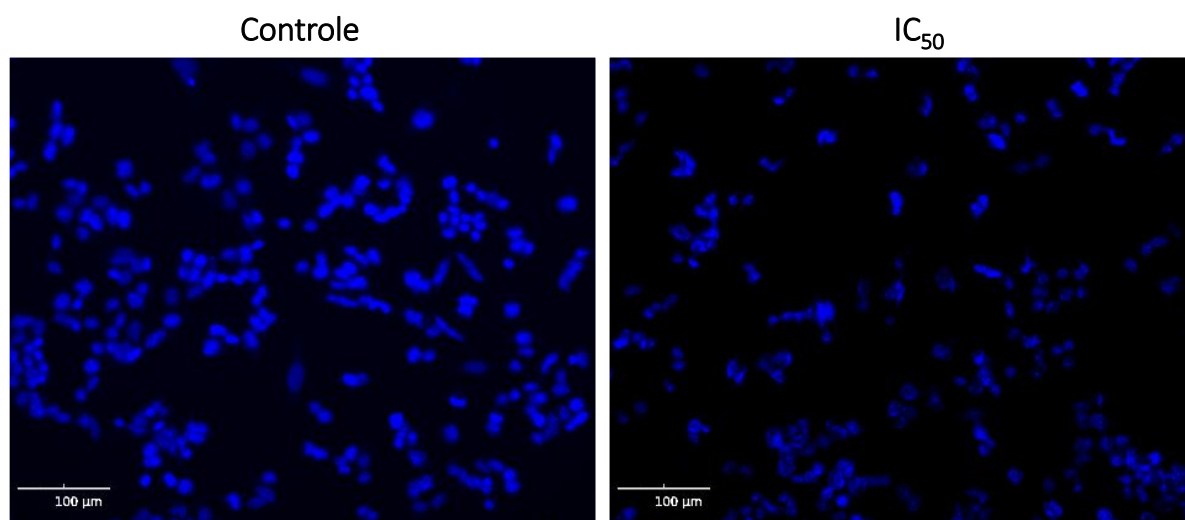


FIGURA 4.43 - Ampliação do ensaio morfológico para a linhagem A2780 marcado com o corante DAPI (para a marcação de núcleo) do controle (sem o composto H_2P) e após o tratamento com o composto H_2P na concentração do IC_{50} ($= 0,06 \mu\text{M}$ e irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2})). As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação utilizando o equipamento CELENA[®] S.

4.3.7 – Ensaio de fotoclivagem do plasmídeo pUC19

O ensaio de fotoclivagem de plasmídeo por eletroforese é amplamente utilizado para avaliar danos ao DNA^{148–153}. Esse experimento, de

maneira análoga aos ensaios realizados anteriormente, analisa a mobilidade eletroforética do plasmídeo após a adição dos compostos e posteriormente irradiação, comparando-se os resultados com os respectivos controles. Neste trabalho, foi utilizado o plasmídeo pUC19. Embora o principal objetivo tenha sido avaliar os efeitos do complexo H₂P na clivagem dessa biomolécula, todos os demais complexos sintetizados foram também testados, com o intuito de obter informações comparativas entre eles.

É importante mencionar que o composto Mim foi utilizado em uma concentração quatro vezes maior do que as porfirinas tetracatiônicas, a fim de igualar a quantidade de centros metálicos, ligantes e cargas no ensaio, conforme descrito anteriormente na seção 3.6.1.4. Na seção 4.2.4, foi observado que os compostos interagem com o plasmídeo pUC19. Assim, algumas alterações foram feitas nas condições experimentais deste ensaio: primeiramente, a concentração máxima das porfirinas tetracatiônicas e do complexo mimético foi reduzida para 1,0 µM e 4,0 µM, respectivamente; em segundo lugar, o tempo de incubação com os compostos foi diminuído para 10 minutos, seguido de mais 10 minutos de irradiação. Essas modificações foram implementadas para minimizar a interação apresentada pelos compostos.

O experimento de fotoclivagem foi realizado com um controle sem irradiação, ou seja, utilizando apenas o plasmídeo pUC19 na presença da maior concentração dos compostos e na ausência destes (controle negativo). A partir do ensaio, foi observado que os complexos Mim e H₂P2 apresentaram uma modificação na mobilidade eletroforética da banda referente à forma superenovelada nas concentrações de 4,0 µM e 1,0 µM, respectivamente. Entretanto, esse comportamento não foi observado para o complexo H₂P, indicando que ele não interage com o plasmídeo pUC19 nessas condições, FIGURA 4.44.

Após a irradiação, foi observado que o complexo Mim reduziu a intensidade da banda referente ao DNA superenovelado, embora em menor

proporção quando comparado ao respectivo controle no escuro. Esse resultado corrobora com o ensaio de viabilidade celular, no qual foi evidenciado que a irradiação pode desativar o composto, fazendo com que ele perca sua capacidade de interação com o DNA, FIGURA 4.44.

Para a porfirina H₂P2, foi observada uma diminuição mais expressiva da banda correspondente à forma superenovelada do DNA, tanto na concentração de 1,0 μ M no escuro quanto após a irradiação. Na concentração de 0,5 μ M, esse comportamento foi menos intenso; no entanto, foi observado um aumento na banda referente ao DNA linear. Como mencionado anteriormente, o aumento dessa banda no experimento de mobilidade eletroforética está associado à possibilidade de clivagem do DNA, FIGURA 4.44.

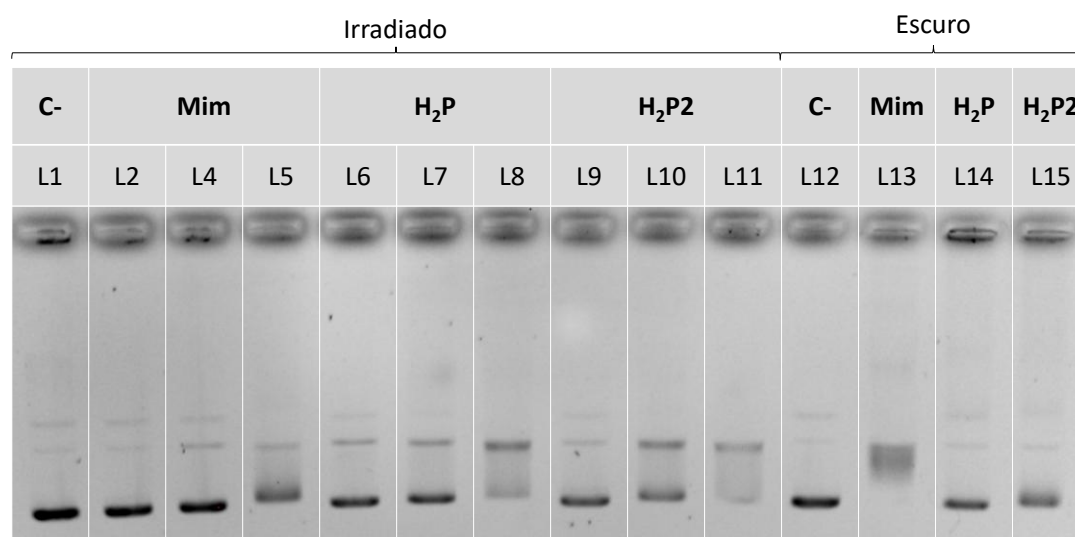


FIGURA 4.44 - Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 irradiado durante 10 minutos usando irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 60 mW cm^{-2} , 18 J cm^{-2}) e 10 % de DMF. Sendo que L1 ou C- é o controle negativo contendo plasmídeo (0,25 μ g) e DMF. Para o complexo Mim foram variadas as concentrações, seguindo a ordem: L2 = 0,4; L3 = 2,0; L4 = 4,0 μ M. Para o complexo H₂P (L6 = 0,1; L7 = 0,5; L8 = 1,0 μ M) e H₂P2 (L9 = 0,1; L10 = 0,5; L11 = 1,0 μ M). Sem irradiação ou no escuro tem L12 ou C- é o controle negativo (plasmídeo e DMF), L13 = complexo mimético (4,0 μ M), L14 = H₂P (1,0 μ M) e L15 = H₂P2 (1,0 μ M).

Para o complexo H₂P, foi observada uma situação similar à mencionada para o complexo H₂P2. Quando comparadas as concentrações de 1,0 μ M no escuro, irradiadas e o controle negativo, foi percebida uma diminuição e um aumento na intensidade das bandas do DNA superenovelado e linear,

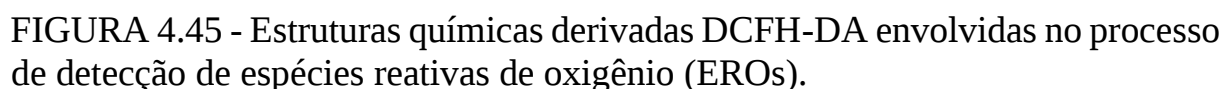
respectivamente. Sendo assim, fica evidente que as porfirinas tetracatiônicas, apesar de interagirem com o DNA, promovem o efeito de clivagem da biomolécula nas concentrações testadas. Por outro lado, o complexo Mim apresenta o efeito oposto.

É importante ressaltar que esses resultados corroboram perfeitamente com o ensaio de viabilidade celular e os ensaios morfológicos, possibilitando a formação de uma hipótese em que o DNA e o núcleo podem ser os principais alvos após a combinação dos compostos e a irradiação. Para apoiar essa possibilidade, ainda são necessários mais ensaios biológicos e biomoleculares; porém, existem indícios iniciais que suplementam essa suspeita.

4.3.8 – Ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os dados obtidos indicam que o composto H₂P exibe atividade capaz de promover a clivagem do DNA após irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). Conforme discutido na Seção 1.4, as porfirinas são compostos que podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) sob essas condições, atuando por meio dos mecanismos de tipo I e tipo II.

Embora sejam necessários diversos testes experimentais para determinar a preferência desses compostos por um mecanismo específico, é possível avaliar, de forma geral, a formação de EROs¹⁵⁴. Para esse propósito, foi utilizado o composto DCFH-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína), amplamente empregado na detecção dessas espécies químicas. Após permeabilizar a membrana celular, o DCFH-DA sofre hidrólise, removendo os grupos acetato em meios alcalinos, formando o DCFH (diclorodihidrofluoresceína)¹⁵⁴. Em seguida, na presença de espécies reativas de oxigênio, o DCFH é oxidado a DCF (2',7'-diclorofluoresceína), que emite fluorescência na região do verde¹⁵⁴, FIGURA 4.45. Esse comportamento pode ser monitorado por espectroscopia de fluorescência ou microscopia de fluorescência.



Os resultados obtidos evidenciam que o composto H₂P é capaz de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio intracelular. A geração dessas espécies está diretamente associada à indução de morte celular e aos danos nucleares observados, os quais são decorrentes da fotoclivagem do DNA.

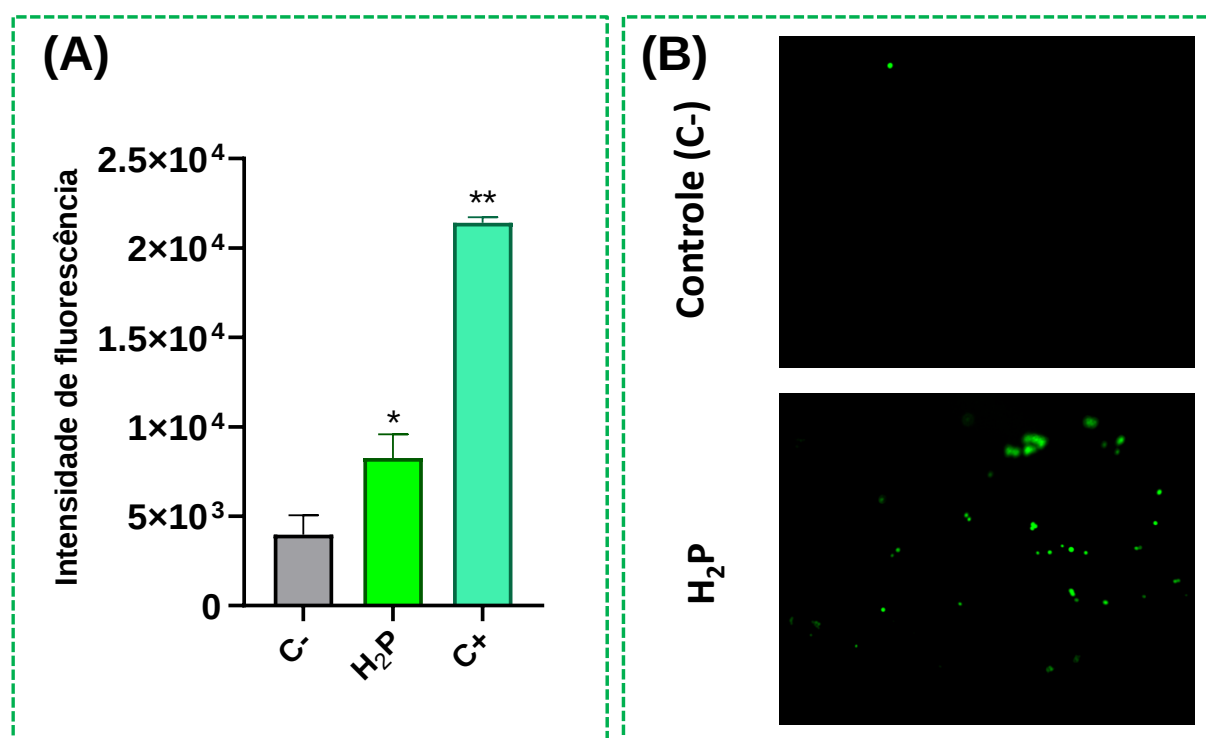


FIGURA 4.46 - Ensaio de espécies reativas de oxigênio após o tratamento com o composto H₂P na concentração do IC₅₀ = 0,06 μ M, controle negativo (DMSO) e controle positivo (H₂O₂), seguido de irradiação (λ_{irrad} = 415 nm, 30 mW cm⁻², 9 J cm⁻²). A) Intensidade de fluorescência relativa utilizando o fluorímetro Synergy/H1-Biotek B) As imagens foram adquiridas 48 horas após a irradiação utilizando o equipamento CELENA[®] S.

Após compreender os aspectos químicos e biológicos relacionados à formação de espécies reativas de oxigênio, bem como as estruturas celulares e organelas envolvidas na diminuição da viabilidade celular, a subseção 4.3.9 será investigado o tipo de morte celular induzido na linhagem A2780 após o tratamento fotodinâmico.

4.3.9 – Ensaio de morte celular por citometria de fluxo

O processo de morte celular pode ser diferenciado a partir de mudanças na morfologia e bioquímica, que são características intrínsecas da linhagem celular. Os processos de apoptose e necrose são os mais conhecidos de morte celular^{155,156}. A morte celular por apoptose, também chamada de morte celular programada, apresenta alterações morfológicas características, como

retração celular, enrugamento e formação de corpos apoptóticos. A necrose, por sua vez, promove o aumento celular e extravasamento do conteúdo intracelular devido ao processo inflamatório. Esse processo normalmente é desencadeado por um choque súbito (calor, radiação, hipoxia, etc)¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

A partir do ensaio morfológico marcado com PI descrito na seção 4.3.6, já foi verificado que o composto H₂P induz a morte celular da linhagem A2780 após a irradiação no comprimento de onda de 415 nm. Para avaliar o tipo de morte celular, foi realizado o ensaio de morte celular por citometria de fluxo utilizando Anexina V, que é uma proteína muito utilizada para marcar morte celular por vias apoptóticas, gerando fluorescência, e 7-AAD (7-*aminoactinomycin D*), um marcador fluorescente utilizado para marcar morte celular por necrose.

Após a realização do experimento, é fornecido um gráfico que mostra os eventos relacionados com as contagens das células. Para a morte celular, são verificados quatro quadrantes, apresentados na FIGURA 4.47, em que: o quadrante I está relacionado com o duplo negativo para o ensaio de morte celular, ou seja, as células viáveis; o quadrante II está relacionado com o negativo para o 7-AAD e positivo para a Anexina, interpretado como células em processo de apoptose recente; no quadrante III, está relacionado com o duplo positivo, ou seja, células em apoptose tardia, também chamada de necrose secundária; no quadrante IV, está relacionado com o positivo para o 7-AAD e negativo para a Anexina, interpretado como células em processo de necrose, ou necrose primária^{158,159}.

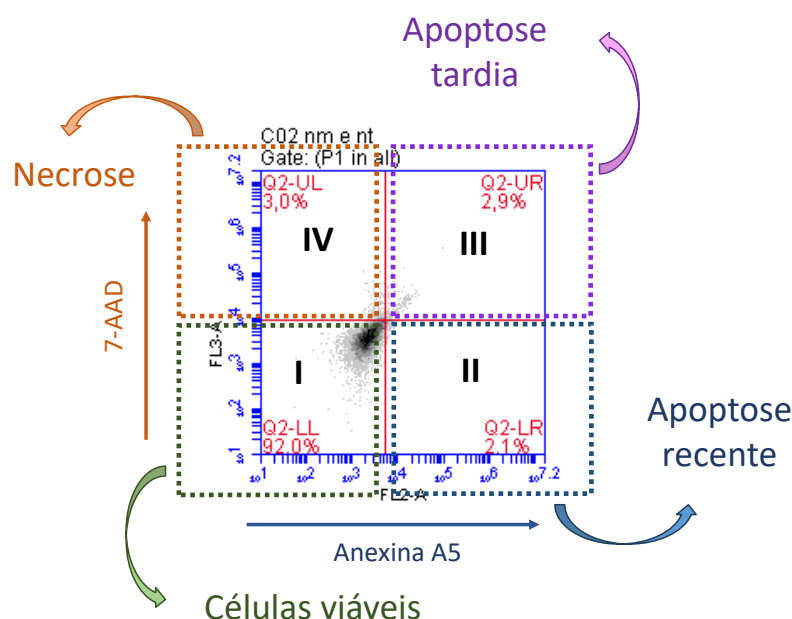


FIGURA 4.47 - Representação de um gráfico de eventos obtido por citometria de fluxo destacando os quadrantes: I – células vivas (anexina-V-/7-AAD-); II – apoptose recente (anexina-V+/7-AAD-); III – apoptose tardia (anexina-V+/7-AAD+); IV – necrose (anexina-V-/7-AAD+).

A partir do experimento, foi verificado que o controle (células da linhagem A2780, sem o tratamento) apresentava 92% dos eventos no quadrante I, referente às células viáveis. Após o tratamento com o composto H₂P na concentração de $\frac{1}{4} \times IC_{50}$, foi percebido um aumento na quantidade de eventos nos quadrantes II e III. Essa tendência foi observada nas concentrações de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, porém, na concentração de IC_{50} e $2 \times IC_{50}$, houve um aumento mais expressivo da quantidade de eventos, chegando a 99%, no quadrante III, FIGURA 4.48.

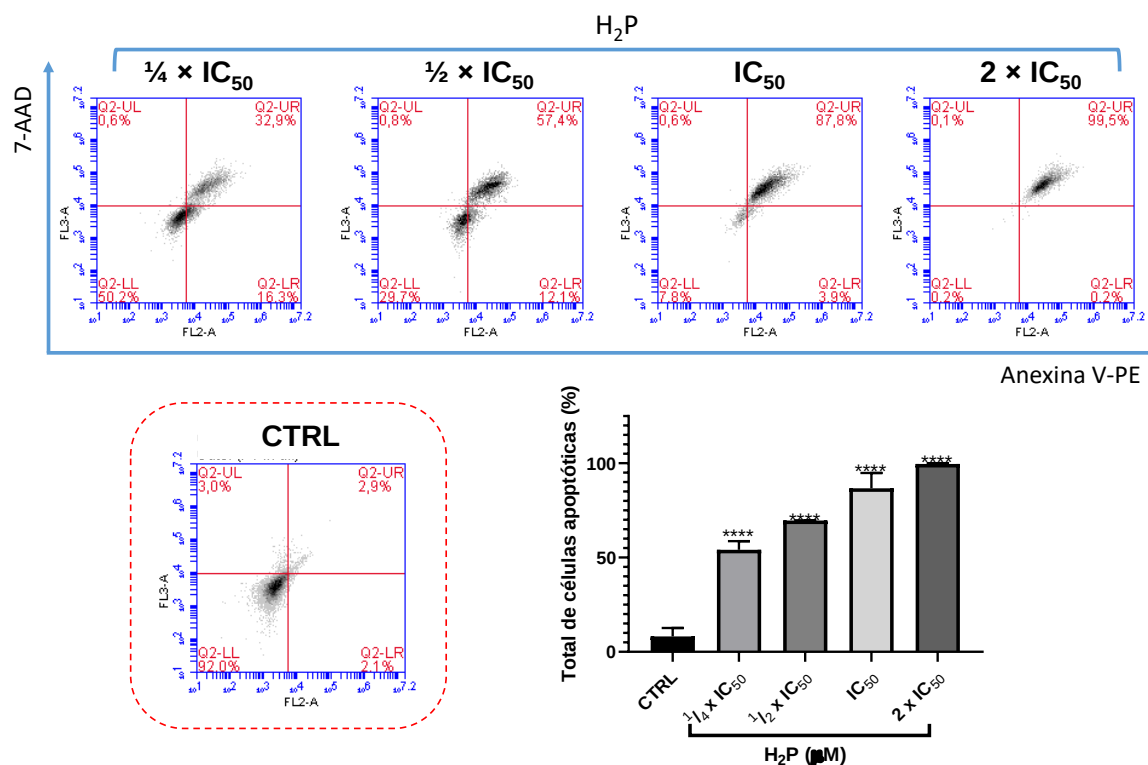


FIGURA 4.48 - Gráfico de eventos obtido por citometria de fluxo do controle (sem o composto H₂P) e após o tratamento com o composto H₂P nas concentrações do 2 × IC₅₀ = 0,12 μM; IC₅₀ = 0,06 μM; 1/2 × IC₅₀ = 0,03 μM; 1/4 × IC₅₀ = 0,015 μM e irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm⁻², 9 J cm⁻²). Gráfico em barras do total de células em apoptose. Células vivas (anexina-V-/7-AAD-); apoptose recente (anexina-V+/7-AAD-); apoptose tardia (anexina-V+/7-AAD+); necrose (anexina-V-/7-AAD+). Nível de significância **** p < 0,0001.

Como mencionado anteriormente, esse quadrante está relacionado com células em apoptose tardia; esse processo também é chamado de necrose secundária. Sendo assim, é um processo de morte celular que apresenta características morfológicas específicas e deve ser considerado como um resultado natural de um processo completo de apoptose^{160,161}. É importante mencionar que, para a terapia fotodinâmica, os processos de morte celular por necrose e apoptose estabelecem funções importantes no tratamento⁵¹. Como a PDT é um tratamento controlado, o processo inflamatório, proveniente de morte celular por necrose, estimula o sistema imunológico e ajuda o paciente a se recuperar da enfermidade⁵¹. Por outro lado, os processos apoptóticos são mais desejáveis em tecidos que são menos suscetíveis ao inchaço decorrente de inflamação, por exemplo, nos cânceres de cérebro⁵¹.

Embora o mecanismo de morte celular ainda necessite de uma investigação mais aprofundada, este experimento possibilita a realização de testes celulares em linhagens derivadas de tecidos mais sensíveis ao processo de morte celular descontrolada, como é o caso dos cânceres cerebrais.

4.3.10 – Análise morfológica em cultura celular 3D

Todos os ensaios realizados neste trabalho, até o momento, foram conduzidos utilizando o cultivo celular em duas dimensões (2D), também denominado monocamada. Embora esse modelo apresente diversas vantagens, como facilidade de manutenção e baixo custo, ele também possui algumas limitações^{162,163}. Entre essas desvantagens, destacam-se: I) interações reduzidas entre células e entre células e matriz extracelular; II) as células aderem apenas a uma superfície e migram em uma direção única; III) a ausência de complexidade celular e a falta de simulação da rede microambiental tumoral¹⁶⁴.

Com o objetivo de minimizar essas limitações, o cultivo celular em três dimensões (3D) oferece benefícios em comparação com o cultivo em monocamada. Entre as principais vantagens do cultivo em 3D, destacam-se: I) a reprodução da arquitetura tridimensional; II) a maior interação célula-célula e célula-matriz extracelular; III) a migração celular em três dimensões; IV) a relevância para o estudo da resistência a medicamentos^{162,164-166}. Por outro lado, o cultivo em 3D apresenta algumas desvantagens, como o custo elevado e a maior complexidade do modelo experimental.

Em face do exposto, o cultivo em 3D surge como um modelo capaz de reduzir a lacuna de complexidade entre o cultivo em monocamada e o sistema biológico de tumores em animais. Além disso, os esferoides (conjuntos de células cultivadas em 3D) apresentam diferentes camadas, denominadas zona de proliferação (ZP, camada externa), zona quiescente ou de hipóxia (ZQ, camada intermediária) e zona necrótica (ZN, camada interna)¹⁶⁷, FIGURA 4.49. Essas zonas estão relacionadas à disponibilidade de nutrientes, oxigênio e à

concentração de dióxido de carbono e resíduos celulares. A ZP, ZQ e ZN apresentam, respectivamente, quantidades decrescentes de oxigênio e nutrientes, e crescentes de CO_2 e excretas¹⁶⁷, conforme mostrado na FIGURA 4.49.

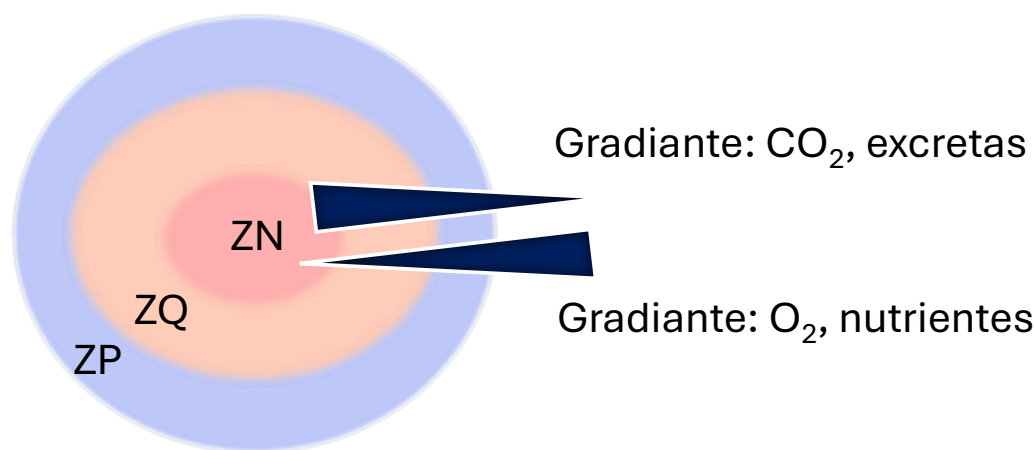


FIGURA 4.49 - Composição do esferoide e gradientes de concentração de CO_2 /excretas e O_2 /nutrientes na zona de proliferação (ZP, camada externa), zona quiescente ou de hipoxia (ZQ, camada intermediária) e zona necrótica (ZN, camada interna). Adaptado de Brajša¹⁶⁷

Um dos métodos utilizados para a formação de modelos 3D é a levitação magnética. Esse processo envolve a adição de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, que não são tóxicas, as quais se ligam eletrostaticamente às células e não induzem processos inflamatórios. Após a incorporação das nanopartículas, aplica-se um campo magnético, gerado por ímãs, que provoca a levitação das células. Após poucas horas, ocorre a interação célula-célula, promovendo a formação de esferoides^{162,163,168}.

Neste trabalho, foi realizado um ensaio morfológico na linhagem celular A2780 após tratamento com o composto H_2P nas concentrações de IC_{50} , $2 \times \text{IC}_{50}$, $10 \times \text{IC}_{50}$, $20 \times \text{IC}_{50}$ e $40 \times \text{IC}_{50}$, seguido de irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) em cultura 3D, utilizando o processo de levitação magnética. O experimento foi monitorado ao longo de 8 dias, em intervalos de coleta a cada 2 dias, FIGURA 4.50(A).

A partir do ensaio, foi possível observar que os esferoides, na ausência do composto, apresentaram um aumento significativo no diâmetro,

passando de aproximadamente 400 μm no início do tratamento para cerca de 640 μm após 8 dias, FIGURA 4.50(B). No segundo dia após a irradiação, as menores concentrações resultaram em um leve aumento no tamanho dos esferoides. A partir do quarto dia, observou-se uma leve diminuição no tamanho dos esferoides, em comparação ao controle, indicando que o tamanho não foi dependente da concentração utilizada, FIGURA 4.50(B). Dessa forma, a concentração de 0,06 μM mostrou ser suficiente para estabilizar o volume dos esferoides.

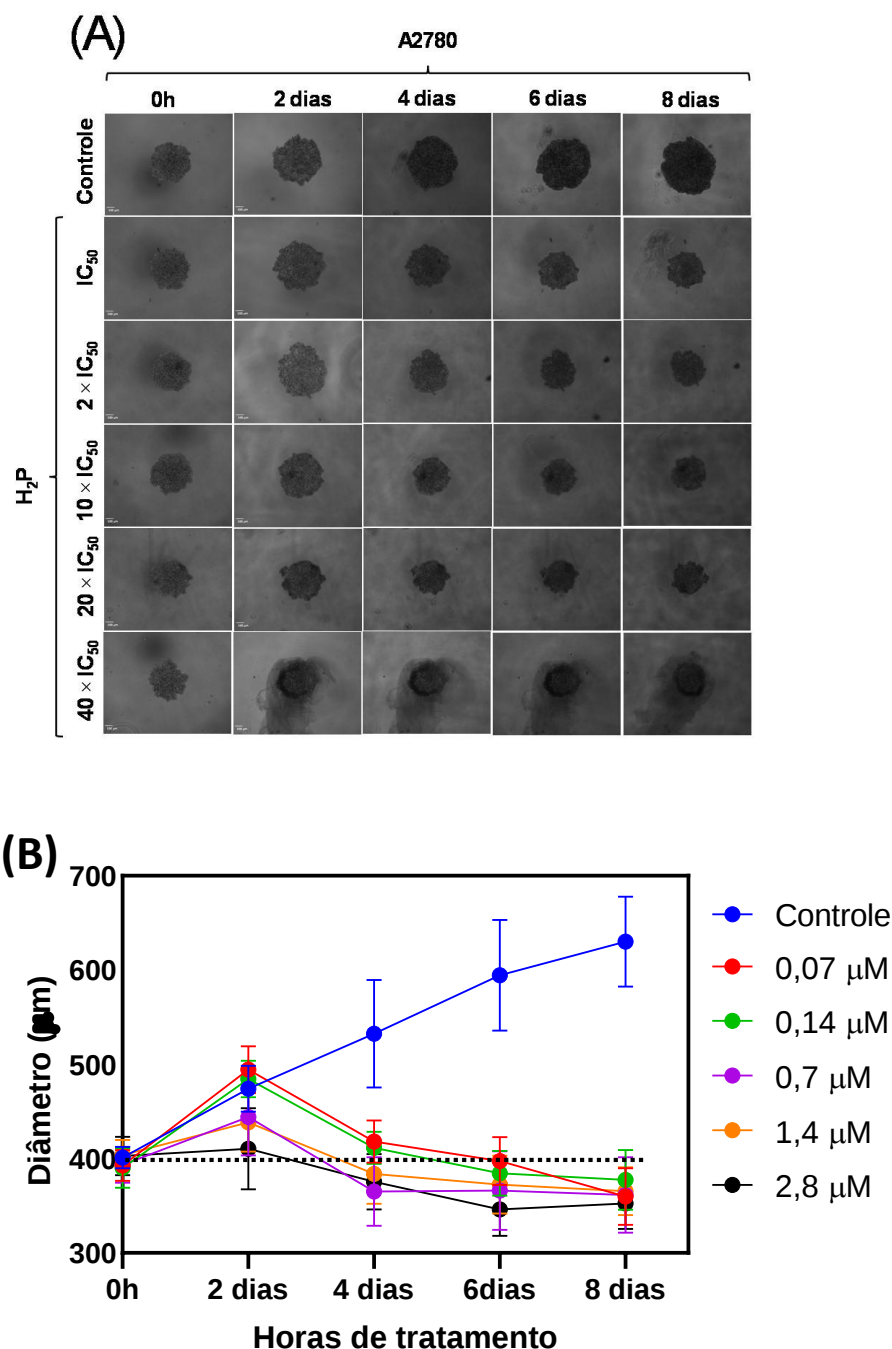


FIGURA 4.50 - (A) Ensaio morfológico na linhagem A2780, sem e com o tratamento do composto H₂P nas concentrações do IC₅₀ = 0,06 µM; 2 × IC₅₀ = 0,12 µM; 10 × IC₅₀ = 0,60 µM; 20 × IC₅₀ = 1,2 µM; 40 × IC₅₀ = 2,4 µM seguido de irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) em cultura 3D pelo processo de levitação magnética. O experimento foi acompanhado de 0 a 8 dias, em intervalos de 2 dias. (B) Relação do diâmetro dos esferoides à variação de tempo. As imagens foram obtidas com o microscópio CELENA[®] S com zoom de 4x.

Em seguida, foi avaliada a morfologia dos esferoides, marcados com DAPI e PI, no último dia de tratamento. Observou-se um aumento na quantidade

de células mortas com o aumento da concentração. Na concentração de $40 \times IC_{50}$, a maior concentração de células mortas foi observada na zona de proliferação, FIGURA 4.51.

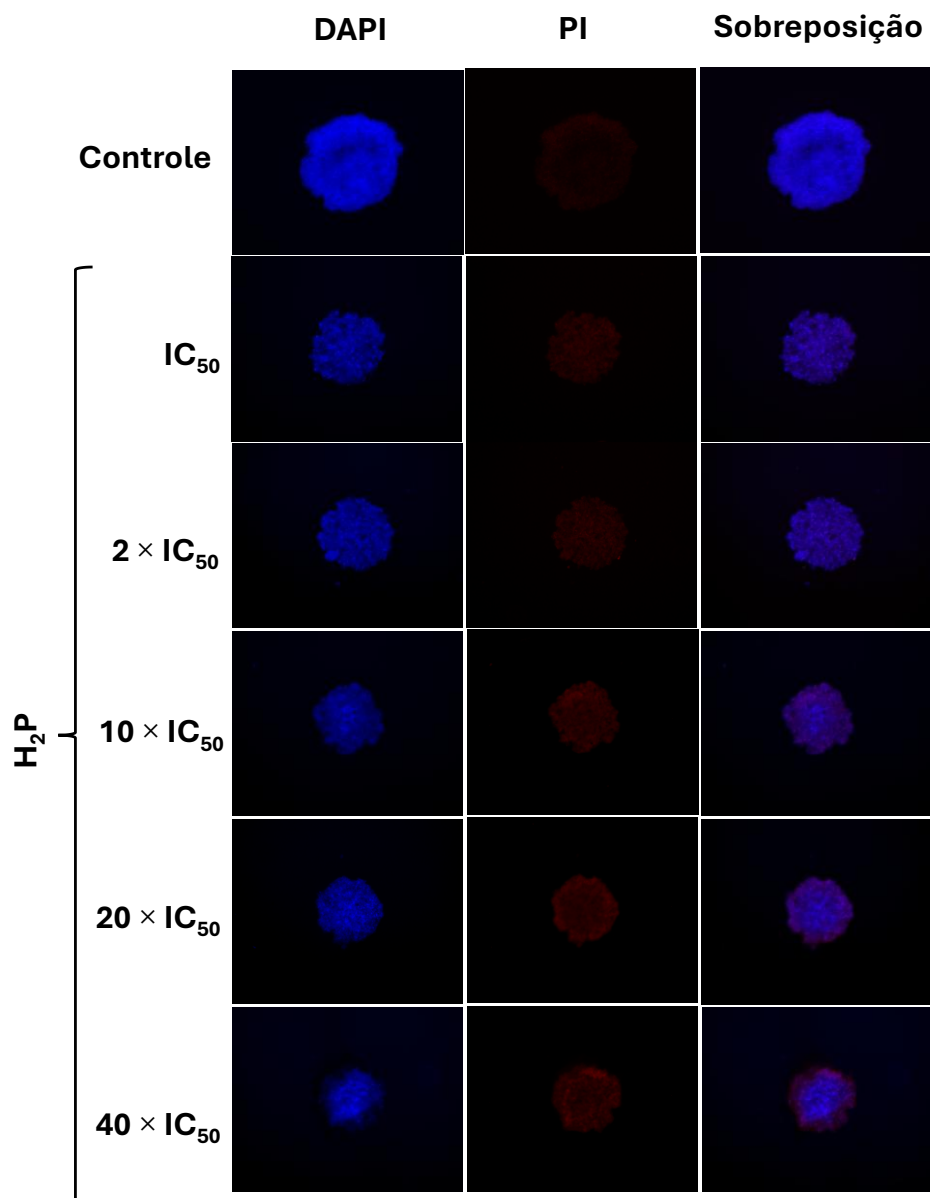
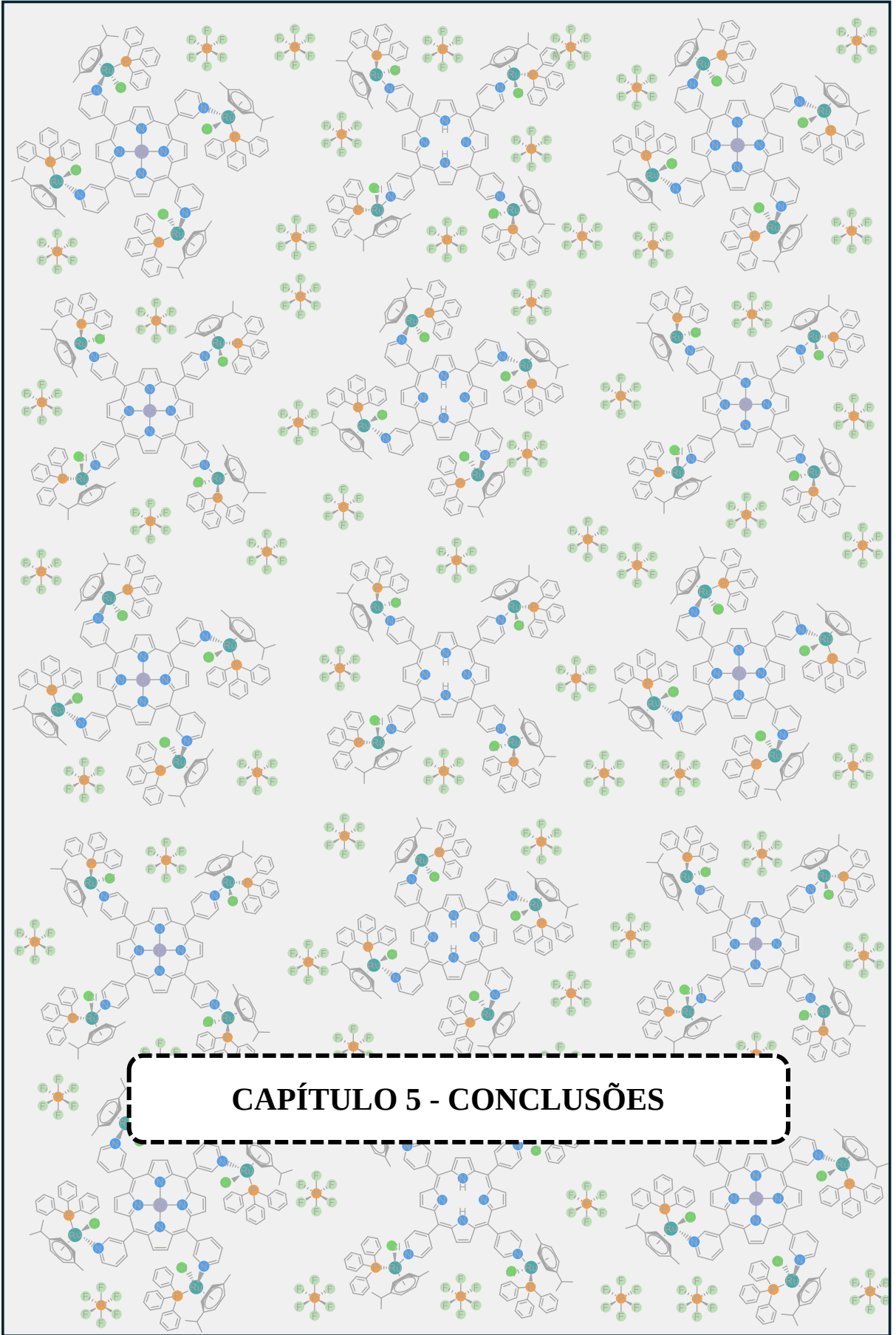


FIGURA 4.51 - Ensaio morfológico na linhagem A2780 marcado com PI e DAPI, sem e com o tratamento do composto H_2P nas concentrações do $IC_{50} = 0,06 \mu M$; $2 \times IC_{50} = 0,12 \mu M$; $10 \times IC_{50} = 0,60 \mu M$; $20 \times IC_{50} = 1,2 \mu M$; $40 \times IC_{50} = 2,4 \mu M$ seguido de irradiação ($\lambda_{irrad} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) em cultura 3D pelo processo de levitação magnética, após 8 dias. As imagens foram obtidas com o microscópio de fluorescência CELENA® S com zoom de 4x.

É importante ressaltar que este experimento permite levantar algumas hipóteses que necessitam de mais dados químicos, bioquímicos e celulares para confirmação. Em primeiro lugar, pode ser que o composto não tenha conseguido penetrar de forma eficaz em todo o esferoide, o que teria comprometido a eficácia do tratamento com o composto e a irradiação. Por outro lado, a irradiação no comprimento de onda de 415 nm (luz azul) pode não ser suficientemente eficaz para a penetração necessária na terapia fotodinâmica, conforme discutido na seção 1.4⁵¹. No entanto, o tratamento com o composto H₂P seguido de irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}) foi capaz de estabilizar o tamanho do esferoide, devido à morte celular na zona de proliferação¹⁶⁷, caracterizando um efeito de inativação fotodinâmica (PDI).

The background of the page is a repeating pattern of chemical structures. These structures include large, complex molecules with multiple fused and linked rings, some containing blue and green atoms. Interspersed among these are smaller, simpler molecules, some of which are green and others orange. The pattern is dense and covers the entire page.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados explorados neste trabalho, conclui-se que os compostos foram formulados para apresentar múltiplas possibilidades de interação com o DNA, atribuídas ao arcabouço molecular das porfirinas tetracatiônicas. As interações por meio do sulco maior, promovendo a formação de aglomerados e, subsequentemente, a ligação covalente, foram investigadas por diversas técnicas experimentais. Além disso, a partir das dimensões das moléculas obtidos por DFT, caso elas se encontrassem no vácuo, possivelmente não ocorreria uma interação dos compostos PRAP via intercalação ou sulco menor do DNA, devido ao impedimento estérico.

Embora todas as porfirinas tetracatiônicas tenham demonstrado interação com o DNA, o composto ZnP2 destacou-se como a estrutura mais promissora para essa interação. Esse resultado foi evidenciado pela redução mais acentuada da fluorescência nos sistemas DNA-Hoechst e DNA-Laranja de Tiazol, além do decréscimo na intensidade das bandas positivas e negativas nos espectros de dicroísmo circular.

Os testes realizados evidenciaram a relevância do arcabouço molecular das porfirinas tetracatiônicas na interação com o DNA, uma vez que o complexo mimético não apresentou modificações significativas em todos os ensaios conduzidos com essa biomolécula, mesmo contendo a mesma quantidade de ligantes no centro de rutênio(II) e cargas. Além disso, ficou claro que os periféricos de rutênio(II) desempenham um papel importante na possibilidade de formação de ligações covalentes, especialmente quando comparados às porfirinas e o complexo mimético.

Por outro lado, observou-se que os complexos derivados das bases livres apresentaram maiores índices de fototoxicidade em comparação às suas metaloporfirinas análogas de zinco(II). Para a realização de experimentos celulares adicionais, foi escolhido o composto H₂P, devido aos seus índices de fototoxicidade mais elevados dentre os compostos sintetizados. O complexo

mimético, por sua vez, mostrou uma redução na atividade citotóxica e na capacidade de fotoclivagem do plasmídeo pUC19.

Os experimentos celulares adicionais tiveram como objetivo compreender a atuação do arcabouço estrutural do complexo H₂P na linhagem celular A2780. Verificou-se que os núcleos dessas células foram afetados pelo tratamento fotodinâmico, devido à formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a apoptose foi identificada como o mecanismo predominante de morte celular, conforme demonstrado pelo ensaio de citometria de fluxo. Adicionalmente, observou-se que o tratamento fotodinâmico com o composto H₂P induziu morte celular preferencialmente na zona de proliferação do esferoide, evidenciando sua aplicabilidade na inativação fotodinâmica.

É importante ressaltar que este trabalho não resultou em melhorias diretas nos fotossensibilizantes ou na interação de compostos com DNA. No entanto, ele pode representar um marco na química bioinorgânica, ao expandir o estudo de uma nova classe de compostos e fornecer suas primeiras investigações em duas aplicações clássicas das porfirinas tetracatiônicas: interação com o DNA e fototoxicidade. Além disso, embora sejam necessários experimentos adicionais para esclarecer outras questões relacionadas ao sistema, os ensaios realizados nesta pesquisa contribuem para uma compreensão aprofundada da interação com o DNA e da fototoxicidade dos novos compostos PRAP.

Por fim, este trabalho reúne diferentes abordagens podendo ser utilizado como referência no estudo de porfirinas tetracatiônicas, destacando seu papel como fotossensibilizantes e sua capacidade de interagir com o DNA. Essas propriedades conferem a esses compostos um potencial para diversas aplicações. Além disso, este estudo proporciona interfaces entre diferentes áreas da Química, como Química Bioinorgânica, Fotoquímica e Química Supramolecular.

REFERÊNCIAS

1. SAINI, A.; KUMAR, M.; BHATT, S.; SAINI, V.; MALIK, A. “Cancer Causes and Treatments.” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2020, *11* (7), 3121.
2. KRETSCHMER, M.; RÜDIGER, D.; ZÄHLER, S. “Mechanical Aspects of Angiogenesis.” *Cancers*, 2021, *13* (19), 4987.
3. Gerstberger, S.; Jiang, Q.; Ganesh, K. “Metastasis.” *Cell*. Elsevier B.V. April 13, 2023, pp 1564–1579.
4. BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. “Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024, *74* (3), 229–263.
5. INCA, B. *Estimativa 2023: Incidência de Câncer No Brasil*; Rio de Janeiro: , 2022.
6. *NCD mortality and morbidity*. World Health Organization. https://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/ (accessed 2020-04-07).
7. DEBELA, D. T.; MUZAZU, S. G. Y.; HERARO, K. D.; NDALAMA, M. T.; MESELE, B. W.; HAILE, D. C.; KITUI, S. K.; MANYAZEWAL, T. “New Approaches and Procedures for Cancer Treatment: Current Perspectives.” *SAGE Open Medicine*, 2021, *9*, 1–10.
8. BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. “Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy.” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, *21*, 3233.
9. KAPPER, C.; OPPELT, P.; ARBEITHUBER, B.; GYUNESH, A. A.; VILUSIC, I.; STELZL, P.; REZK-FÜREDER, M. “Targeting Ferroptosis in Ovarian Cancer: Novel Strategies to Overcome Chemotherapy Resistance.” *Life Sciences*, 2024, *349*, 122720.
10. CHEN, K.; ZHAI, Y.; WANG, Y.; XU, Z.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z.; ZHENG, X.; LIN, F. “H₂O₂ Promotes Photodynamic Efficacy of TMPyP4 against Ovarian Cancer in Vitro by Downregulating HIF-1 α Expression.” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2024, *177*, 117110.
11. NYGREN, P. “What Is Cancer Chemotherapy?” *Acta Oncologica*, 2001, *40* (2), 166–174.
12. MIDGLEY, R. S. J.; KERR, D. J. “Adjuvant Therapy.” *BMJ*, 2000, *321*, 1208–1211.
13. ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. “Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents.” *Nature*, 1969, *222* (5191), 385–386.
14. JIN, S.; GUO, Y.; GUO, Z.; WANG, X. “Monofunctional Platinum(II) Anticancer Agents.” *Pharmaceuticals*, 2021, *14* (2), 133.

15. JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. "Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage." *Chemical Reviews*, 2007, *107* (5), 1387–1407.
16. ZHANG, C.; XU, C.; GAO, X.; YAO, Q. "Platinum-Based Drugs for Cancer Therapy and Anti-Tumor Strategies." *Theranostics*, 2022, *12* (5), 2115–2132.
17. JIA, P.; OUYANG, R.; CAO, P.; TONG, X.; ZHOU, X.; LEI, T.; ZHAO, Y.; GUO, N.; CHANG, H.; MIAO, Y.; ZHOU, S. "Review: Recent Advances and Future Development of Metal Complexes as Anticancer Agents." *Journal of Coordination Chemistry*, 2017, *70* (13), 2175–2201.
18. CZARNOMYSY, R.; RADOMSKA, D.; SZEWCZYK, O. K.; ROSZCZENKO, P.; BIELAWSKI, K. "Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments." *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, *22* (15), 8271.
19. KOSTOVA, I. "Platinum Complexes as Anticancer Agents." *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2006, *1*, 1–22.
20. KOSTOVA, I. "Ruthenium Complexes as Anticancer Agents." *Current Medicinal Chemistry*, 2006, *13*, 1085–1107.
21. LEE, S. Y.; KIM, C. Y.; NAM, T. G. "Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives." *Drug Design, Development and Therapy*, 2020, *14*, 5375–5392.
22. BASHIR, M.; MANTOO, I. A.; ARJMAND, F.; TABASSUM, S.; YOUSUF, I. "An Overview of Advancement of Organoruthenium(II) Complexes as Prospective Anticancer Agents." *Coordination Chemistry Reviews*, 2023, *487*, 215169.
23. KANAOUJIYA, R.; SINGH, M.; SINGH, J.; SRIVASTAVA, S. "Ruthenium Based Anticancer Compounds and Their Importance." *Journal of scientific research*, 2020, *64* (01), 264–268.
24. MOTSWAINYANA, W. M.; AJIBADE, P. A. "Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes." *Advances in Chemistry*, 2015, *2015* (1), 859730.
25. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *BOLD-100 in Combination with FOLFOX for the Treatment of Advanced Solid Tumours*. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04421820?term=bold%20100&rank=1> (accessed 2024-11-09).
26. D'AMATO, A.; MARICONDA, A.; IACOPETTA, D.; CERAMELLA, J.; CATALANO, A.; SINICROPI, M. S.; LONGO, P. "Complexes of Ruthenium(II) as Promising Dual-Active Agents against Cancer and Viral Infections." *Pharmaceutics*, 2023, *16* (12), 1729.
27. CORREIA, J. H.; RODRIGUES, J. A.; PIMENTA, S.; DONG, T.; YANG, Z. "Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions." *Pharmaceutics*, 2021, *13* (9), 1332.
28. ALGORRI, J. F.; OCHOA, M.; ROLDÁN-VARONA, P.; RODRÍGUEZ-COBO, L.; MIGUEL LÓPEZ-HIGUERA, J. "Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews." *Cancers*, 2021, *13* (17), 4447.

29. NICULESCU, A. G.; GRUMEZESCU, A. M. “Photodynamic Therapy—an up-to-Date Review.” *Applied Sciences (Switzerland)*, 2021, *11* (8), 3626.
30. GUNAYDIN, G.; GEDIK, M. E.; AYAN, S. “Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches.” *Frontiers in Chemistry*, 2021, *9*, 691697.
31. ZHU, S.; SONG, Y.; PEI, J.; XUE, F.; CUI, X.; XIONG, X.; LI, C. “The Application of Photodynamic Inactivation to Microorganisms in Food.” *Food Chemistry: X*, 2021, *12*, 100150.
32. AKBAR, A.; KHAN, S.; CHATTERJEE, T.; GHOSH, M. “Unleashing the Power of Porphyrin Photosensitizers: Illuminating Breakthroughs in Photodynamic Therapy.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2023, *248*, 112796.
33. KARGES, J. “Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer.” *Angewandte Chemie - International Edition*, 2022, *61* (5), e202112236.
34. ASH, C.; DUBEC, M.; DONNE, K.; BASHFORD, T. “Effect of Wavelength and Beam Width on Penetration in Light-Tissue Interaction Using Computational Methods.” *Lasers in Medical Science*, 2017, *32* (8), 1909–1918.
35. COSSU, M.; LEDDA, L.; COSSU, A. “Emerging Trends in the Photodynamic Inactivation (PDI) Applied to the Food Decontamination.” *Food Research International*, 2021, *144*, 110358.
36. HAMBLIN, M. R. “Antimicrobial Photodynamic Inactivation: A Bright New Technique to Kill Resistant Microbes.” *Current Opinion in Microbiology*, 2016, *33*, 67–73.
37. DUGUAY, B. A.; HEROD, A.; PRINGLE, E. S.; MONRO, S. M. A.; HETU, M.; CAMERON, C. G.; MCFARLAND, S. A.; MCCORMICK, C. “Photodynamic Inactivation of Human Coronaviruses.” *Viruses*, 2022, *14* (1), 110.
38. RASCHPICHLER, M.; PREIS, E.; PINNAPIREDDY, S. R.; BAGHDAN, E.; POURASGHAR, M.; SCHNEIDER, M.; BAKOWSKY, U. “Photodynamic Inactivation of Circulating Tumor Cells: An Innovative Approach against Metastatic Cancer.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, *157*, 38–46.
39. PEREIRA, G. B. S. “Tetra(Tien-2-II)Porfirina e Seus Complexos Com Metais Da Primeira-Série de Transição: Síntese, Caracterização, Investigação Da Citotoxicidade e Interação Com DNA”, Universidade Federal de São Carlos, 2020. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/13368>.
40. NELSON, D. L. C. M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6ª edição.; Artmed: Porto Alegre, 2014.
41. LIU, Z.; WANG, X.; GE, H.; LI, A.; WANG, X.-F. “Recent Research Progress and Perspectives on Porphyrin and Phthalocyanine Analogues for

- Perovskite Solar Cell Applications.” *Energy & Fuels*, 2024, 38 (15), 13685–13703.
42. RAMASAMY, S.; BHAGAVATHIACHARI, M.; SUTHANTHIRARAJ, S. A.; PICHAJ, M. “Mini Review on the Molecular Engineering of Photosensitizer: Current Status and Prospects of Metal-Free/Porphyrin Frameworks at the Interface of Dye-Sensitized Solar Cells.” *Dyes and Pigments*, 2022, 203, 110380.
43. FRANCIS, S.; JOY, F.; JAYARAJ, H.; SUNNY, N.; RAJITH, L. “Recent Advances in Porphyrin-Based Optical Sensing.” *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2024, 21 (1), 13–70.
44. DUC LA, D.; KHONG, H. M.; NGUYEN, X. Q.; DANG, T.-D.; BUI, X. T.; NGUYEN, M. K.; NGO, H. H.; NGUYEN, D. D. “A Review on Advances in Graphene and Porphyrin-Based Electrochemical Sensors for Pollutant Detection.” *Sustainable Chemistry One World*, 2024, 3, 100017.
45. CORDEIRO-JUNIOR, P. J. M.; MARTINS, A. S.; PEREIRA, G. B. S.; ROCHA, F. V.; RODRIGO, M. A. R.; LANZA, M. R. DE V. “Bisphenol-S Removal via Photoelectro-Fenton/H₂O₂ Process Using Co-Porphyrin/Printex L6 Gas Diffusion Electrode.” *Separation and Purification Technology*, 2022, 285, 120299.
46. FENG, L.; WANG, K.-Y.; JOSEPH, E.; ZHOU, H.-C. “Catalytic Porphyrin Framework Compounds.” *Trends in Chemistry*, 2020, 2 (6), 555–568.
47. SHI, R.; HAN, X.; XU, J.; BU, X. “Crystalline Porous Materials for Nonlinear Optics.” *Small*, 2021, 17 (22), 2006416.
48. SILVA, R. C.; DA SILVA, L. O.; BARTOLOMEU, A. DE A.; BROCKSOM, T. J.; DE OLIVEIRA, K. T. “Recent Applications of Porphyrins as Photocatalysts in Organic Synthesis: Batch and Continuous Flow Approaches.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften May 6, 2020, pp 917–955.
49. DE OLIVEIRA, K. T.; MOMO, P. B.; DE ASSIS, F. F.; FERREIRA, M. A. B.; BROCKSOM, T. J. “Chlorins: Natural Sources, Synthetic Developments and Main Applications.” *Current Organic Synthesis*, 2014, 11, 42–58.
50. BETONI MOMO, P.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S.; BROCKSOM, T. J.; THIAGO DE OLIVEIRA, K. “Chemical Transformations and Photophysical Properties of Meso-Tetrathienyl-Substituted Porphyrin Derivatives.” *European Journal of Organic Chemistry*, 2014, 2014 (21), 4536–4547.
51. AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GOROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. “Photodynamic Therapy of Cancer: An Update.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61 (4), 250–281.

52. SWENSON, S. A.; MOORE, C. M.; MARCERO, J. R.; MEDLOCK, A. E.; REDDI, A. R.; KHALIMONCHUK, O. "From Synthesis to Utilization: The Ins and Outs of Mitochondrial Heme." *Cells*, 2020, 9 (3), 579.
53. SCHMITT, F.; GOVINDASWAMY, P.; SÜSS-FINK, G.; WEE, H. A.; DYSON, P. J.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; THERRIEN, B. "Ruthenium Porphyrin Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer." *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51 (6), 1811–1816.
54. NAIK, A.; RUBBIANI, R.; GASSER, G.; SPINGLER, B. "Visible-Light-Induced Annihilation of Tumor Cells with Platinum-Porphyrin Conjugates." *Angewandte Chemie - International Edition*, 2014, 53 (27), 6938–6941.
55. RUBBIANI, R.; WU, W.; NAIK, A.; LAROCCA, M.; SCHNEIDER, L.; PADRUTT, R.; BABU, V.; KÖNIG, C.; HINGER, D.; MAAKE, C.; FERRARI, S.; GASSER, G.; SPINGLER, B. "Studying the Cellular Distribution of Highly Phototoxic Platinated Metalloporphyrins Using Isotope Labelling." *Chemical Communications*, 2020, 56 (92), 14373–14376.
56. SCHNEIDER, L.; KALT, M.; LAROCCA, M.; BABU, V.; SPINGLER, B. "Potent PBS/Polysorbate-Soluble Transplatin-Derived Porphyrin-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy." *Inorganic Chemistry*, 2021, 60 (13), 9416–9426.
57. PRATVIEL, G. "Porphyrins in Complex with DNA : Modes of Interaction and Oxidation Reactions." 2016, 308, 460–477.
58. LOURENÇO, L. M. O.; IGLESIAS, B. A.; PEREIRA, P. M. R.; GIRÃO, H.; FERNANDES, R.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; TOMÉ, J. P. C. "Synthesis, Characterization and Biomolecule-Binding Properties of Novel Tetra-Platinum(II)-Thiopyridylporphyrins." *Dalton Transactions*, 2015, 44 (2), 530–538.
59. IGLESIAS, B. A.; PERANZONI, N. P.; FARIA, S. I.; TRENTIN, L. B.; SCHUCH, A. P.; CHAVES, O. A.; BERTOLONI, R. R.; NIKOLAOU, S.; DE OLIVEIRA, K. T. "DNA-Interactive and Damage Study with Meso-Tetra(2-Thienyl)Porphyrins Coordinated with Polypyridyl Pd(II) and Pt(II) Complexes." *Molecules*, 2023, 28 (13), 5217.
60. OLIVEIRA, V. A.; TERENCE, H.; MENEZES, L. B.; CHAVES, O. A.; IGLESIAS, B. A. "Evaluation of DNA-Binding and DNA-Photocleavage Ability of Tetra-Cationic Porphyrins Containing Peripheral [Ru(Bpy)₂Cl]⁺ Complexes: Insights for Photodynamic Therapy Agents." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2020, 211, 111991.
61. CHATTERJEE, S.; KUNDU, S.; BHATTACHARYYA, A.; HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J. "The Ruthenium(II)-Arene Compound RAPTA-C Induces Apoptosis in EAC Cells through Mitochondrial and P53-JNK Pathways." *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13 (7), 1149–1155.

62. FONTEH, P.; ELKHADIR, A.; OMONDI, B.; GUZEI, I.; DARKWA, J.; MEYER, D. "Impedance Technology Reveals Correlations between Cytotoxicity and Lipophilicity of Mono and Bimetallic Phosphine Complexes." *BioMetals*, 2015, 28 (4), 653–667.
63. MAIRA, E.; VALLE, A.; BATISTA DO NASCIMENTO, F.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.; CLÁUDIO, M.; MONTEIRO, R.; DE, S.; MACHADO, P.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; RIBEIRO DE AZEVEDO, E. "Sobre Uma Degenerescência Acidental Nos Deslocamentos Químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Em Complexos Difosfinicos de Rutênio." *Química Nova*, 2008, 31 (4), 807–812.
64. MIESSLER, G. L.; FISHER, P. J.; TARR, D. A. *Química Inorgânica*, Pearson Education.; Pearson Education: São Paulo, 2014; Vol. 5ª Edição.
65. BENNETT, M. A.; SMITH, A. K. "Arene Ruthenium(II) Complexes Formed by Dehydrogenation of Cyclohexadienes with Ruthenium(III) Trichloride." *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1974, No. 2, 233–241.
66. ZELONKA, R. A.; BAIRD, M. C. "Benzene Complexes of Ruthenium(II)." *Canadian Journal of Chemistry*, 50, 3063–3072.
67. ZHANG, D.; SNIDER, R. L.; CRAWLEY, M. R.; FANG, M.; SANCHEZ-LIEVANOS, K. R.; ANG, S.; COOK, T. R. "Gram-Scale, One-Pot Synthesis of a Cofacial Porphyrin Bridged by Ortho-Xylene as a Scaffold for Dinuclear Architectures." *Inorganic Chemistry*, 2024, 63, 22532–22541.
68. GRABOLLE, M.; SPIELES, M.; LESNYAK, V.; GAPONIK, N.; EYCHMÜLLER, A.; RESCH-GENGER, U. "Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties." *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (15), 6285–6294.
69. TANIGUCHI, M.; LINDSEY, J. S.; BOCIAN, D. F.; HOLTEN, D. "Comprehensive Review of Photophysical Parameters (ϵ , Φ_f , T_s) of Tetraphenylporphyrin (H₂TPP) and Zinc Tetraphenylporphyrin (ZnTPP) – Critical Benchmark Molecules in Photochemistry and Photosynthesis." *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2021, 46, 100401.
70. BREM, B.; GAL, E.; GÖINÖ, L.; CRISTEA, C.; GÖBUDEAN, A. M.; AȘTILEAN, S.; SILAGHI-DUMITRESCU, L. "Metallo Complexes of Meso-Phenothiazinylporphyrins: Synthesis, Linear and Nonlinear Optical Properties." *Dyes and Pigments*, 2015, 123, 386–395.
71. SHELDRICK, G. M. "SHELXT – Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination." *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, 2015, 71 (1), 3–8.
72. SHELDRICK, G. M. "Crystal Structure Refinement with - SHELXL." *Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry*, 2015, 71 (1), 3–8.
73. MACRAE, C. F.; BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; RODRIGUEZ-MONGE, L.; TAYLOR, R.;

- VAN DE STREEK, J.; WOOD, P. A. "Mercury CSD 2.0 – New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures." *Journal of Applied Crystallography*, 2008, 41 (2), 466–470.
74. SPACKMAN, P. R.; TURNER, M. J.; MCKINNON, J. J.; WOLFF, S. K.; GRIMWOOD, D. J.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M. A. "CrystalExplorer: A Program for Hirshfeld Surface Analysis, Visualization and Quantitative Analysis of Molecular Crystals." *Journal of Applied Crystallography*, 2021, 54 (3), 1006–1011.
75. TE VELDE, G.; BICKELHAUPT, F. M.; BAERENDS, E. J.; GUERRA, C. F.; VAN GISBERGEN, S. J. A.; SNIJDERS, J. G.; ZIEGLER, T. "Chemistry with ADF." *Journal of Computational Chemistry*, 2001, 22 (9), 931–967.
76. VAN LENTHE, E.; BAERENDS, E. J. "Optimized Slater-type Basis Sets for the Elements 1–118." *Journal of Computational Chemistry*, 2003, 24 (9), 1142–1156.
77. CALDEWEYHER, E.; MEWES, J.-M.; EHLERT, S.; GRIMME, S. "Extension and Evaluation of the D4 London-Dispersion Model for Periodic Systems." *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 22 (16), 8499–8512.
78. CALDEWEYHER, E.; EHLERT, S.; HANSEN, A.; NEUGEBAUER, H.; SPICHER, S.; BANNWARTH, C.; GRIMME, S. "A Generally Applicable Atomic-Charge Dependent London Dispersion Correction." *The Journal of Chemical Physics*, 2019, 150 (15), 154122.
79. BECKE, A. D. "Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior." *Physical Review A*, 1988, 38 (6), 3098–3100.
80. PERDEW, J. P. "Density-Functional Approximation for the Correlation Energy of the Inhomogeneous Electron Gas." *Physical Review B*, 1986, 33 (12), 8822–8824.
81. REICHMANN, M. E.; RICE, S. A.; THOMAS, C. A.; DOTY, P. "A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid." *Journal of the American Chemical Society*, 1954, 76 (11), 3047–3053.
82. ADLER, D. A.; LONGO, F. R.; SHERGALIS, W. "Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on Ms-Tetraphenylporphin." *Journal of the American Chemical Society*, 1964, 86, 3145–3149.
83. PÉREZ-ORTEGA, I.; ALBÉNIZ, A. C. "Multifaceted Role of Silver Salts as Ligand Scavengers and Different Behavior of Nickel and Palladium Complexes: Beyond Halide Abstraction." *Dalton Transactions*, 2023, 52 (5), 1425–1432.
84. PEREIRA, G. B. S.; DA SILVEIRA ROCHA, J.; LIMA, M. A.; DE OLIVEIRA, G. P.; DA SILVEIRA, R. G.; FORIN, M. R.; DA SILVA PINTO, L.; DE OLIVEIRA, K. T.; ROCHA, F. V. "An Experimental and

- Theoretical Approach of Coordination Compounds Derived from Meso-Tetra(Thiophen-2-Yl)Porphyrin: DNA Interactions and Cytotoxicity.” *Inorganic Chemistry Communications*, 2023, 147, 110135.
85. SÁEZ, R.; LORENZO, J.; PRIETO, M. J.; FONT-BARDIA, M.; CALVET, T.; OMEÑACA, N.; VILASECA, M.; MORENO, V. “Influence of PPh₃ Moiety in the Anticancer Activity of New Organometallic Ruthenium Complexes.” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, 136, 1–12.
86. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed.; Hoboken, New Jersey, 2005.
87. TAMARA, S.; DEN BOER, M. A.; HECK, A. J. R. “High-Resolution Native Mass Spectrometry.” *Chemical Reviews*, 2022, 122 (8), 7269–7326.
88. DE BONIS, M.; BIANCO, G.; AMATI, M.; BELVISO, S.; CATALDI, T. R. I.; LELJ, F. “An Interplay between Infrared Multiphoton Dissociation Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Density Functional Theory Computations in the Characterization of a Tripodal Quinolin-8-Olate Gd(III) Complex.” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2013, 24 (4), 589–601.
89. MCINDOE, J. S.; VIKSE, K. L. “Assigning the ESI Mass Spectra of Organometallic and Coordination Compounds.” *Journal of Mass Spectrometry*, 2019, 54 (5), 466–479.
90. GARINO, C.; BORFECCHIA, E.; GOBETTO, R.; VAN BOKHOVEN, J. A.; LAMBERTI, C. “Determination of the Electronic and Structural Configuration of Coordination Compounds by Synchrotron-Radiation Techniques.” *Coordination Chemistry Reviews*, 2014, 277–278, 130–186.
91. GOUTERMAN, M.; WAGNIÈRE, G. H.; SNYDER, L. C. “Spectra of Porphyrins. Part II. Four Orbital Model.” *Journal of Molecular Spectroscopy*, 1963, 11 (6), 108–127.
92. GOUTERMAN, M. “Spectra Porphyrins.” *Journal of Molecular Spectroscopy*, 1961, 6, 138–163.
93. KUMAR, P.; GUPTA, R. K.; PANDEY, D. S. “Half-Sandwich Arene Ruthenium Complexes: Synthetic Strategies and Relevance in Catalysis.” *Chemical Society Reviews*, 2014, 43 (2), 707–733.
94. WARD, T. R.; SCHAFER, O.; DAUL, C.; HOFMANN, P. “Geometry of Coordinatively Unsaturated Two-Legged Piano Stool Complexes with 16 Valence Electrons: A Theoretical Study.” *Organometallics*, 1997, 16, 3207–3215.
95. MOURZINA, Y. G.; OFFENHÄUSSER, A. “Electrochemical Properties and Biomimetic Activity of Water-Soluble Meso-Substituted Mn(III) Porphyrin Complexes in the Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide.” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, 866, 114159.
96. GUO, Y.; CHAO, J.; PAN, J. “Study on the Interaction of with Cyclodextrins and DNA by Spectroscopy.” *Spectrochimica Acta Part A*, 2007, 68, 231–236.

97. RAMESH, J.; ARUNKUMAR, C.; SUJATHA, S. "Dicationic Porphyrins Bearing Thienyl and Pyridinium Moieties : Synthesis , Characterization , DNA Interaction and Cancer Cell Toxicity." *Polyhedron*, 2019, *170*, 151–159.
98. HANNON, M. J. "Supramolecular DNA Recognition." *Chemical Society Reviews*, 2007, *36* (2), 280–295.
99. KOZMA, E.; KELE, P. "Bioorthogonal Reactions in Bioimaging." *Topics in Current Chemistry*, 2024, *382* (1), 7.
100. WARD, C. L.; CORNEJO, M. A.; PELI THANTHRI, S. H.; LINZ, T. H. "A Review of Electrophoretic Separations in Temperature-Responsive Pluronic Thermal Gels." *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V. October 2, 2023.
101. GRAU, J.; BRISSOS, R. F.; SALINAS-UBER, J.; CABALLERO, A. B.; CAUBET, A.; ROUBEAU, O.; KORRODI-GREGÓRIO, L.; PÉREZ-TOMÁS, R.; GAMEZ, P. "The Effect of Potential Supramolecular-Bond Promoters on the DNA-Interacting Abilities of Copper-Terpyridine Compounds." *Dalton Transactions*, 2015, *44* (36), 16061–16072.
102. CUNHA, B. N.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTIN, A. M.; SILVEIRA, R. G.; HONORATO, J.; CAIRO, R. R.; DE OLIVEIRA, T. D.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A. "Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation." *Inorganic Chemistry*, 2020, *59* (7), 5072–5085.
103. QAIS, F. A.; FURKAN, M.; ALTAF, M.; AHMAD, I.; KHAN, R. H. "Exploring the Mechanism of Interaction of Glipizide with DNA: Combined in Vitro and Bioinformatics Approach." *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, *267*, 131573.
104. REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; ISHQI, H. M.; TABISH, M. "Studying Non-Covalent Drug-DNA Interactions." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, *576*, 49–60.
105. NORDÉN B, R. A. D. T. *Linear Dichorism and Circular Dichroism: A Textbook on Polarized Light Spectroscopy*, RSC Publishing.; Cambridge, 2010.
106. RICHARDS, A. D.; RODGER, A. "Synthetic Metallomolecules as Agents for the Control of DNA Structure." *Chemical Society Reviews*, 2007, *36* (3), 471–483.
107. TARAI, S. K.; PAN, A.; DAS, S.; BHADURI, R.; MANDAL, S.; MAITRA, S.; MOI, S. C. "Anticancer Property and Normal Cell Toxicity Profile of Pyrrolidine-Based Platinum (II) Complexes: Their DNA, BSA Interaction, and Molecular Docking." *Applied Organometallic Chemistry*, 2022, *36* (11), e6859.
108. KAPLANIS, M.; STAMATAKIS, G.; PAPAKONSTANTINOU, V. D.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; DEMOPOULOS, C. A.; MITSOPOULOU, C. A. "Re(I) Tricarbonyl Complex of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione: DNA Binding, Cytotoxicity, Anti-Inflammatory

- and Anti-Coagulant Effects towards Platelet Activating Factor.” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, 135, 1–9.
109. FU, X. B.; LIU, D. D.; LIN, Y.; HU, W.; MAO, Z. W.; LE, X. Y. “Water-Soluble DNA Minor Groove Binders as Potential Chemotherapeutic Agents: Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cleavage, Antioxidation, Cytotoxicity and HSA Interactions.” *Dalton Transactions*, 2014, 43 (23), 8721–8737.
110. MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. “Spectroscopic and Voltammetric Studies on Copper Complexes of 2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolines Bound to Calf Thymus DNA.” *Inorganic Chemistry*, 1998, 37, 693–700.
111. PALMEIRA-MELLO, M. V.; CABALLERO, A. B.; LOPEZ-ESPINAR, A.; GUEDES, G. P.; CAUBET, A.; DE SOUZA, A. M. T.; LANZMASTER, M.; GAMEZ, P. “DNA-Interacting Properties of Two Analogous Square-Planar Cis-Chlorido Complexes: Copper versus Palladium.” *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2021, 26 (6), 727–740.
112. OLIVEIRA, V. A.; IGLESIAS, B. A.; AURAS, B. L.; NENES, A.; TERENCE, H. “Photoactive Meso -Tetra(4-Pyridyl)Porphyrin-Tetrakis-[Chloro(2,2'-bipyridine)Platinum(II) Derivatives Recognize and Cleave DNA upon Irradiation.” *Dalton Transactions*, 2017, 46 (5), 1660–1669.
113. ZHU, S.; MATILLA, A.; TERCERO, J. M.; VIJAYARAGAVAN, V.; WALMSLEY, J. A. “Binding of Palladium(II) Complexes to Guanine, Guanosine or Guanosine 5' -Monophosphate in Aqueous Solution: Potentiometric and NMR Studies.” *Inorganica Chimica Acta*, 2004, 357 (2), 411–420.
114. CABALLERO, A. B.; CARDO, L.; CLAIRE, S.; CRAIG, J. S.; HODGES, N. J.; VLADYKA, A.; ALBRECHT, T.; ROCHFORD, L. A.; PIKRAMENOU, Z.; HANNON, M. J. “Assisted Delivery of Anti-Tumour Platinum Drugs Using DNA-Coiling Gold Nanoparticles Bearing Lumophores and Intercalators: Towards a New Generation of Multimodal Nanocarriers with Enhanced Action.” *Chemical Science*, 2019, 10 (40), 9244–9256.
115. OGUEY, C.; FOLOPPE, N.; HARTMANN, B. “Understanding the Sequence-Dependence of DNA Groove Dimensions: Implications for DNA Interactions.” *PLoS ONE*, 2010, 5 (12), e15931.
116. STANGHERLIN, S.; LIU, J. “Nanomaterials Enabled and Enhanced DNA-Based Biosensors.” *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11 (30), 6994–7003.
117. DE ARAUJO-NETO, J. H.; GUEDES, A. P. M.; LEITE, C. M.; MORAES, C. A. F.; SANTOS, A. L.; BRITO, R. DA S.; ROCHA, T. L.; MELLO-ANDRADE, F.; ELLENA, J.; BATISTA, A. A. “‘Half-Sandwich’ Ruthenium Complexes with Alizarin as Anticancer Agents: In Vitro and In Vivo Studies.” *Inorganic Chemistry*, 2023, 62 (18), 6955–6969.

118. TCHOUNWOU, P. B.; DASARI, S.; NOUBISSI, F. K.; RAY, P.; KUMAR, S. "Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy." *Journal of Experimental Pharmacology*, 2021, 13, 303–328.
119. TABASI, H.; BABAEI, M.; ABNOUS, K.; TAGHDISI, S. M.; SALJOOGHI, A. S.; RAMEZANI, M.; ALIBOLANDI, M. "Metal–Polymer-Coordinated Complexes as Potential Nanovehicles for Drug Delivery." *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 2021, 11 (4), 501–526.
120. RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. "Complexos de Inclusão de Indometacina Com Hidroxipropil-Bciclodextrina. Estudos de Dissolução e Coeficiente de Partição." *International Trade and Labor Markets: Welfare, Inequality, and Unemployment*, 2006, 42 (1), 59–68.
121. LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. "Partition Coefficients and Their Uses." *Chemical Reviews*, 1971, 71 (6), 525–616.
122. PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. "Biopharmaceutics and Pharmacokinetics in Drug Research." *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 201, 131–150.
123. ARNOTT, J. A.; PLANEY, S. L. "The Influence of Lipophilicity in Drug Discovery and Design." *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2012, 7 (10), 863–875.
124. BASOVA, T. "Phthalocyanine and Porphyrin Derivatives and Their Hybrid Materials in Optical Sensors Based on the Phenomenon of Surface Plasmon Resonance." *Chemosensors*, 2024, 12 (4), 56.
125. REIS, M. J. A.; PEREIRA, A. M. V. M.; MOURA, N. M. M.; NEVES, M. G. P. M. S. "Porphyrin-Based Hole-Transporting Materials for Perovskite Solar Cells: Boosting Performance with Smart Synthesis." *ACS Omega*, 2024, 9 (29), 31196–31219.
126. YANG, L.; LIU, Y.; REN, X.; JIA, R.; SI, L.; BAO, J.; SHI, Y.; SUN, J.; ZHONG, Y.; DUAN, P. C.; YANG, X.; ZHU, R.; JIA, Y.; BAI, F. "Microemulsion-Assisted Self-Assembly of Indium Porphyrin Photosensitizers with Enhanced Photodynamic Therapy." *ACS Nano*, 2024, 18 (4), 3161–3172.
127. LOPES, J. M. S.; SAMPAIO, R. N.; DINELLI, L. R.; BATISTA, A. A.; ARAÚJO, P. T.; BARBOSA-NETO, N. M. "On the Excitation Dependence of Fluorescence Spectra of Meso-Tetrapyrrolyl Zinc (II) Porphyrin and Its Relation with Hydrogen Bonding and Outlying Decoration." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 224, 117371.
128. LOPES, J. M. S.; COSTA, S. N.; BATISTA, A. A.; DINELLI, L. R.; ARAÚJO, P. T.; BARBOSA-NETO, N. M. "Photophysics and Visible Light Photodissociation of Supramolecular Meso-Tetra(4-Pyridyl) Porphyrin/RuCl₂(CO)(PPh₃)₂ Structures." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 237, 118351.

129. PETITI, J.; REVEL, L.; DIVIETO, C. "Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays." *Biosensors*, 2024, 14 (4), 156.
130. TRONINA, T.; BARTMAŃSKA, A.; POPŁOŃSKI, J.; RYCHLICKA, M.; SORDON, S.; FILIP-PSURSKA, B.; MILCZAREK, M.; WIETRZYK, J.; HUSZCZA, E. "Prenylated Flavonoids with Selective Toxicity against Human Cancers." *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24 (8), 7408.
131. KRZYWIK, J.; MOZGA, W.; AMINPOUR, M.; JANCZAK, J.; MAJ, E.; WIETRZYK, J.; TUSZYŃSKI, J. A.; HUCZYŃSKI, A. "Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Docking Studies of Novel Doubly Modified Colchicine Amides and Sulfonamides as Anticancer Agents." *Molecules*, 2020, 25 (8), 1789.
132. KLIMEK, K.; TYŚKIEWICZ, K.; MIAZGA-KARSKA, M.; DĘBCZAK, A.; RÓJ, E.; GINALSKA, G. "Bioactive Compounds Obtained from Polish 'Marynka' Hop Variety Using Efficient Two-Step Supercritical Fluid Extraction and Comparison of Their Antibacterial, Cytotoxic, and Anti-Proliferative Activities in Vitro." *Molecules*, 2021, 26 (8), 2366.
133. ZIESKE, P. A.; KOBERDA, M.; HINES, J. L.; KNIGHT, C. C.; SRIRAM, R.; RAGHAVAN, N. V; RABINOW, B. E. "Characterization of Cisplatin Degradation as Affected by PH and Light." *American Journal of Public Health*, 1991, 48, 1500–1506.
134. DEMOY, M.; MINKO, T.; KOPECKOVA, P.; KOPECEK, J. "Time-and Concentration-Dependent Apoptosis and Necrosis Induced by Free and HPMA Copolymer-Bound Doxorubicin in Human Ovarian Carcinoma Cells a a a." *Journal of Controlled Release*, 2000, 69, 185–196.
135. GRAMINHA, A. E.; HONORATO, J.; DULCEY, L. L.; GODOY, L. R.; BARBOSA, M. F.; COMINETTI, M. R.; MENEZES, A. C.; BATISTA, A. A. "Evaluation of the Biological Potential of Ruthenium(II) Complexes with Cinnamic Acid." *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020, 206, 111021.
136. GRAMINHA, A. E.; HONORATO, J.; CORREA, R. S.; COMINETTI, M. R.; MENEZES, A. C. S.; BATISTA, A. A. "A Novel Ruthenium(Ii) Gallic Acid Complex Disrupts the Actin Cytoskeleton and Inhibits Migration, Invasion and Adhesion of Triple Negative Breast Tumor Cells." *Dalton Transactions*, 2021, 50 (1), 323–335.
137. OLIVEIRA, K. M.; HONORATO, J.; DEMIDOFF, F. C.; SCHULTZ, M. S.; NETTO, C. D.; COMINETTI, M. R.; CORREA, R. S.; BATISTA, A. A. "Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug." *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, 214, 111289.
138. CUMMINGS, B. S.; SCHNELLMANN, R. G. "Measurement of Cell Death in Mammalian Cells." *Current Protocols*, 2021, 1 (8), e210.
139. CUI, X.; LIU, S.; JIN, Y.; LI, M.; SHAO, C.; YU, H.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, Y. "Rapid Determination of Antibiotic Susceptibility of

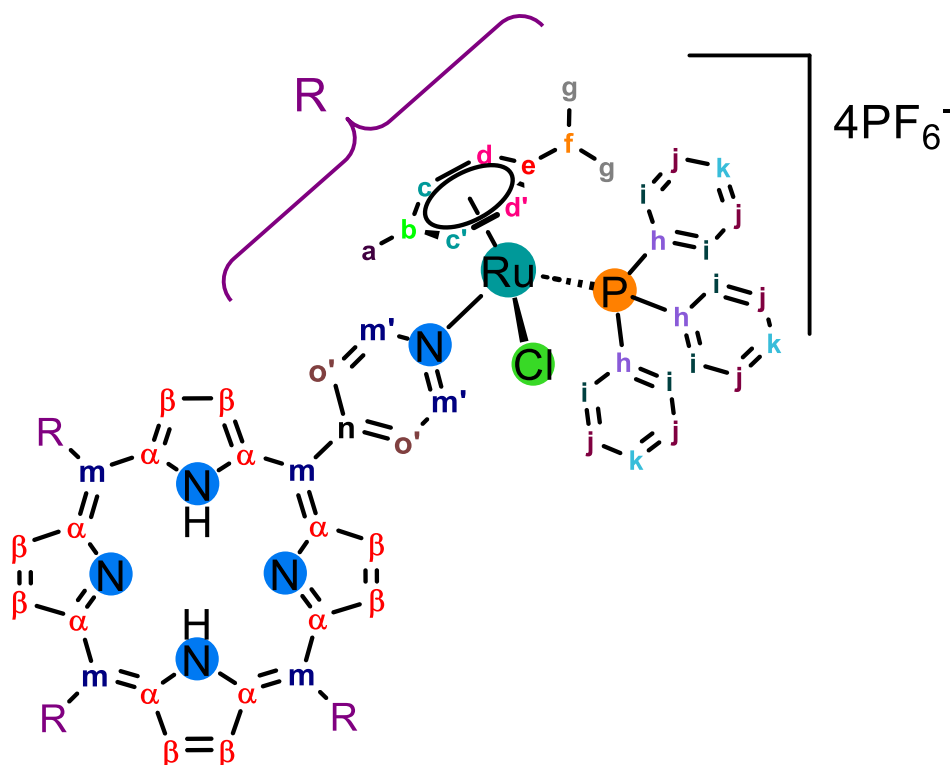
- Clinical Isolates of *Escherichia Coli* by SYBR Green I/Propidium Iodide Assay.” *Scientific Reports*, 2024, 14 (1), 18782.
140. MIYAIRI, I.; BYRNE, G. I. “Chlamydia and Programmed Cell Death.” *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9 (1), 102–108.
141. ZARTNER, L.; GARNI, M.; CRACIUN, I.; EINFALT, T.; PALIVAN, C. G. “How Can Giant Plasma Membrane Vesicles Serve as a Cellular Model for Controlled Transfer of Nanoparticles?” *Biomacromolecules*, 2021, 22 (1), 106–115.
142. SAMIEI, E.; SEYFOORI, A.; TOYOTA, B.; GHAVAMI, S.; AKBARI, M. “Investigating Programmed Cell Death and Tumor Invasion in a Three-Dimensional (3d) Microfluidic Model of Glioblastoma.” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (9), 3162.
143. SOLARI, J. I. G.; FILIPPI-CHIELA, E.; PILAR, E. S.; NUNES, V.; GONZALEZ, E. A.; FIGUEIRÓ, F.; ANDRADE, C. F.; KLAMT, F. “Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) Related to Immunogenic Cell Death Are Differentially Triggered by Clinically Relevant Chemotherapeutics in Lung Adenocarcinoma Cells.” *BMC Cancer*, 2020, 474 (20), 1–14.
144. SUNILKUMAR, D.; DRISHYA, G.; CHANDRASEKHARAN, A.; SHAJI, S. K.; BOSE, C.; JOSSART, J.; PERRY, J. J. P.; MISHRA, N.; KUMAR, G. B.; NAIR, B. G. “Oxyresveratrol Drives Caspase-Independent Apoptosis-like Cell Death in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through the Induction of ROS.” *Biochemical Pharmacology*, 2020, 173, 113724.
145. SHENDGE, A. K.; CHAUDHURI, D.; BASU, T.; MANDAL, N. “A Natural Flavonoid, Apigenin Isolated from *Clerodendrum Viscosum* Leaves, Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in MCF-7 Cells through the Regulation of P53 and Caspase-Cascade Pathway.” *Clinical and Translational Oncology*, 2021, 23 (4), 718–730.
146. WANG, T.; WU, X.; AL RUDAI SAT, M.; SONG, Y.; CHENG, H. “Curcumin Induces G2/M Arrest and Triggers Autophagy, ROS Generation and Cell Senescence in Cervical Cancer Cells.” *Journal of Cancer*, 2020, 11 (22), 6704–6715.
147. JANGILI, P.; KONG, N.; KIM, J. H.; ZHOU, J.; LIU, H.; ZHANG, X.; TAO, W.; KIM, J. S. “DNA-Damage-Response-Targeting Mitochondria-Activated Multifunctional Prodrug Strategy for Self-Defensive Tumor Therapy.” *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61 (16), 1–11.
148. RAGHEB, M. A.; OMAR, R. S.; SOLIMAN, M. H.; ELWAHY, A. H. M.; ABDELHAMID, I. A. “Synthesis, Characterization, DNA Photocleavage, in Silico and in Vitro DNA/BSA Binding Properties of Novel Hexahydroquinolines.” *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1267, 133628.
149. O’HAGAN, M. P.; DUAN, Z.; HUANG, F.; LAPS, S.; DONG, J.; XIA, F.; WILLNER, I. “Photocleavable Ortho-Nitrobenzyl-Protected DNA

- Architectures and Their Applications.” *Chemical Reviews*, 2023, 123 (10), 6839–6887.
150. WEYNAND, J.; MORENO-BETANCOURT, A.; LOISEAU, F.; BERTHET, N.; DEFRANCQ, E.; ELIAS, B. “Redox-Active Bis-Cyclometalated Iridium(III) Complex as a DNA Photo-Cleaving Agent.” *Inorganic Chemistry*, 2020, 59 (4), 2426–2433.
151. MATHEW, D.; SUJATHA, S. “Interactions of Porphyrins with DNA: A Review Focusing Recent Advances in Chemical Modifications on Porphyrins as Artificial Nucleases.” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, 219, 111434.
152. AGGARWAL, R.; KUMAR, S.; MITTAL, A.; SADANA, R.; DUTT, V. “Synthesis, Characterization, in Vitro DNA Photocleavage and Cytotoxicity Studies of 4-Arylazo-1-Phenyl-3-(2-Thienyl)-5-Hydroxy-5-Trifluoromethylpyrazolines and Regioisomeric 4-Arylazo-1-Phenyl-5(3)-(2-Thienyl)-3(5)-Trifluoromethylpyrazoles.” *Journal of Fluorine Chemistry*, 2020, 236, 109573.
153. VIZZOTTO, B. S.; DIAS, R. S.; IGLESIAS, B. A.; KRAUSE, L. F.; VIANA, A. R.; SCHUCH, A. P. “DNA Photocleavage and Melanoma Cells Cytotoxicity Induced by a Meso-Tetra-Ruthenated Porphyrin under Visible Light Irradiation.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2020, 209, 111922.
154. YU, D.; ZHA, Y.; ZHONG, Z.; RUAN, Y.; LI, Z.; SUN, L.; HOU, S. “Improved Detection of Reactive Oxygen Species by DCFH-DA: New Insight into Self-Amplification of Fluorescence Signal by Light Irradiation.” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2021, 339, 129878.
155. D’ARCY, M. S. “Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy.” *Cell Biology International*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd June 1, 2019, pp 582–592.
156. KIM-CAMPBELL, N.; GOMEZ, H.; BAYIR, H. “Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis.” In *Critical Care Nephrology: Third Edition*; Elsevier Inc., 2019; pp 113-121.e2.
157. GRIVICICH, I.; REGNER, A.; BRONDANI, A. R. “Morte Celular Por Apoptose.” *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2007, 53 (3), 335–343.
158. VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. “Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death.” *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243, 167–190.
159. LEE, S. O.; JOO, S. H.; KWAK, A. W.; LEE, M. H.; SEO, J. H.; CHO, S. S.; YOON, G.; CHAE, J. IL; SHIM, J. H. “Podophyllotoxin Induces Ros-Mediated Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Colorectal Cancer Cells via P38 Mapk Signaling.” *Biomolecules and Therapeutics*, 2021, 29 (6), 658–666.
160. SILVA, M. T. “Secondary Necrosis: The Natural Outcome of the Complete Apoptotic Program.” *FEBS Letters*, 2010, 584 (22), 4491–4499.

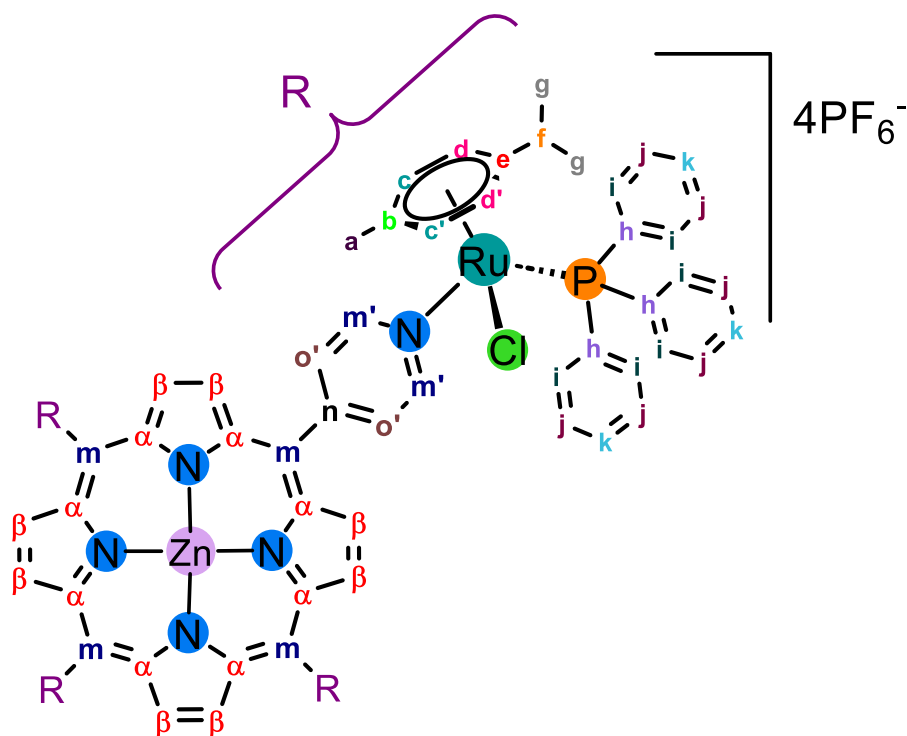
161. SACHET, M.; LIANG, Y. Y.; OEHLER, R. "The Immune Response to Secondary Necrotic Cells." *Apoptosis*, 2017, 22 (10), 1189–1204.
162. SOUZA, A. G.; SILVA, I. B. B.; CAMPOS-FERNANDEZ, E.; BARCELOS, L. S.; SOUZA, J. B.; MARANGONI, K.; GOULART, L. R.; ALONSO-GOULART, V. "Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response." *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24 (15), 1689–1694.
163. JAGANATHAN, H.; GAGE, J.; LEONARD, F.; SRINIVASAN, S.; SOUZA, G. R.; DAVE, B.; GODIN, B. "Three-Dimensional in Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor Using Magnetic Levitation." *Scientific Reports*, 2014, 4 (1), 6468.
164. YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. "Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D." *Cell*, 2007, 130 (4), 601–610.
165. HUANG, Z.; YU, P.; TANG, J. "Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model." *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13, 5395–5405.
166. ZHAO, L.; XIU, J.; LIU, Y.; ZHANG, T.; PAN, W.; ZHENG, X.; ZHANG, X. "A 3D Printed Hanging Drop Dropper for Tumor Spheroids Analysis Without Recovery." *Scientific Reports*, 2019, 9 (1), 19717.
167. BRAJŠA, K.; TRZUN, M.; ZLATAR, I.; JELIĆ, D. "Three-Dimensional Cell Cultures as a New Tool in Drug Discovery." *Periodicum Biologorum*, 2016, 118 (1), 59–65.
168. TIMM, D. M.; CHEN, J.; SING, D.; GAGE, J. A.; HAISLER, W. L.; NEELEY, S. K.; RAPHAEL, R. M.; DEHGHANI, M.; ROSENBLATT, K. P.; KILLIAN, T. C.; TSENG, H.; SOUZA, G. R. "A High-Throughput Three-Dimensional Cell Migration Assay for Toxicity Screening with Mobile Device-Based Macroscopic Image Analysis." *Scientific Reports*, 2013, 3 (1), 3000.

ANEXOS

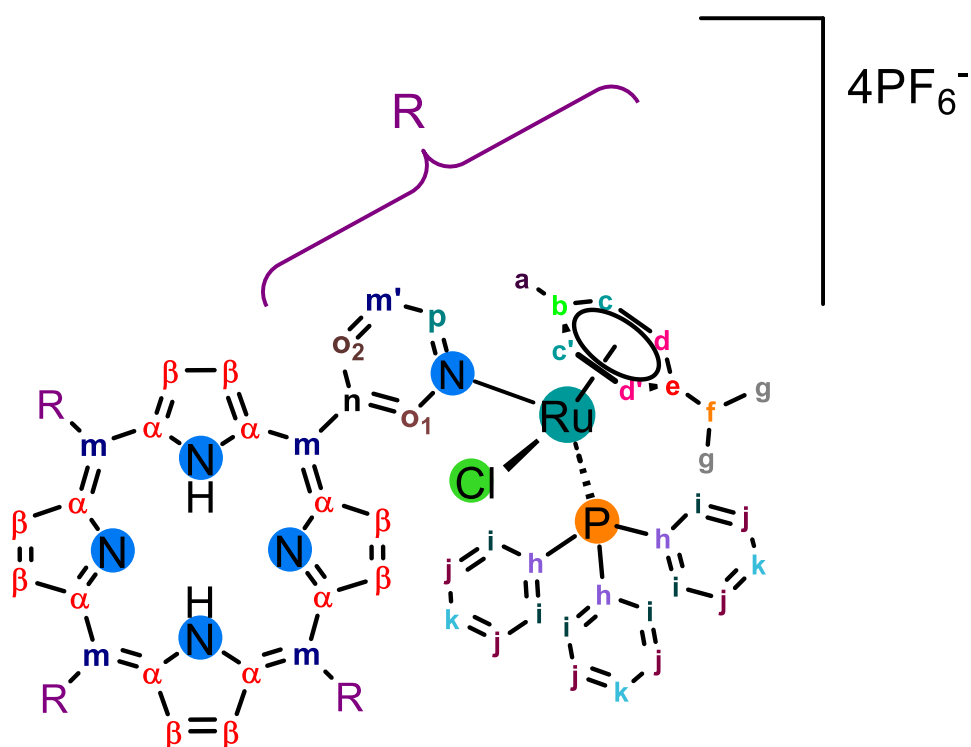
H₂P: UV-vis em CH₂Cl₂ λ (nm) [$\log \varepsilon$ (M⁻¹ cm⁻¹)]: 428 (5,60); 520 (4,36); 555 (4,07); 593 (3,90); 648 (3,60). FT-IR (CsI; cm⁻¹): 3316 (ν N-H); 1609 (ν N-C); 1030, 1000, 971 (π -Porphy); 526 (ν Ru-P); 841 (ν P-F); 559 (δ P-F). RMN ³¹P{¹H} (161,976 MHz, acatona-d₆) δ (ppm): 36,18 (s, PPh₃); -144,27 (hept, PF₆⁻). Análise elementar: Exp. (Cal.) %: C = 54,98 (54,81); H = 4,59 (4,30); N = 3,45 (3,36). Condutividade molar em acetona: 360,3 S cm² mol⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, Acetona-d₆, 298 K): -3,10 (s, 1H, *N*-H); 1,42 (m, 24H, *g*); 2,78 (s, *a*); 2,84 (m, *f*); 5,80 (d, 4H, *d'*); 6,08 (d, 4H, *d*); 6,15 (d, 4H, *c'*); 6,38 (d, 4H, *c*); 7,64-7,75 (m, 64H, *aromático fosfina*); 8,25 (d, 8H, *o*); 8,89 (s, 8H, β); 9,52 (d, 8H, *m*).



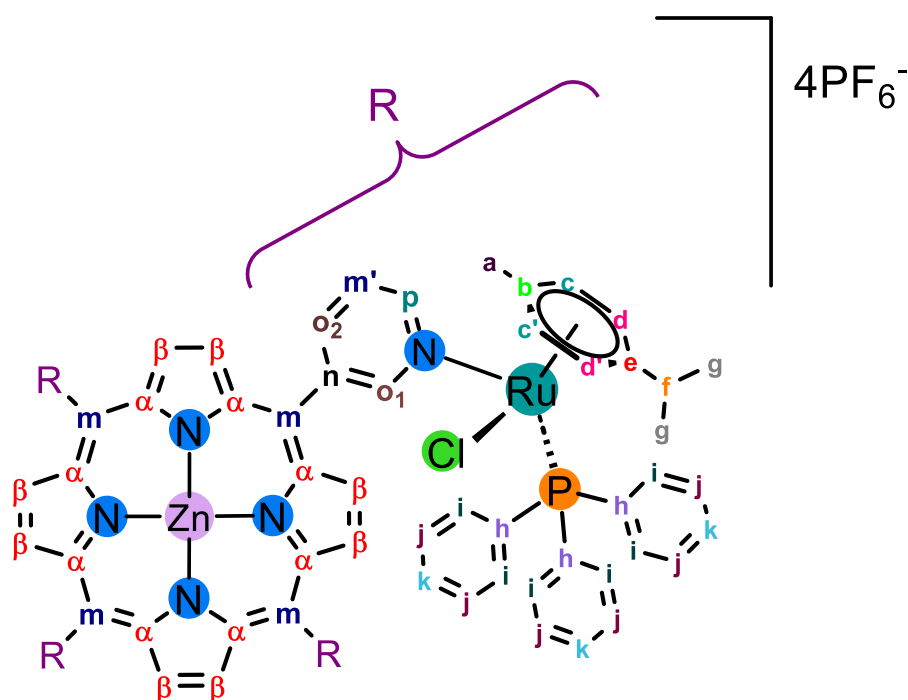
ZnP: UV-vis em CH_2Cl_2 λ (nm) [$\log \epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]: 432 (5,62), 519 (4,84), 558 (4,43), 601 (3,94). FT-IR (CsI; cm^{-1}): 1609 ($\nu\text{N-C}$); 1030, 997 ($\pi\text{-Porphy}$); 527 ($\nu\text{Ru-P}$); 841 ($\nu\text{P-F}$); 559 ($\delta\text{P-F}$). Análise elementar: Exp. (Cal.) %: C = 54,05 (53,79); H = 4,52 (4,16); N = 3,38 (3,30). Condutividade molar em acetona: 218,9 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (161,976 MHz, acetona- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 36,18 (s, PPh_3); -144,27 (hept, PF_6^-). RMN ^1H (400 MHz, Acetona- d_6 , 298 K): 1,42 (m, 24H, g); 2,79 (s, a); 2,83 (m, f); 5,74 (d, 4H, d'); 6,09 (d, 4H, d); 6,13 (d, 4H, c'); 6,38 (d, 4H, c); 7,64-7,74 (m, 60H, *aromático fosfina*); 8,20 (d, 8H, o); 8,86 (s, 8H, β); 9,48 (d, 8H, m).



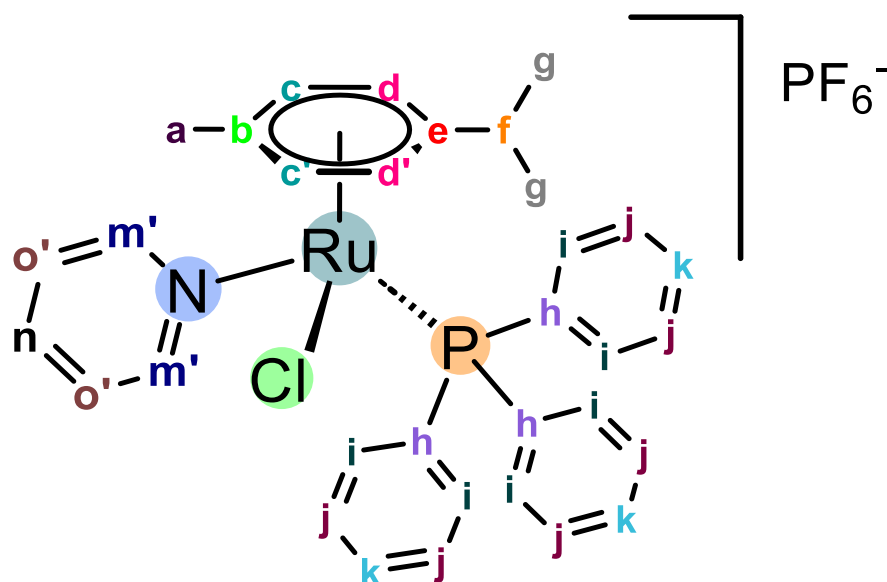
H₂P2: UV-vis em CH₂Cl₂ λ (nm) [$\log \epsilon$ (M⁻¹ cm⁻¹)]: 425 (5,65); 517 (4,37); 552 (3,89); 591 (3,87); 650 (3,40). FT-IR (CsI; cm⁻¹): 3325 (ν N-H); 1031, 999, 971 (π -Porphy); 526 (ν Ru-P); 841 (ν P-F); 559 (δ P-F). Análise elementar: Exp. (Cal.) %: C = 54,90 (54,81); H = 4,42 (4,30); N = 3,43 (3,36). Condutividade molar em acetona: 260,3 S cm² mol⁻¹. RMN ³¹P{¹H} (161,976 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 33,34-35,77 (m, PPh₃); -144,27 (hept, PF₆⁻).



ZnP2: UV-vis em CH_2Cl_2 λ (nm) [$\log \varepsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]: 432 (5,60), 516 (3,68), 559 (4,33), 599 (3,68). FT-IR (CsI; cm^{-1}): 1033, 997 (π -Porphy); 527 ($\nu_{\text{Ru-P}}$); 841 ($\nu_{\text{P-F}}$); 559 ($\delta_{\text{P-F}}$). Análise elementar: Exp. (Cal.) %: C = 53,83 (53,79); H = 4,28 (4,16); N = 3,69 (3,30). Condutividade molar em acetona: $218,9 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (161,976 MHz, acetona- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 33,11-36,24 (m, PPh_3); -144,27 (hept, PF_6^-).



Mim: UV-vis em CH_2Cl_2 λ (nm) [$\log \varepsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]: 258 (4,21); 265 (4,19); 271 (4,14); 278 (4,06); 340 (3,28). FT-IR (CsI; cm^{-1}): 1604 ($\nu\text{N-C}$); 526 ($\nu\text{Ru-P}$); 841 ($\nu\text{P-F}$); 559 ($\delta\text{P-F}$). Análise elementar: Exp. (Cal.) %: C = 51,97 (52,34); H = 5,66 (4,53); N = 2,77 (1,85). Condutividade molar em acetona: $95,77 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (161,976 MHz, acetona- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 35,39 (s); -144,27 (hept, PF_6^-). RMN ^1H (400 MHz, Acetona- d_6 , 298 K) $\delta(\text{ppm})$: 8.96 (d, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, m'); 7.86 (tt, $J = 7.6, 1.5 \text{ Hz}$, 1H, n); 7.57 – 7.36 (m, 15H, *aromático fosfina*); 7.29 (dd, $J = 7.6, 5.1 \text{ Hz}$, 2H, o'); 6.11 (dd, $J = 6.2, 1.5 \text{ Hz}$, 1H, c); 5.87 – 5.80 (m, 2H, c' e d); 5.65 – 5.61 (m, 1H, d'); 2.42 (hept, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, f); 1.86 (s, 3H, a); 1.17 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, g).



Síntese

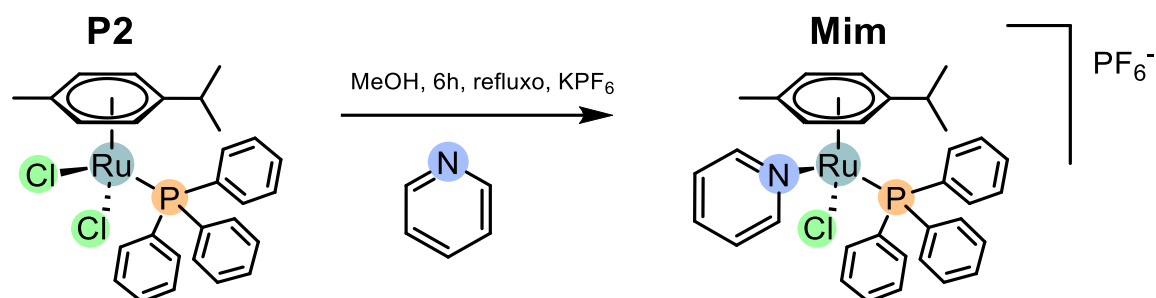
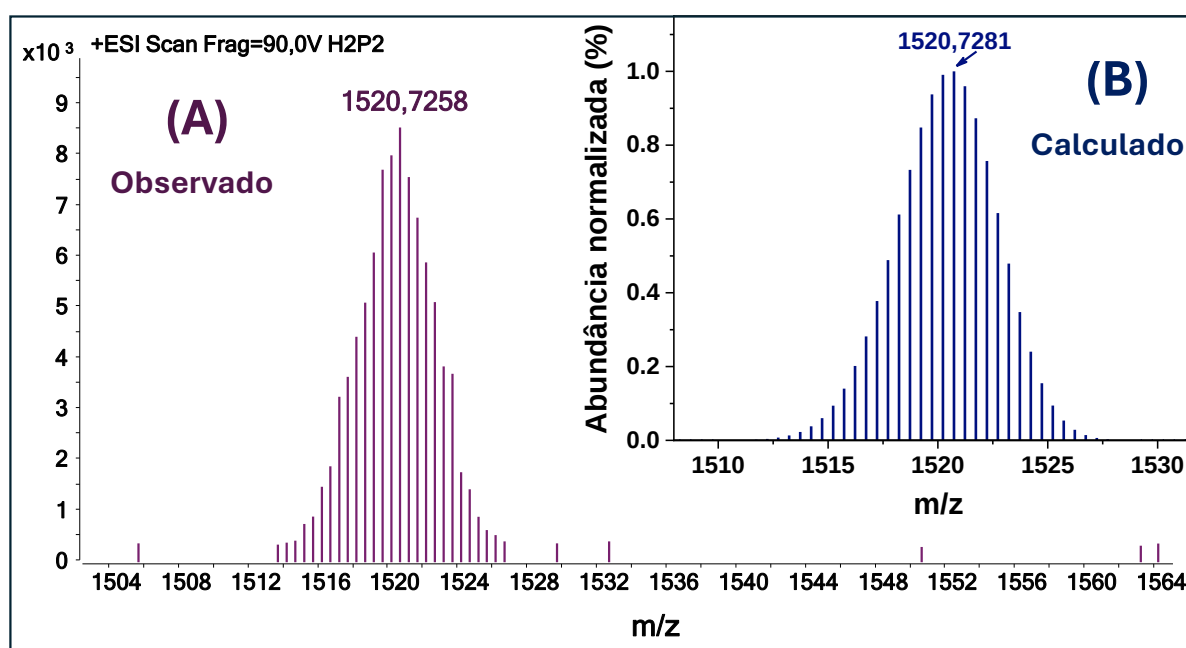


FIGURA A1 - Esquema reacional para a formação do composto Mim.

FIGURA A2 - Padrões isotópicos do espectro de massas (MS) para o composto H_2P_2 : (A) experimental e (B) teórico.

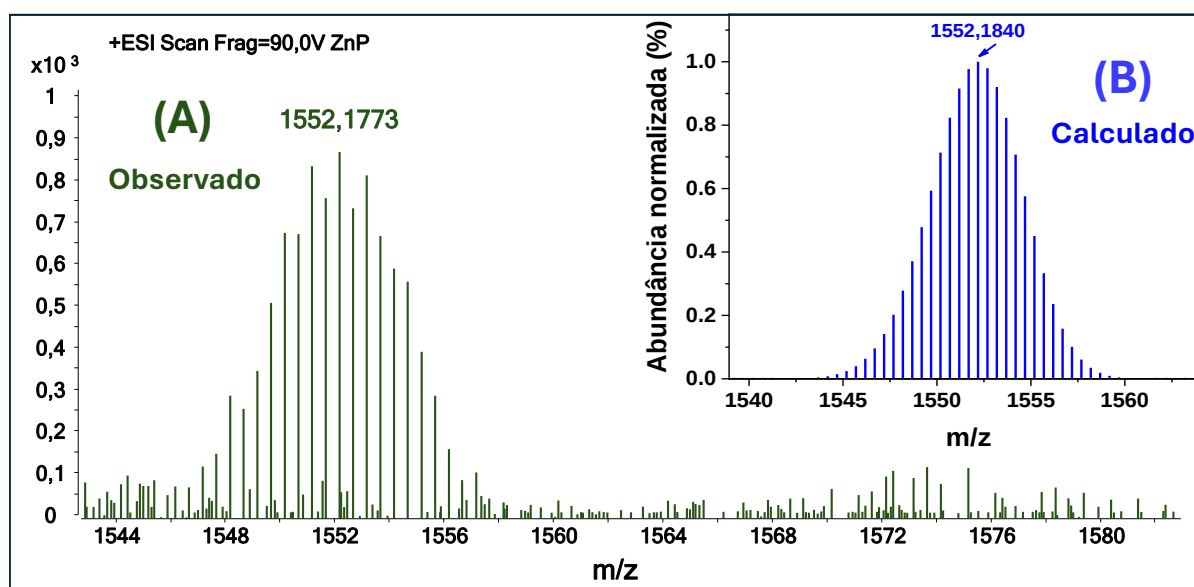


FIGURA A3 - Padrões isotópicos do espectro de massas (MS) para o composto ZnP: (A) experimental e (B) teórico.

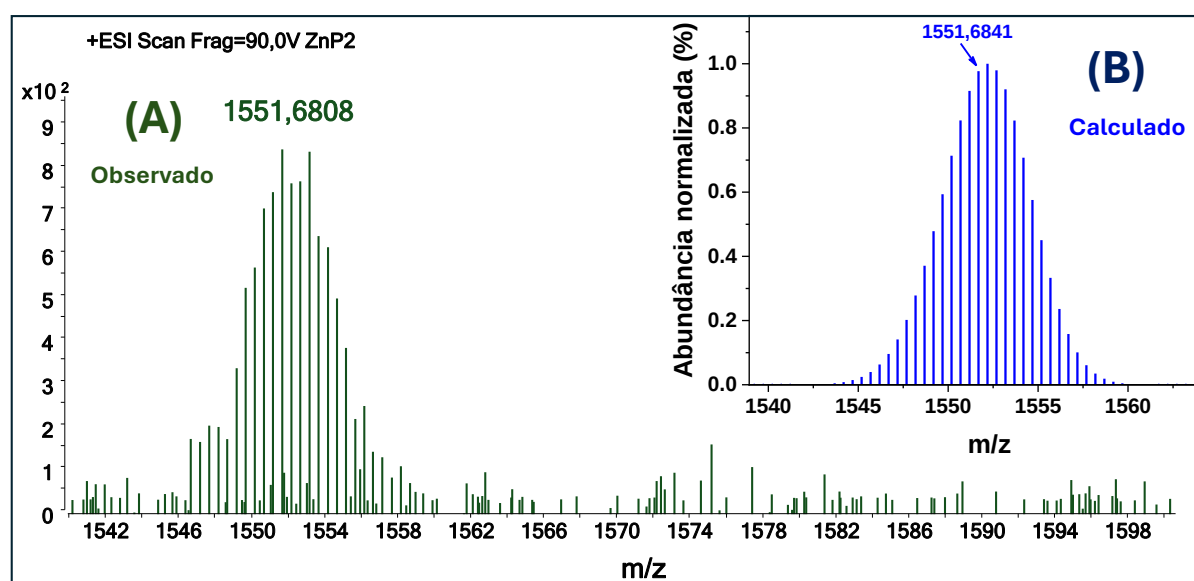


FIGURA A4 - Padrões isotópicos do espectro de massas (MS) para o composto ZnP₂: (A) experimental e (B) teórico.

TABELA A1 - Parâmetros e detalhes cristalográficos obtidos a partir da coleta da difração para o composto Mim.

Composto	Mim
Fórmula	C ₃₃ H ₃₄ ClF ₆ NP ₂ Ru
<i>D</i> _{calc.} / g cm ⁻³	1.602
□/mm ⁻¹	0.748
Peso molecular	757.07
Tamanho/mm ³	0.10×0.04×0.03
<i>T</i> /K	100(2)
Crystal System	monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 21/ <i>c</i>
<i>a</i> /Å	10.9504(2)
<i>b</i> /Å	13.6010(2)
<i>c</i> /Å	21.2832(3)
α/°	90
β/°	98.1320(10)
γ/°	90
<i>V</i> /Å ³	3137.97(9)
<i>Z</i>	4
<i>Z'</i>	1
Comprimento de onda /Å	0.71073
Tipo de radiação	MoKα
Measured Refl.	35690
Independent Refl.	5949
Reflections with <i>I</i> > 2(<i>I</i>)	5426
<i>R</i> _{int}	0.0308
Parâmetros	400
Restraints	0
Largest Peak	3.731
Deepest Hole	-1.213
GooF	1.038
<i>wR</i> ₂ (<i>all data</i>)	0.1050
<i>wR</i> ₂	0.1020
<i>R</i> ₁ (<i>all data</i>)	0.0443
<i>R</i> ₁	0.0404

TABELA A2 - Ângulos de ligação entre os átomos P1—Ru1—CX, N1—Ru1—CX e Cl1—Ru1—CX, sendo X = 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Ângulos de ligação (°)			
P1—Ru1—C2	127,42	N1—Ru1—C5	157,75
P1—Ru1—C3	163,78	N1—Ru1—C6	147,87
P1—Ru1—C4	147,33	N1—Ru1—C7	110,19
P1—Ru1—C5	111,53	Cl1—Ru1—C2	146,54
P1—Ru1—C6	91,09	Cl1—Ru1—C3	110,97
P1—Ru1—C7	97,99	Cl1—Ru1—C4	90,61
N1—Ru1—C2	86,46	Cl1—Ru1—C5	96,81
N1—Ru1—C3	92,13	Cl1—Ru1—C6	126,41
N1—Ru1—C4	121,33	Cl1—Ru1—C7	163,67

TABELA A3 - Ângulos de ligação entre os átomos CX—Ru1—CY, sendo X e Y variando entre 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Ângulos de ligação (°)			
C2—Ru1—C3	36,99	C3—Ru1—C7	66,08
C2—Ru1—C4	66,27	C4—Ru1—C5	36,84
C2—Ru1—C5	79,29	C4—Ru1—C6	65,71
C2—Ru1—C6	67,28	C4—Ru1—C7	78,06
C2—Ru1—C7	36,82	C5—Ru1—C6	36,50
C3—Ru1—C4	36,27	C5—Ru1—C7	67,09
C3—Ru1—C5	66,27	C6—Ru1—C7	37,91
C3—Ru1—C6	78,14		

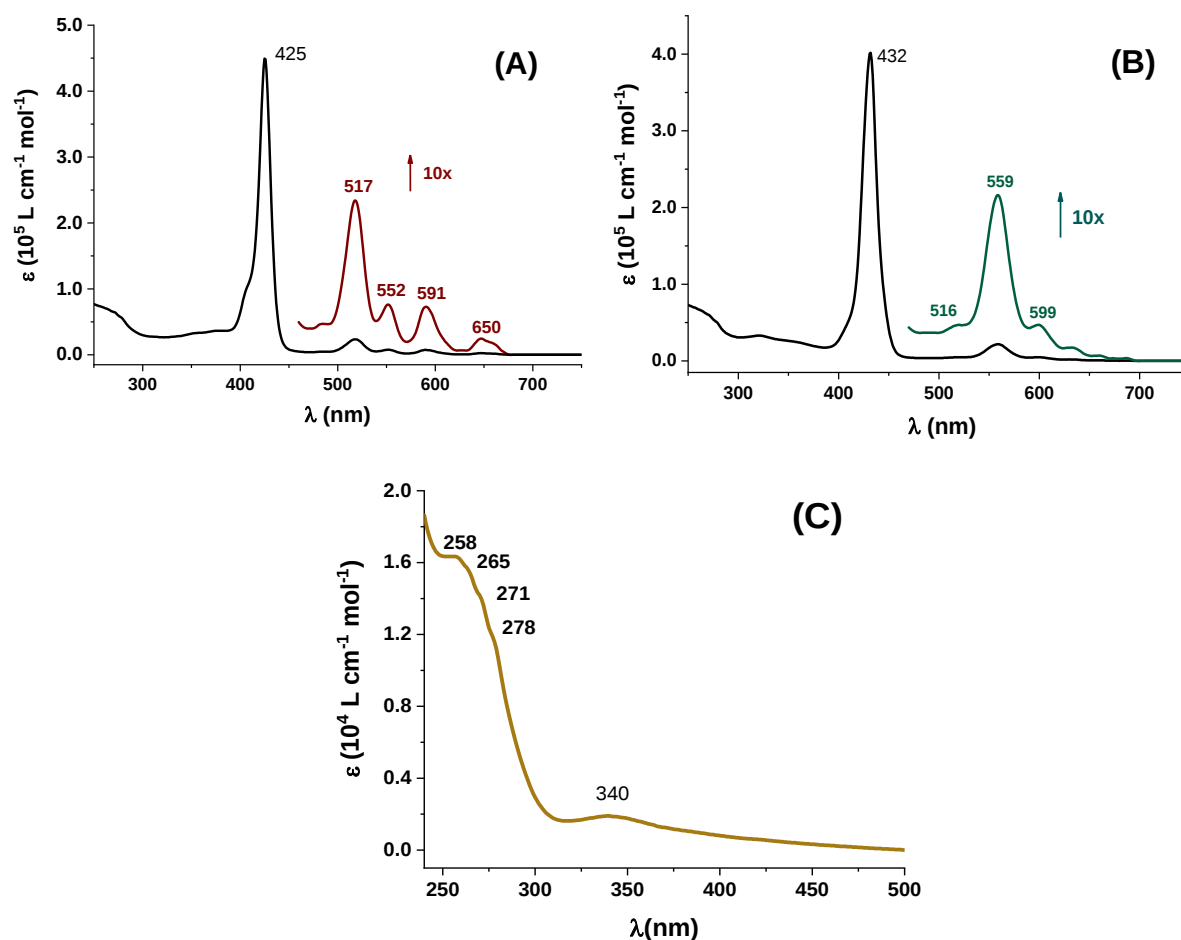


FIGURA A5 - Espectro na região do UV-vis para a H₂P2 (A), ZnP2 (B) e Mim (C) utilizando diclorometano como solvente em preto e ampliação em rosa.

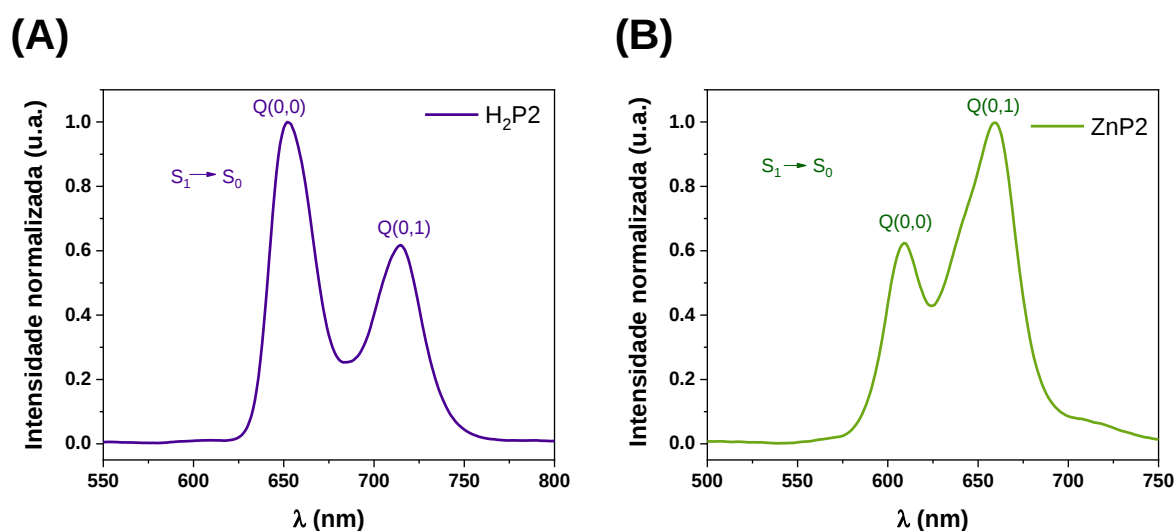


FIGURA A6 - Espectros de fluorescência dos compostos H₂P2 (A) e ZnP2 (B) em diclorometano.

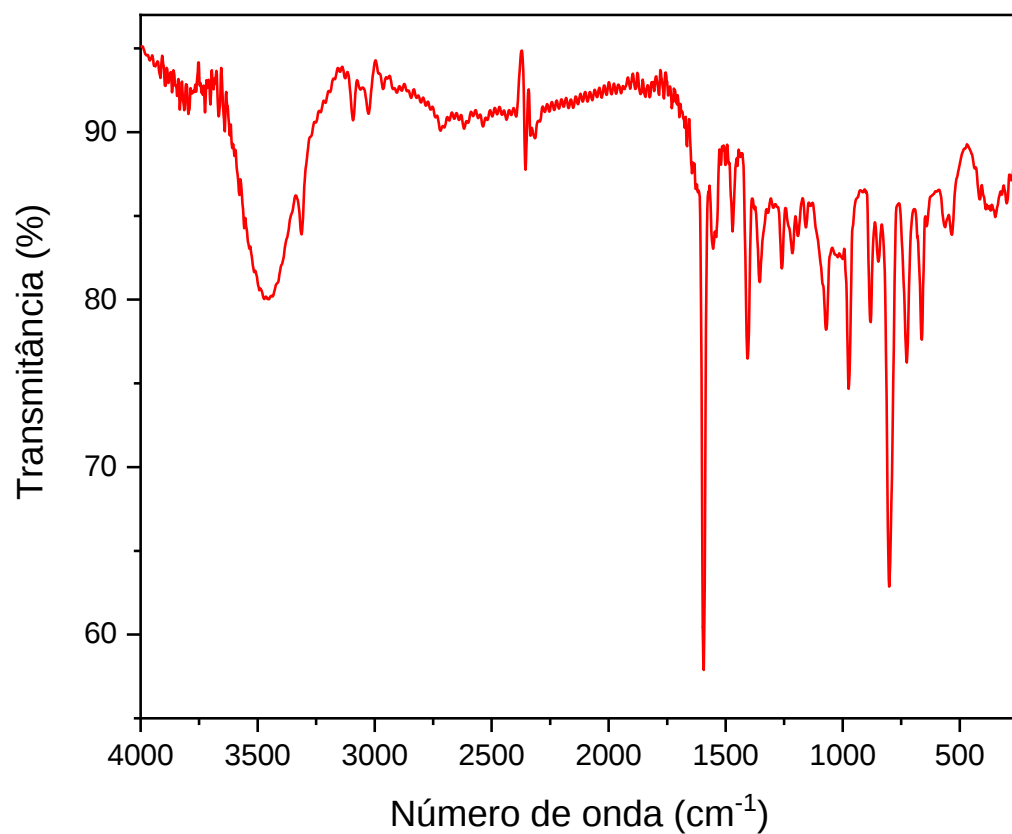


FIGURA A7 - Espectro na região do infravermelho do composto $\text{H}_2\text{T4PyP}$ em CsI.

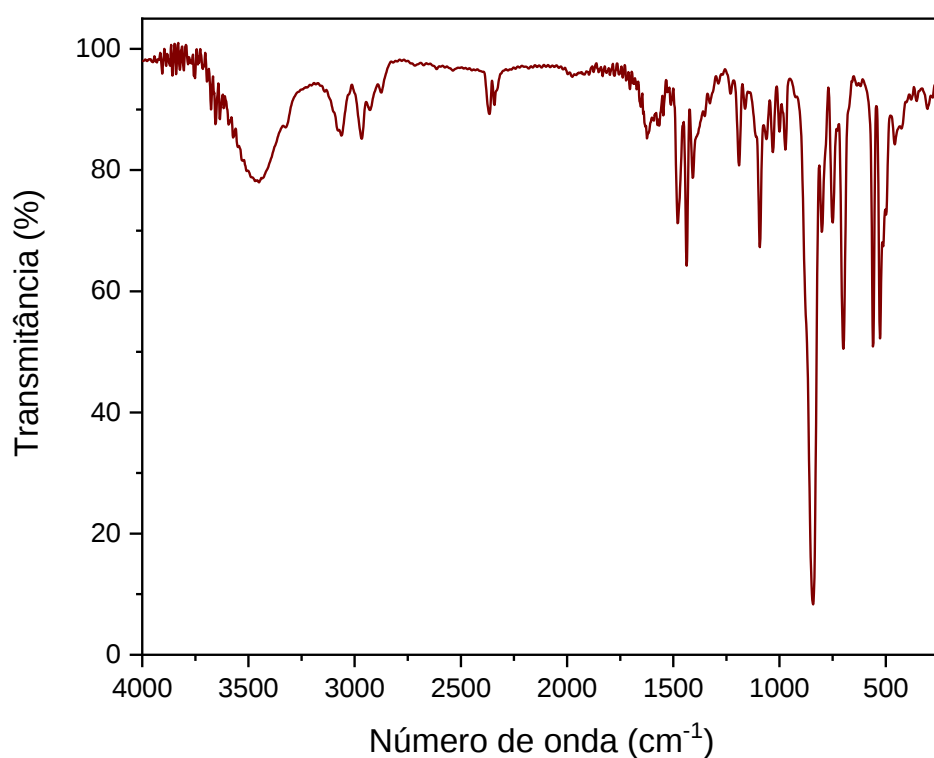
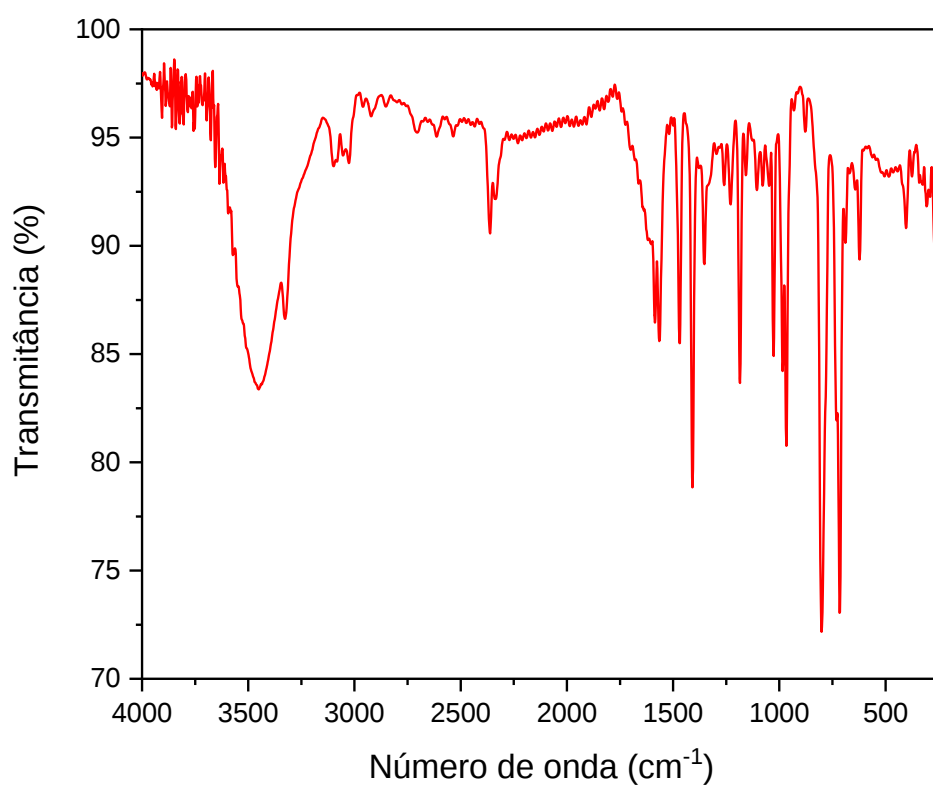
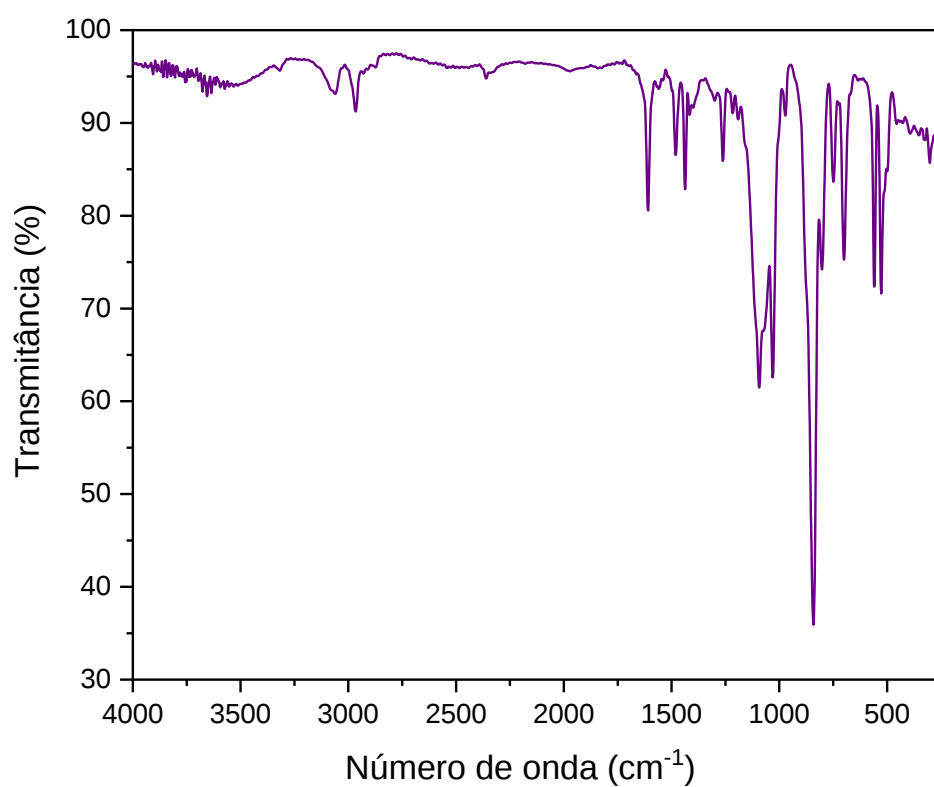


FIGURA A8 - Espectro na região do infravermelho do composto $\text{H}_2\text{P2}$ em CsI.

FIGURA A9 - Espectro na região do infravermelho do composto H₂T3Py em CsI.FIGURA A10 - Espectro na região do infravermelho do composto H₂P em CsI.

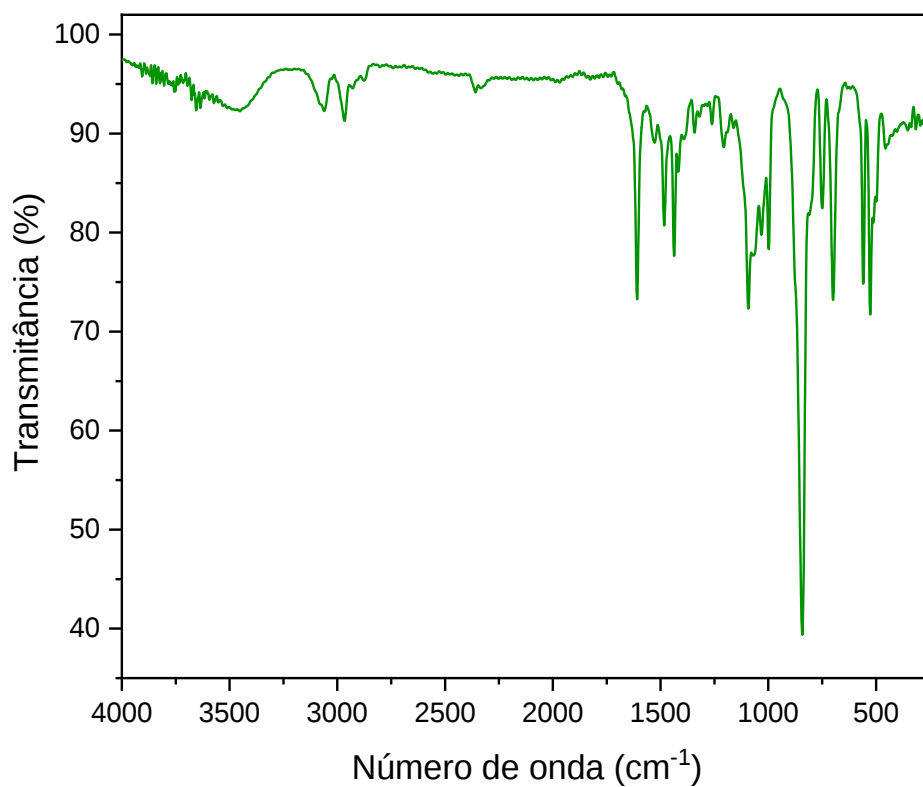


FIGURA A11 - Espectro na região do infravermelho do composto ZnP em CsI.

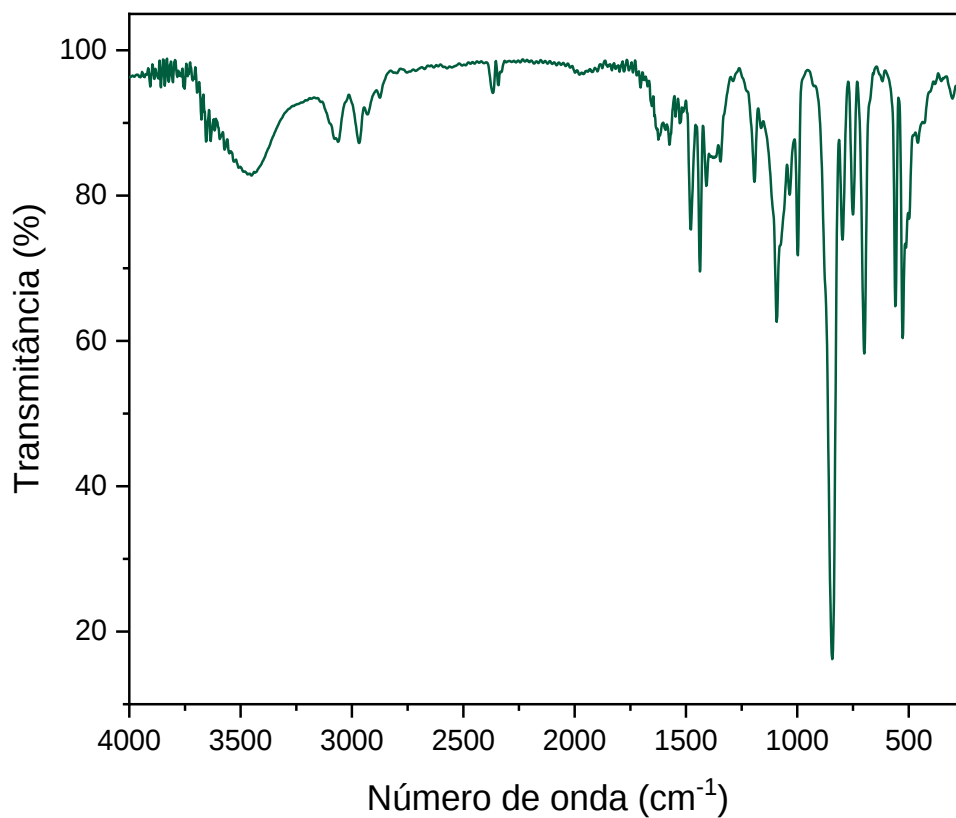


FIGURA A12 - Espectro na região do infravermelho do composto ZnP2 em CsI.

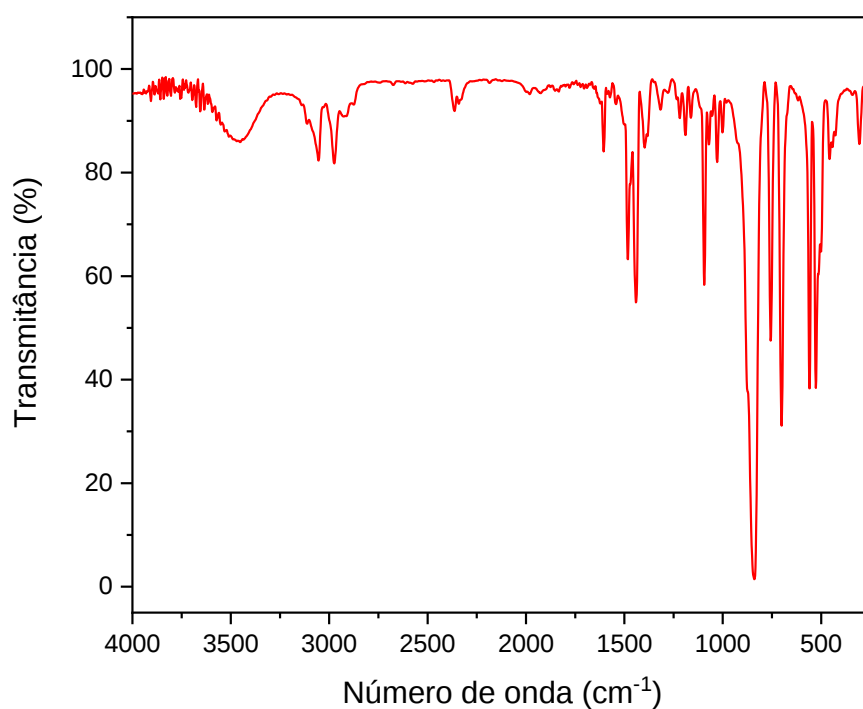
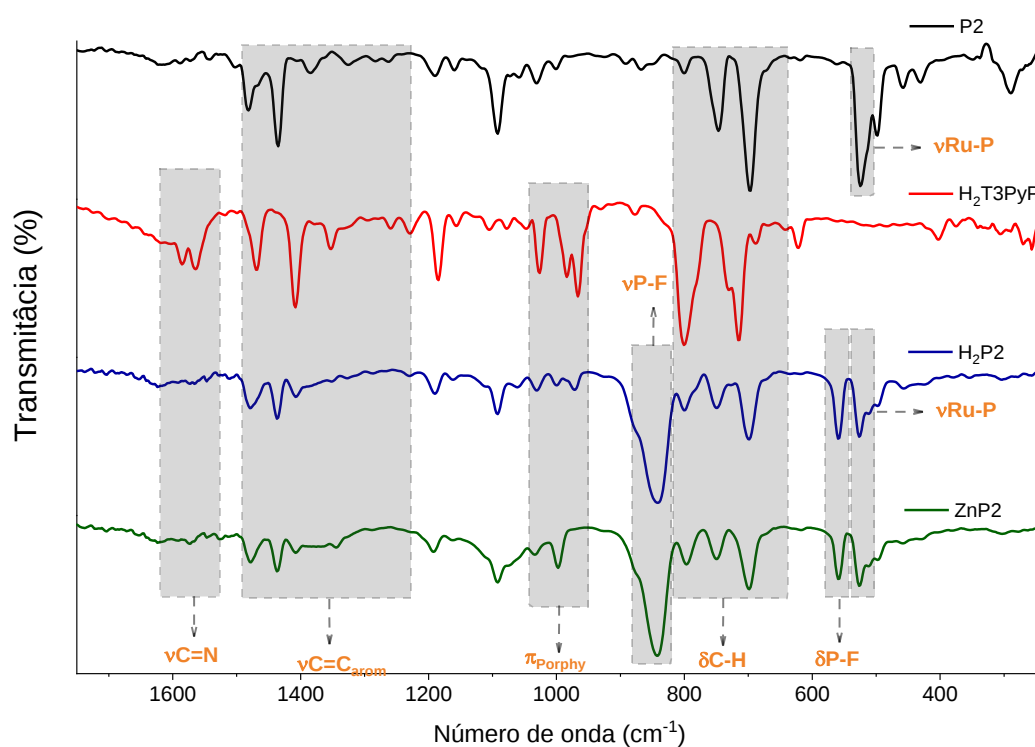


FIGURA A13 - Espectro na região do infravermelho do composto Mim em CsI.

FIGURA A14 - Espectros na região do Infravermelho para o precursor $[\text{Ru}(\text{p-cim})(\text{PPh}_3)\text{Cl}_2]$ em preto, $\text{H}_2\text{T3PyP}$ em vermelho, $\text{H}_2\text{P2}$ em azul e ZnP2 em verde, utilizando CsI como solvente.

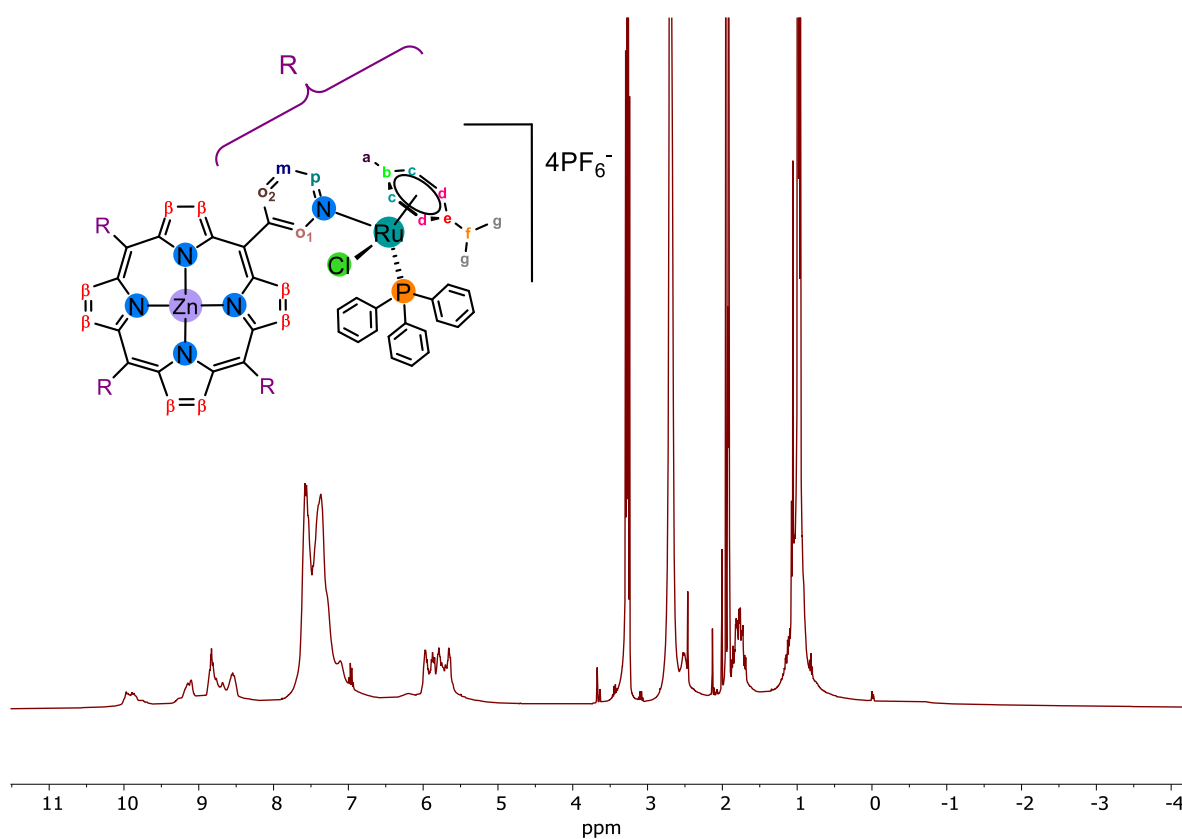
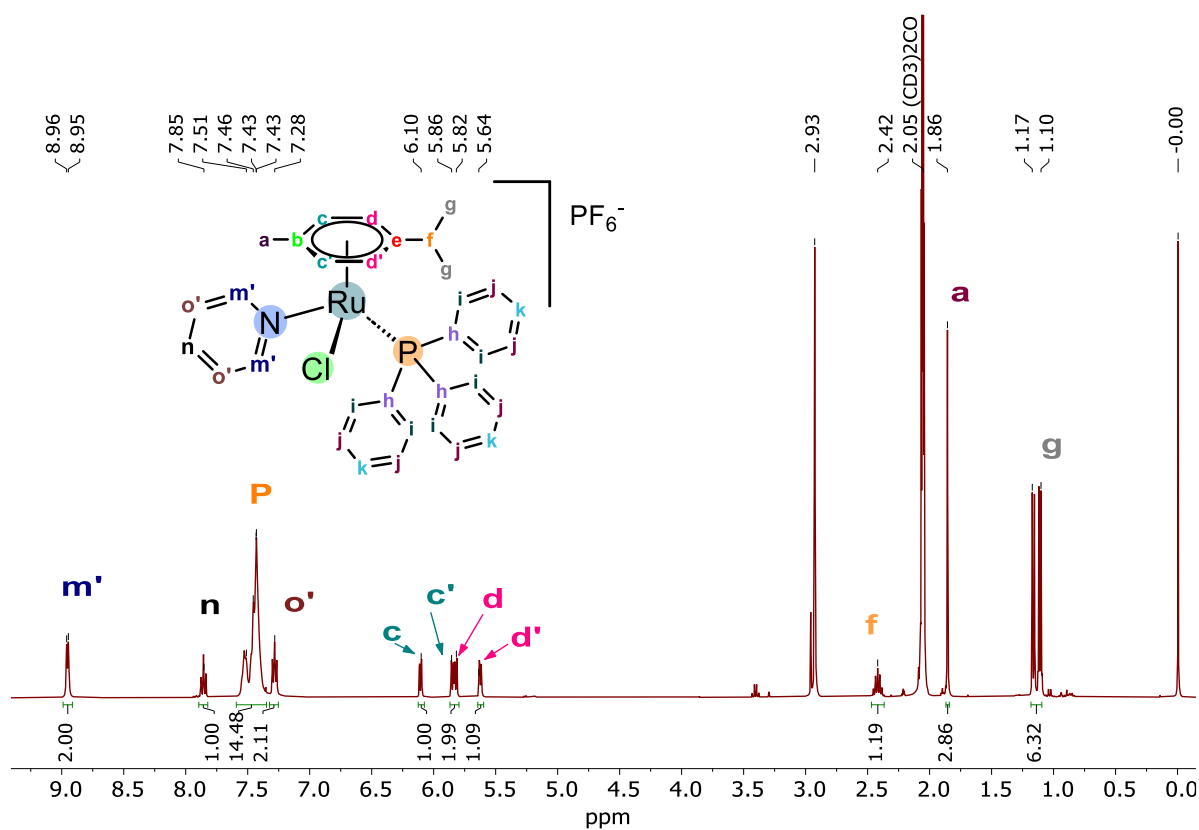
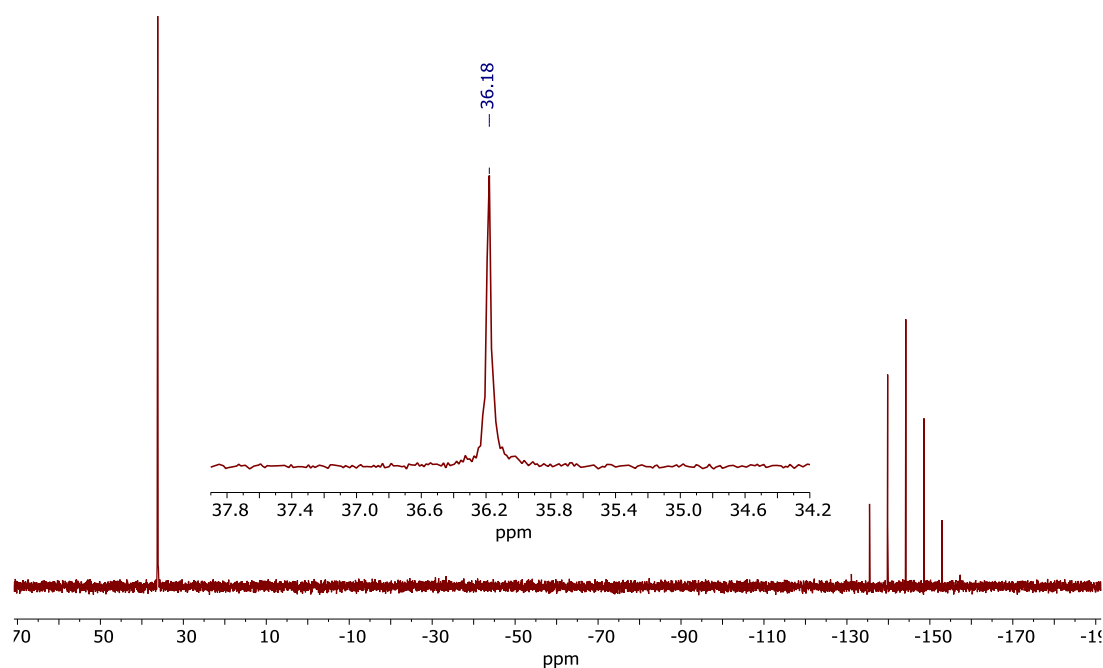
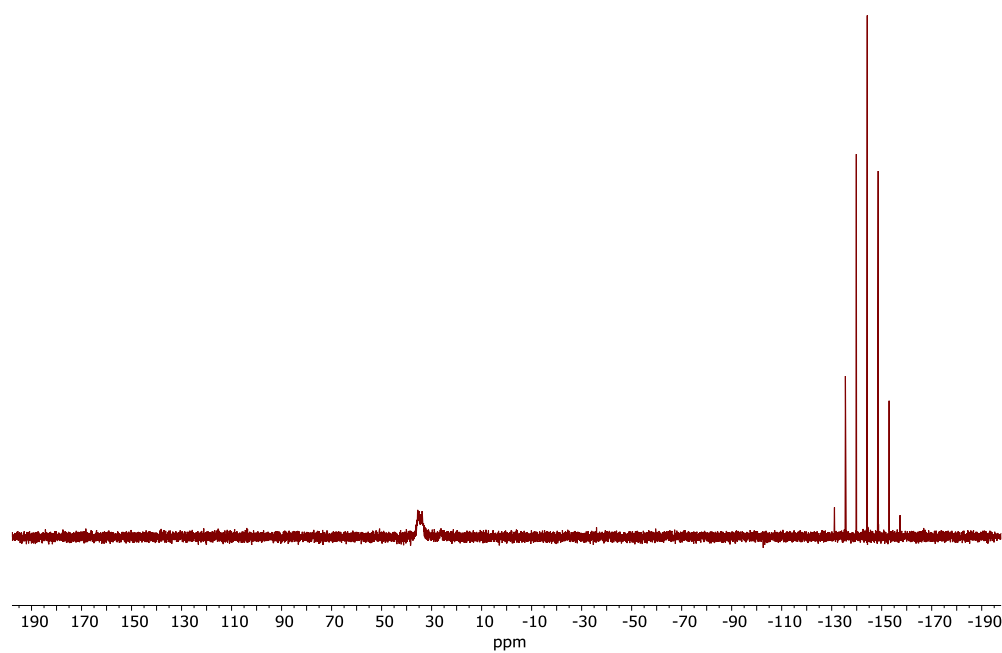
FIGURA A15 - Espectro de RMN ^1H para o composto ZnP2 em acetona- d_6 .

FIGURA A16 - Espectro de RMN ^1H para o composto Mim em acetona- d_6 .FIGURA A17 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o composto ZnP em acetona- d_6 .FIGURA A18 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o composto ZnP2 em acetona- d_6 .

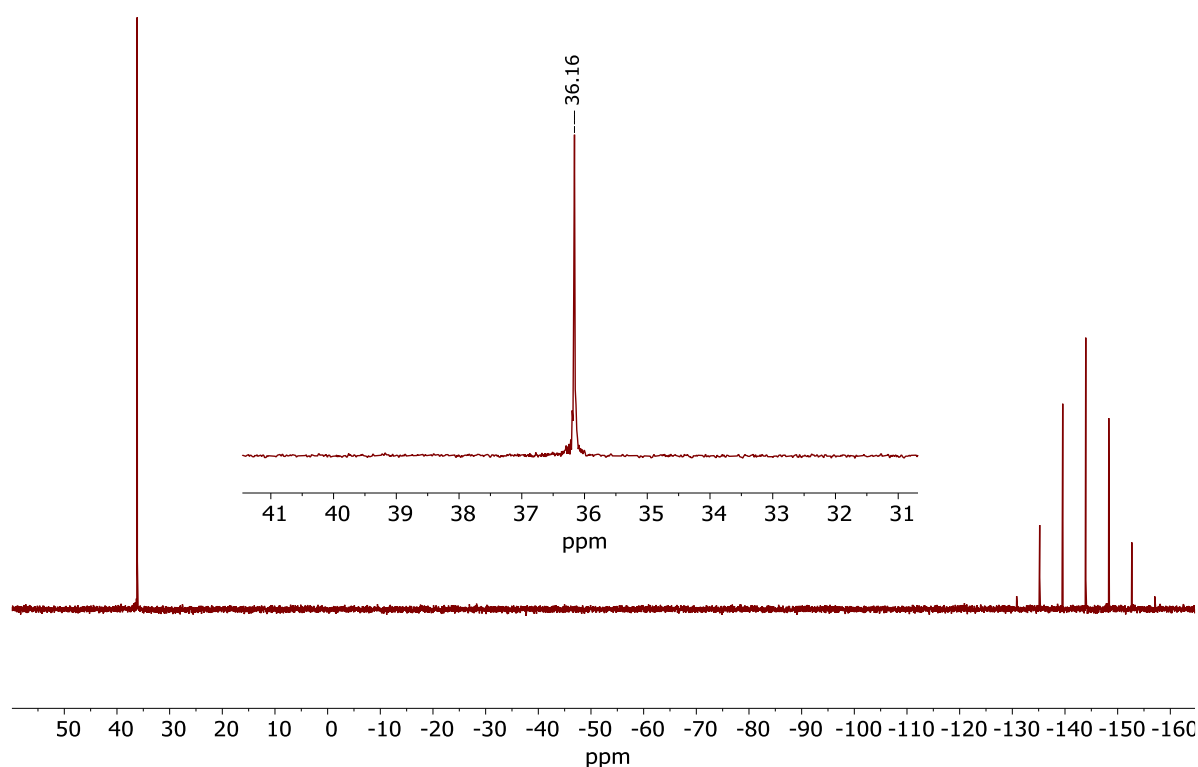


FIGURA A19 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o composto Mim em acetona- d_6 .

TABELA A4 - Energias livre de Gibbs calculados com a otimização usando a nível de teoria DFT/BP86-D3(BJ)/TZP utilizando o programa ADF.

Estruturas	Energia livre de Gibbs (kcal mol ⁻¹)
H ₂ P - SRRR	-44218,79
H ₂ P - SRRS	-44215,29
H ₂ P - SRSR	-44212,79
H ₂ P - RRRR	-44208,68
H ₂ P2	-44238,02
ZnP	-44106,63
ZnP2	-44096,58

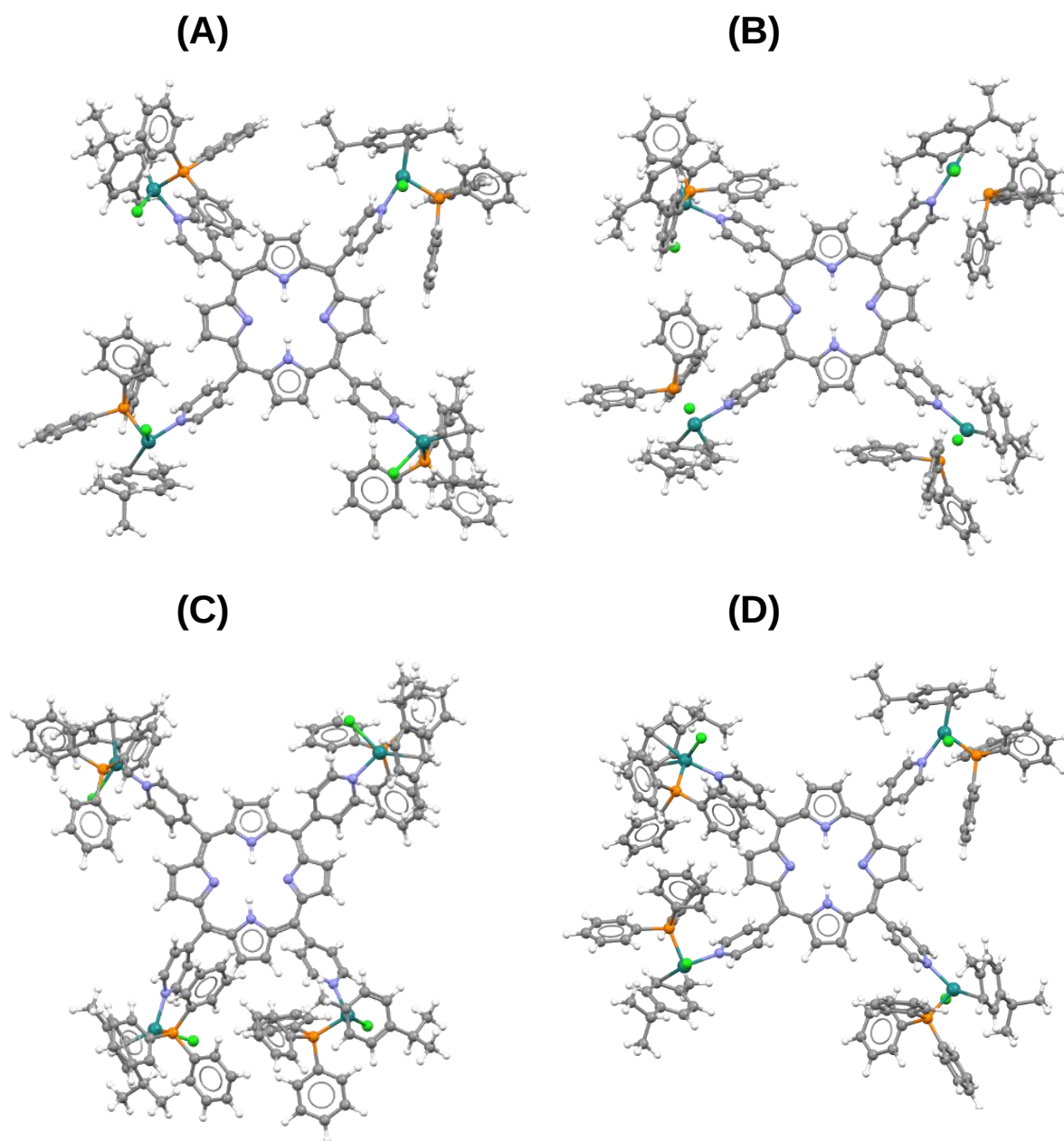


FIGURA A20 - Estruturas otimizadas para o complexo H_2P em diferentes combinações de quiralidade dos centros metálicos de rutênio: (A) RRRR; (B) SRRR; (C) SRRS; (D) SRSR.

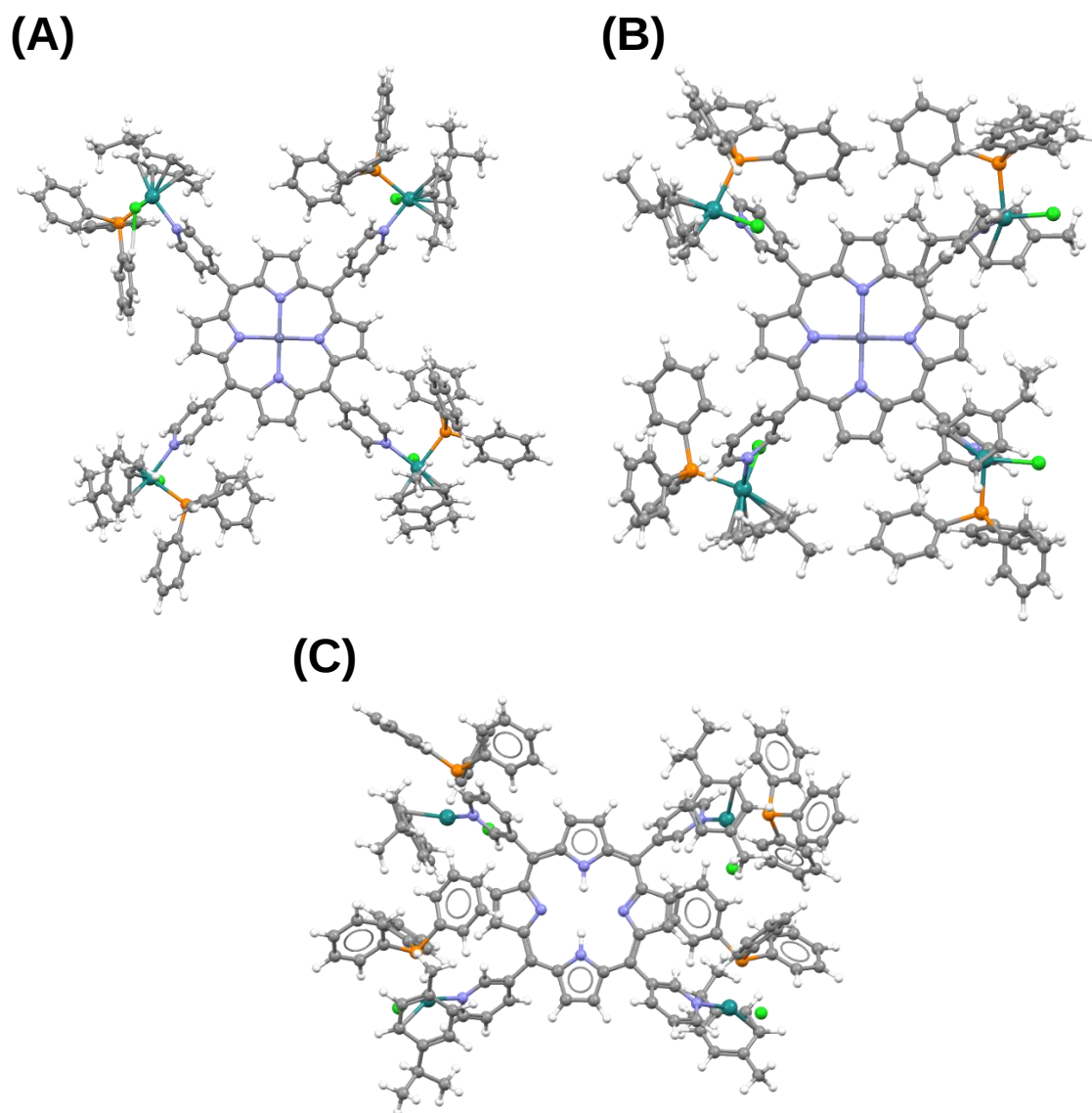


FIGURA A21 - Estruturas otimizadas para o complexo ZnP (A), ZnP2 (B) e H₂P2 (C).

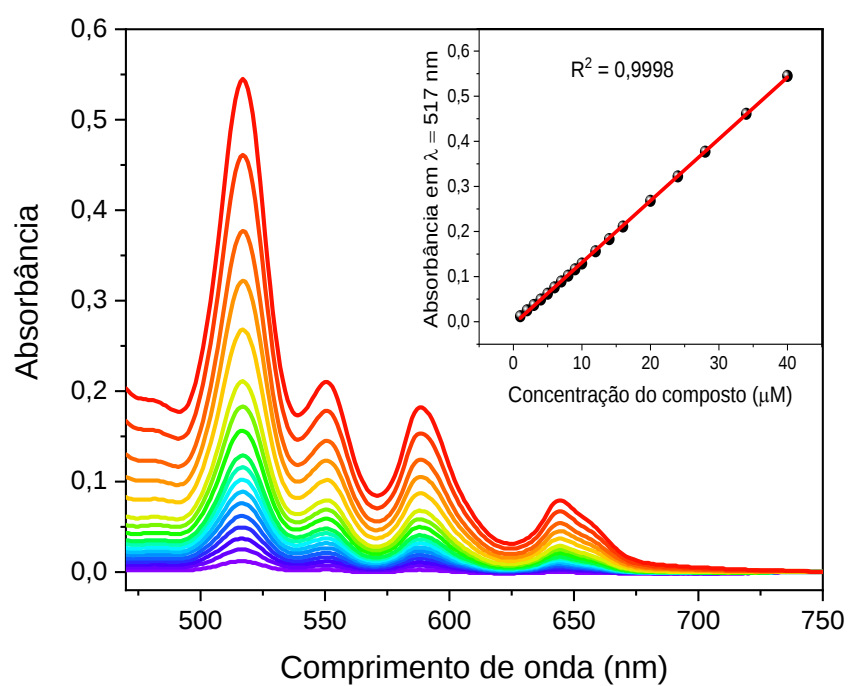


FIGURA A22 - Estudo de agregação do composto H₂P₂ em tampão Trizma e DMF (4:1) UV-vis.

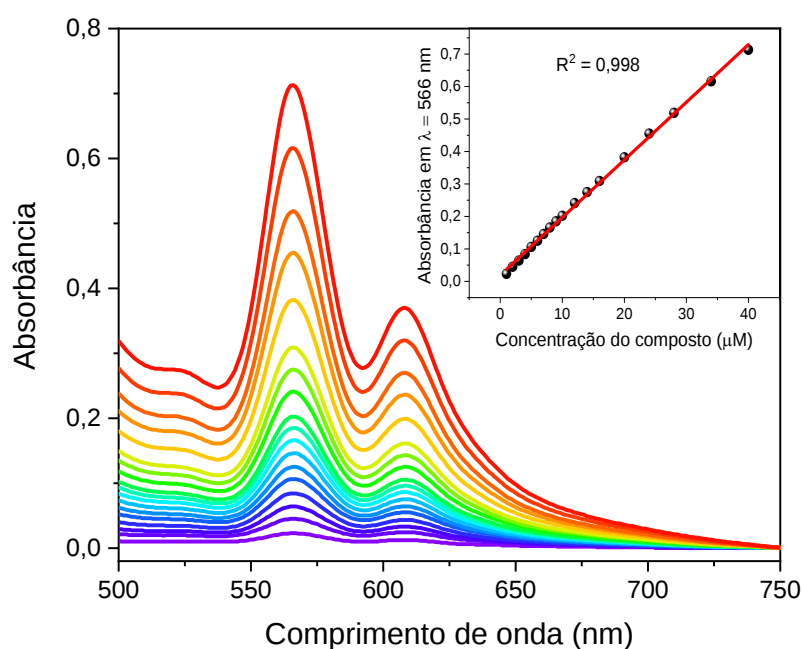


FIGURA A23 - Estudo de agregação do composto ZnP em tampão Trizma e DMF (4:1) UV-vis.

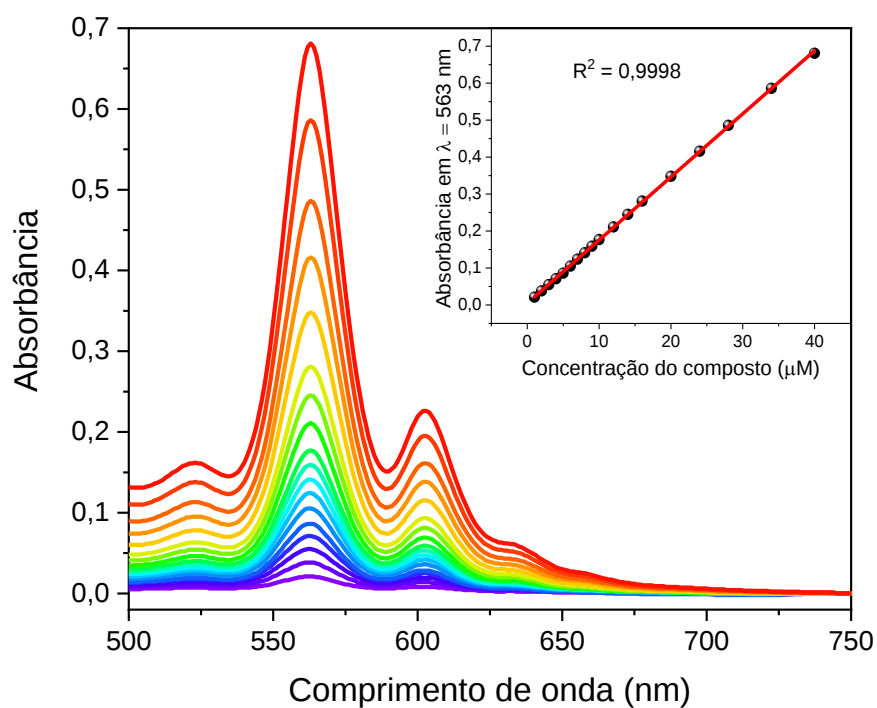


FIGURA A24 - Estudo de agregação do composto ZnP2 em tampão Trizma e DMF (4:1) UV-vis.

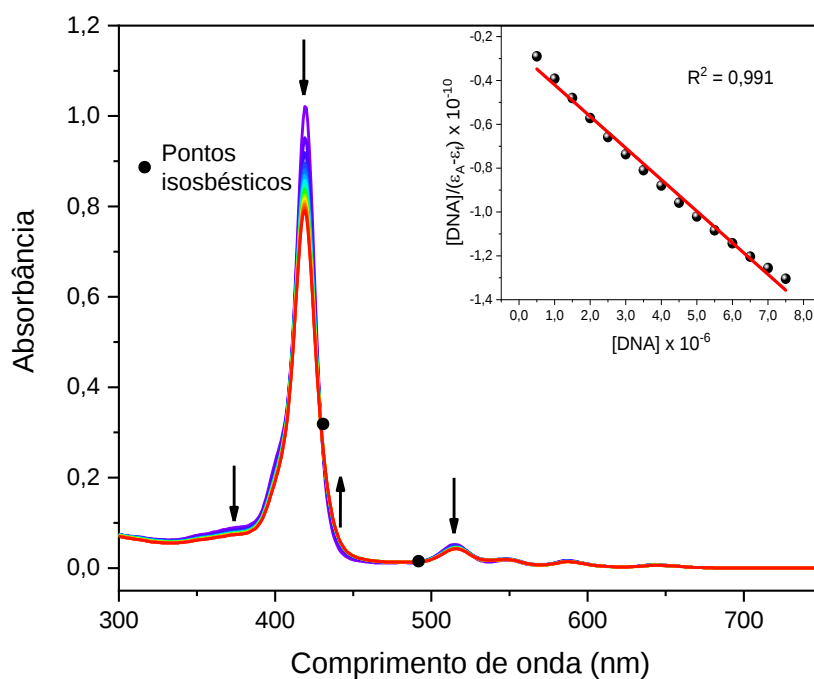


FIGURA A25 - Titulação espectrofotométrica do composto H₂P2 com ct-DNA em tampão Trizma e DMF (4:1).

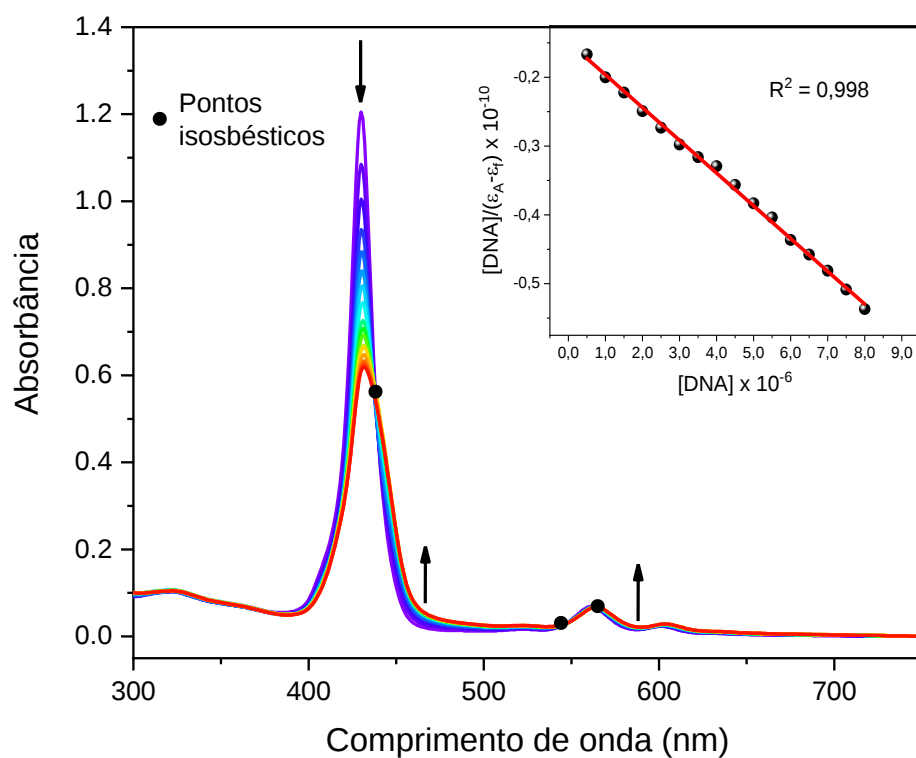


FIGURA A26 - Titulação espectrofotométrica do composto ZnP com ct-DNA em tampão Trizma e DMF (4:1).

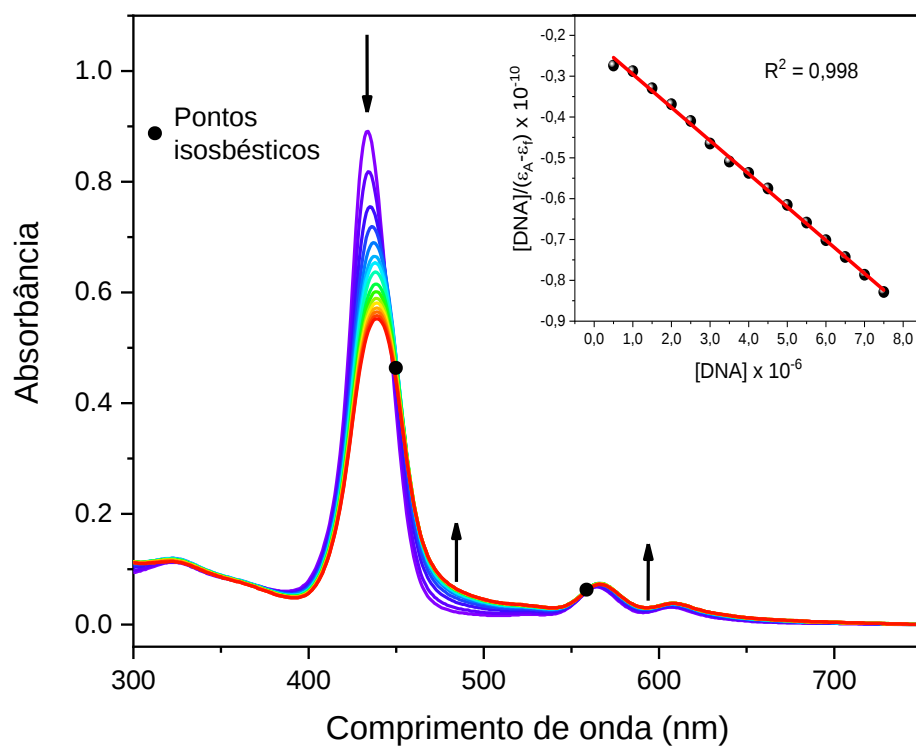


FIGURA A27 - Titulação espectrofotométrica do composto ZnP2 com ct-DNA em tampão Trizma e DMF (4:1).

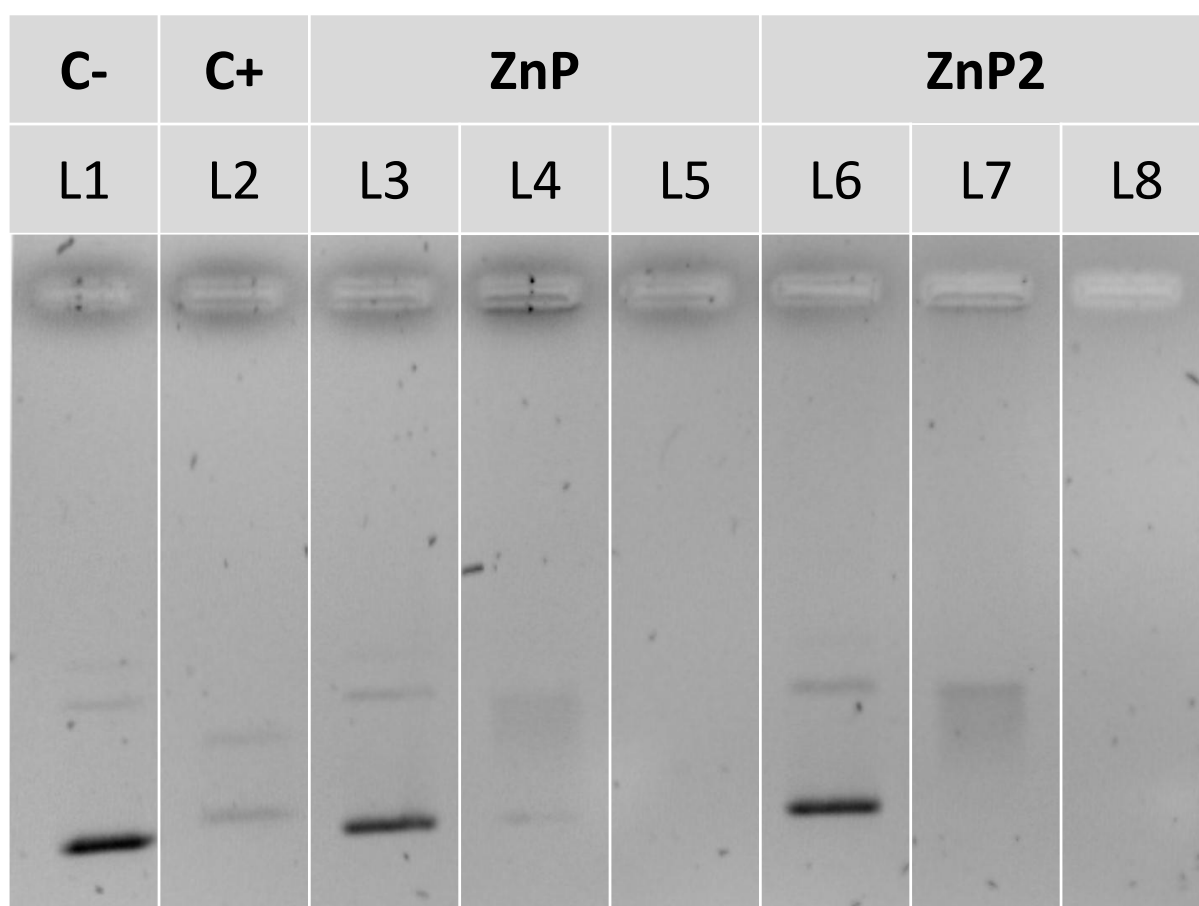


FIGURA A28 - Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 com período de incubação de 24 h e 10 % de DMF. Sendo que L1 ou C- é o controle negativo contendo plasmídeo (0,25 μ g) e DMF). L2 ou C+ é o controle positivo contendo plasmídeo e cisplatina (5 μ M). Para o complexo ZnP (L3 = 0,1; L4 = 1,0; L5 = 10 μ M) e ZnP2 (L6 = 0,1; L7 = 1,0; L8 = 10 μ M).

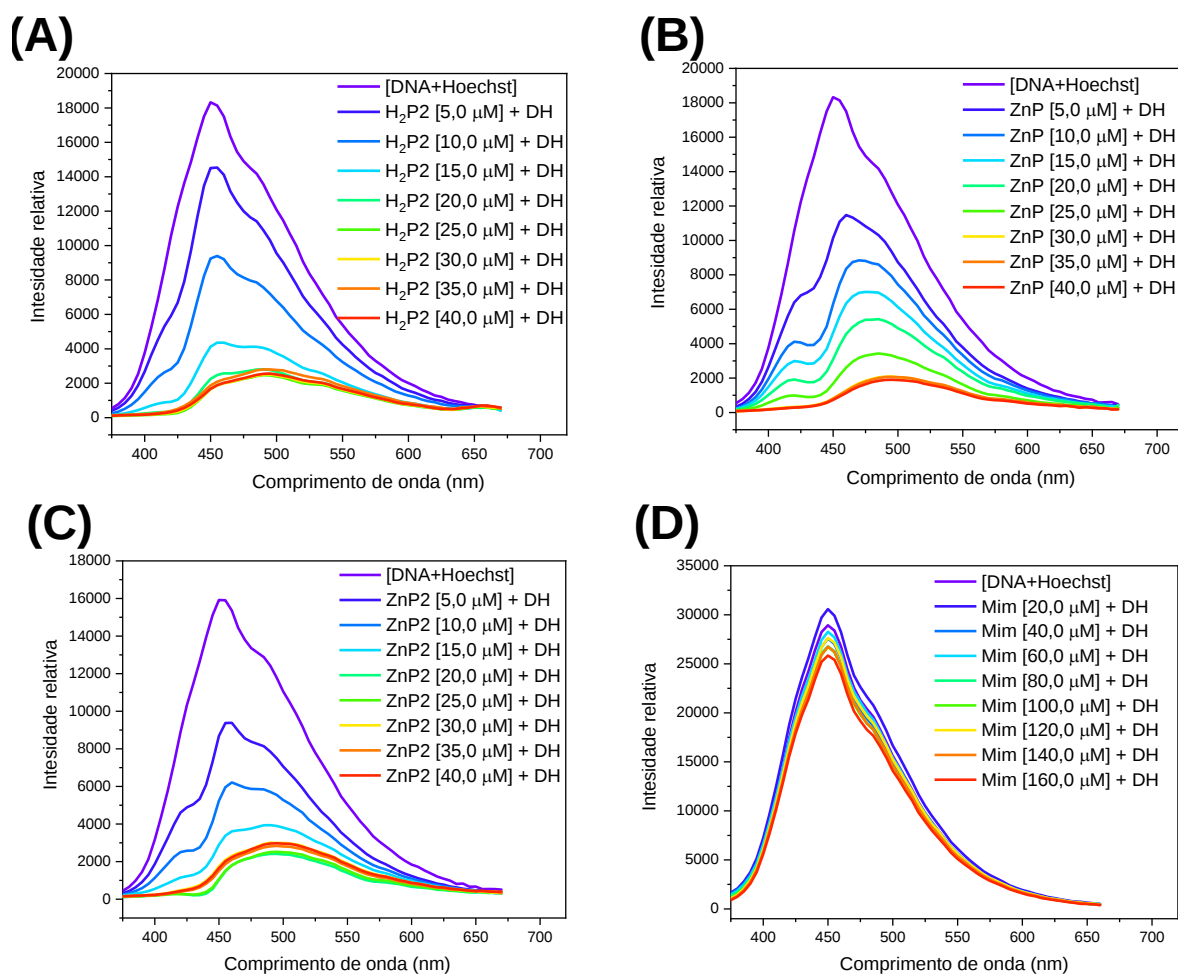


FIGURA A29 - Ensaio de supressão de fluorescência de DNA-Hoechst (DH) fixando a concentração de ct-DNA (100,0 μM) e Hoechst 33342 (5,0 μM), em tampão Trizma:DMF (4:1). Espectros de supressão de fluorescência na ausência e presença do composto H_2P2 (A), ZnP (B), ZnP2 (C) e Mim (D) variando a razão molar [PRAP]/[ct-DNA] e [Mim]/[ct-DNA] em 0 - 0,4 e 0 - 1,6, respectivamente.

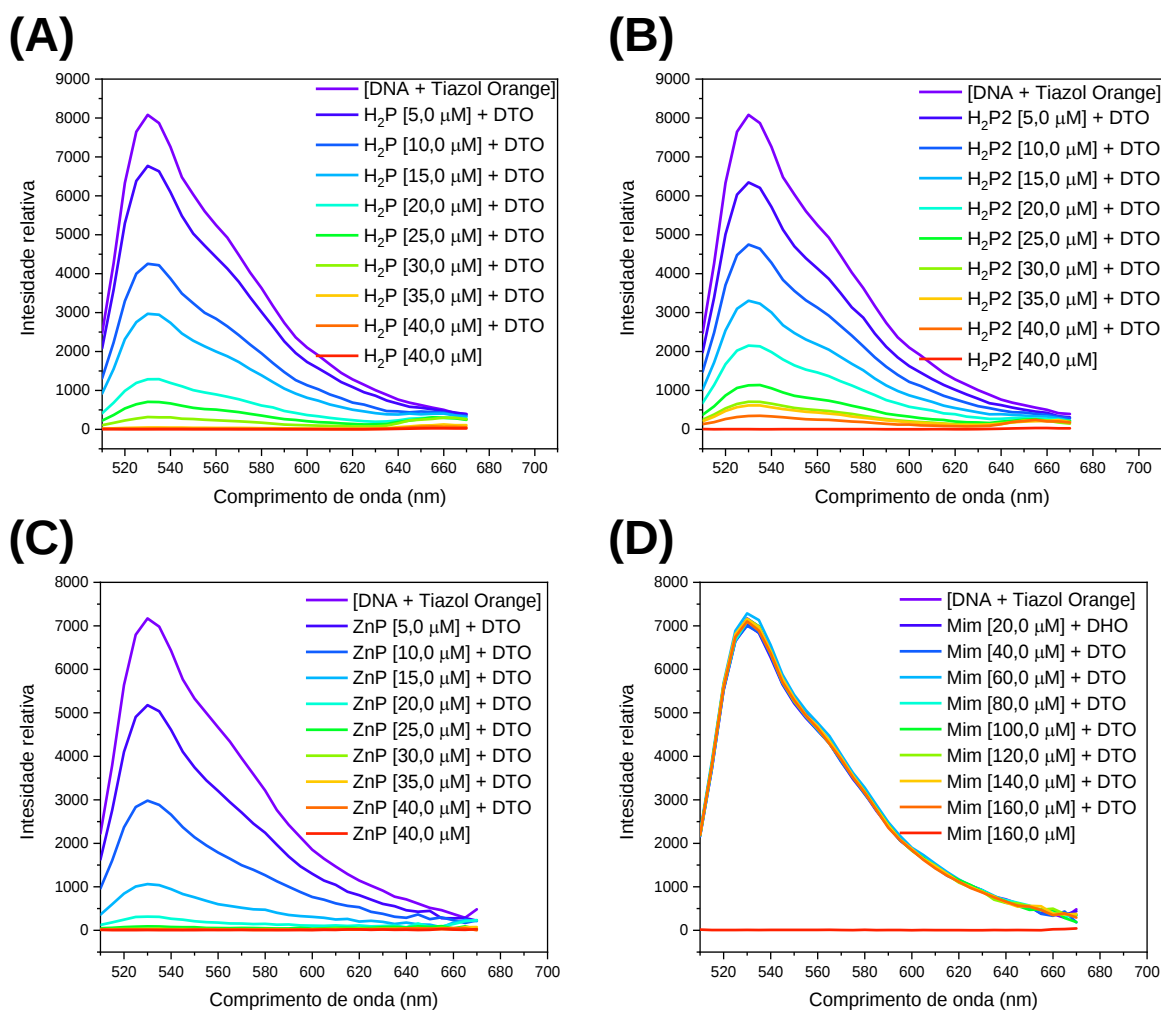


FIGURA A30 - Ensaio de supressão de fluorescência de DNA-Laranja de tiazol (DTO) fixando a concentração de ct-DNA (100,0 μM) e Laranja de tiazol (5,0 μM), em tampão Trizma:DMF (4:1). Espectros de supressão de fluorescência na ausência e presença do composto H₂P (A), H₂P2 (B), ZnP (C) e Mim (D) variando a razão molar [PRAP]/[ct-DNA] e [Mim]/[ct-DNA] em 0 - 0,4 e 0 - 1,6, respectivamente.

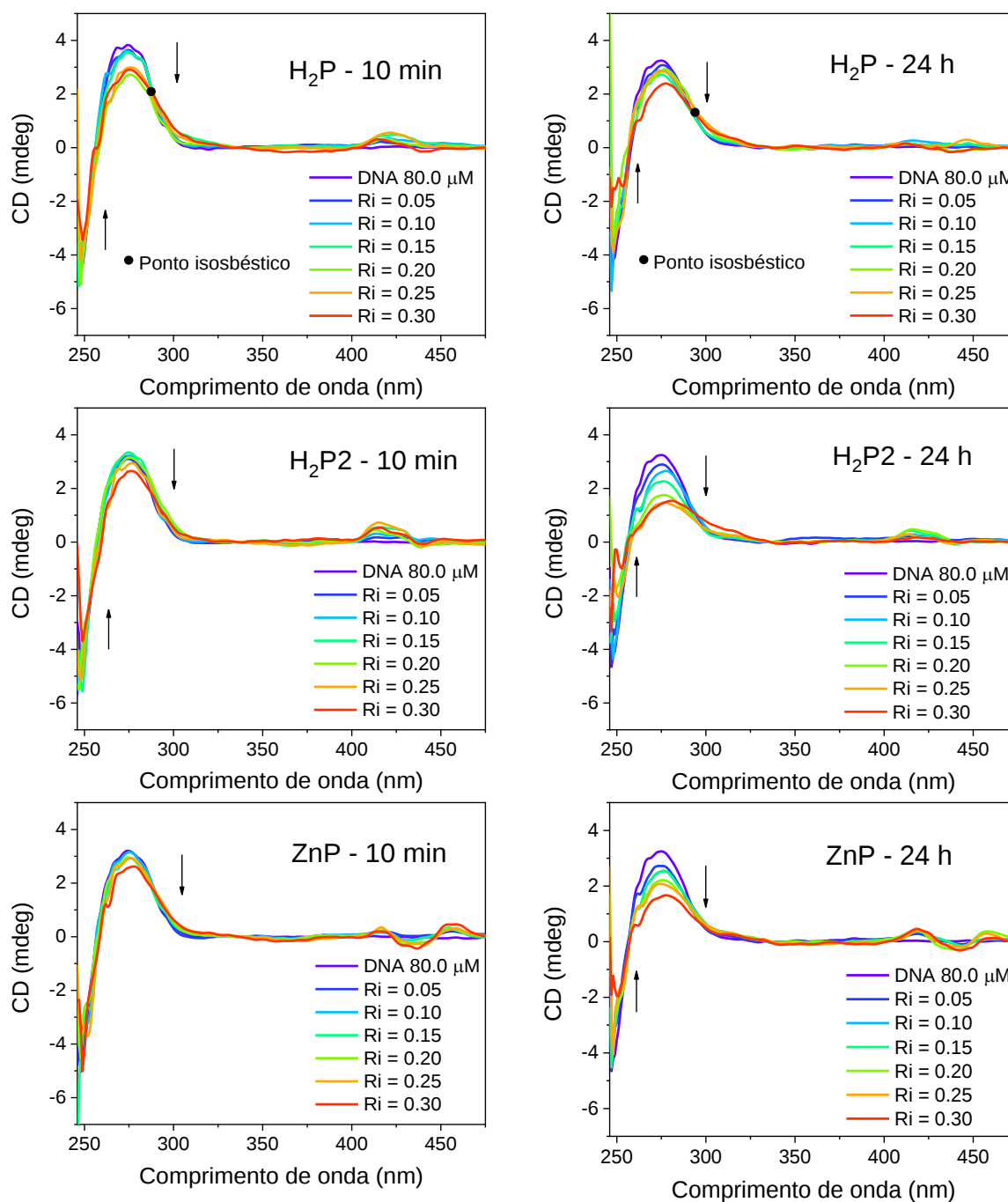


FIGURA A31 - Espectros de dicroísmo circular de ct-DNA ($80,0 \mu\text{M}$) em tampão Trizma:DMF (1:4), na presença complexo mimético nas concentrações de 0, 16, 32, 48, 64, 80, 96 μM obtendo razão molar de 0; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20. Para os compostos H_2P , H_2P_2 e ZnP com período de incubação de 10 minutos temperatura ambiente; e incubação durante 24 h, a 37°C .

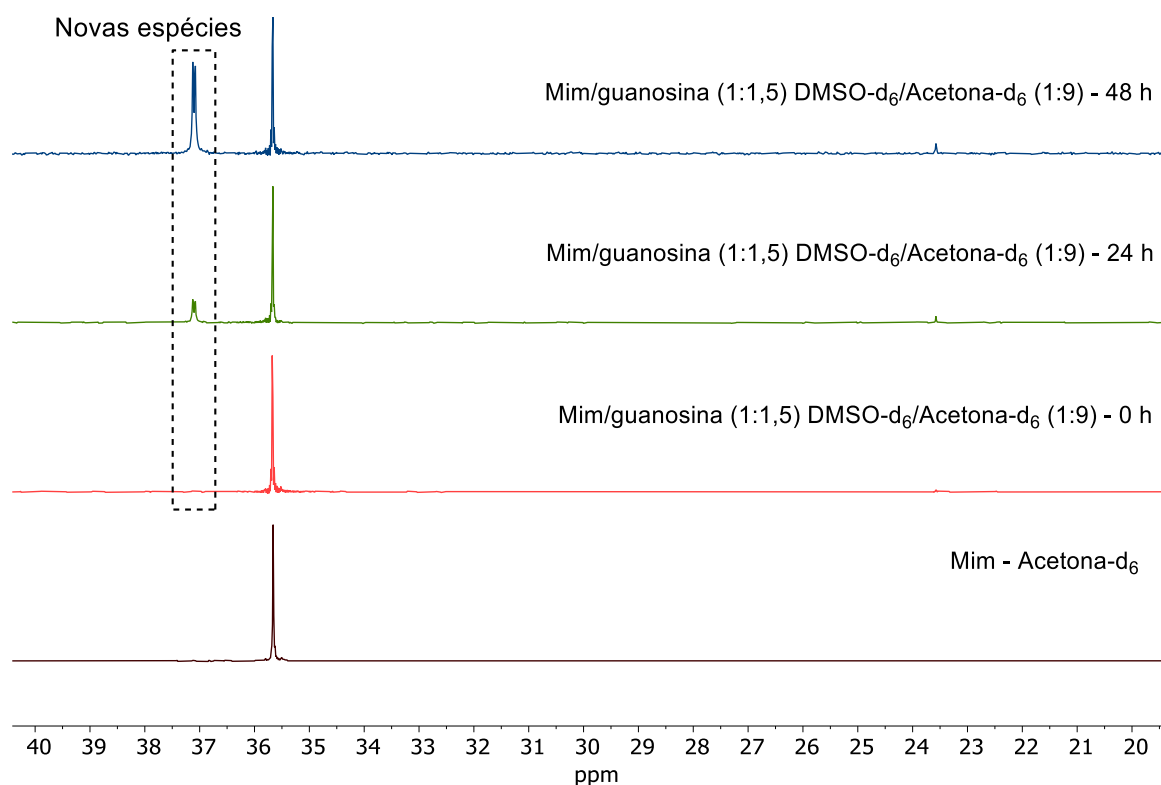


FIGURA A32 - Espectros de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ RMN da interação do composto mimético e guanosina (1:1,5), no período de 0-48 h utilizando acetona- d_6 e DMSO- d_6 (9:1).

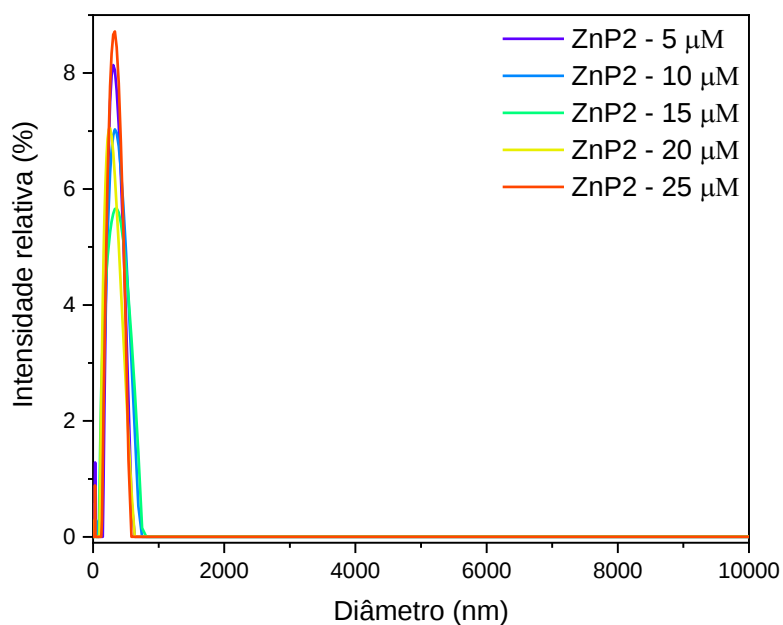


FIGURA A33 - Medidas da dispersão do tamanho de partículas por DLS do complexo ZnP2 em diferentes concentrações (5,0 a 25,0 μM) em tampão Trizma:DMF (1:4).

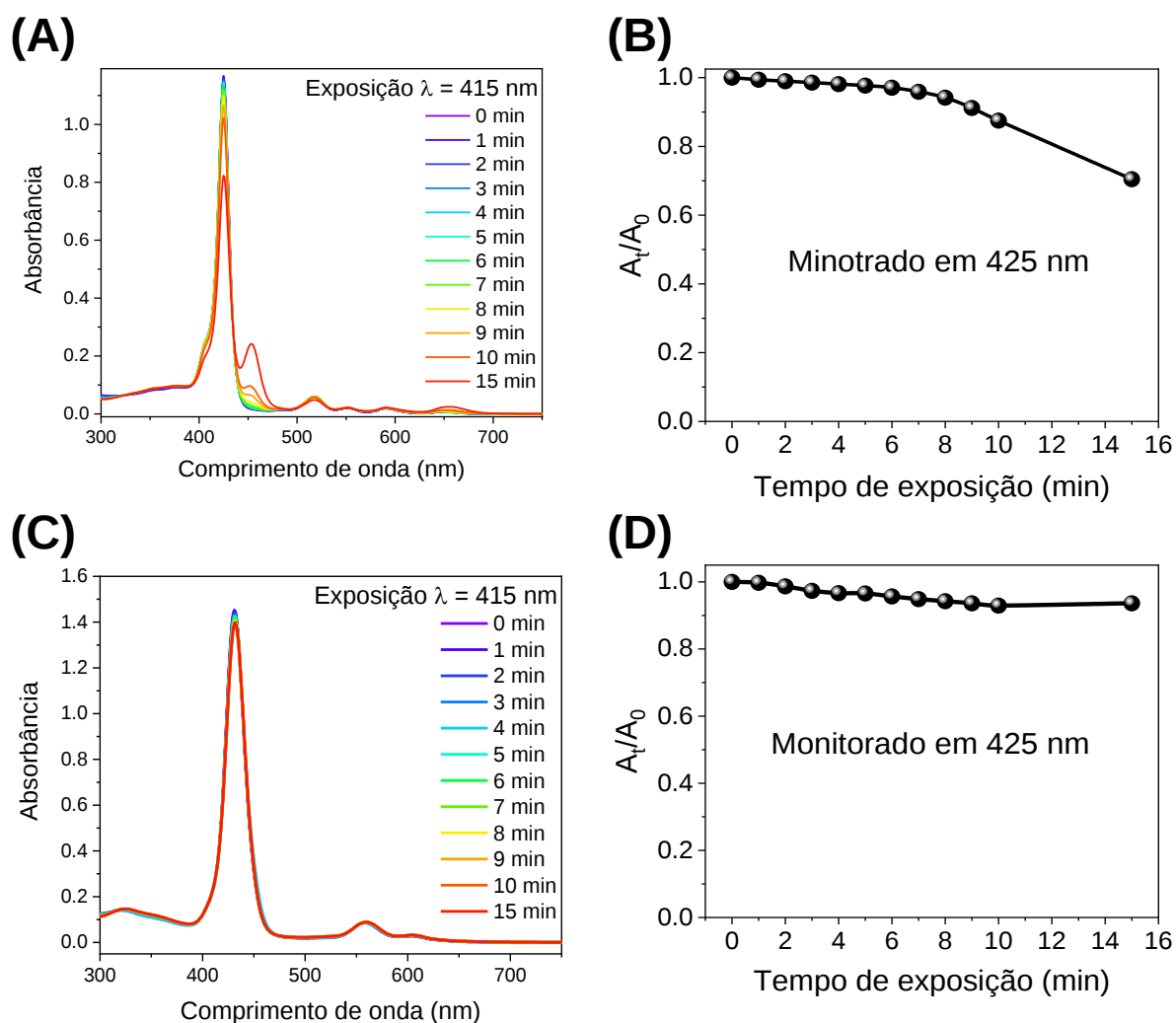


FIGURA A34 - Estudo de fotoestabilidade dos compostos H_2P2 (A) e $ZnP2$ (C) com tempo de exposição de 15 minutos, com suas respectivas curvas monitoradas na banda Soret dos compostos H_2P2 (B) e $ZnP2$ (D), usando diclorometano como solvente.

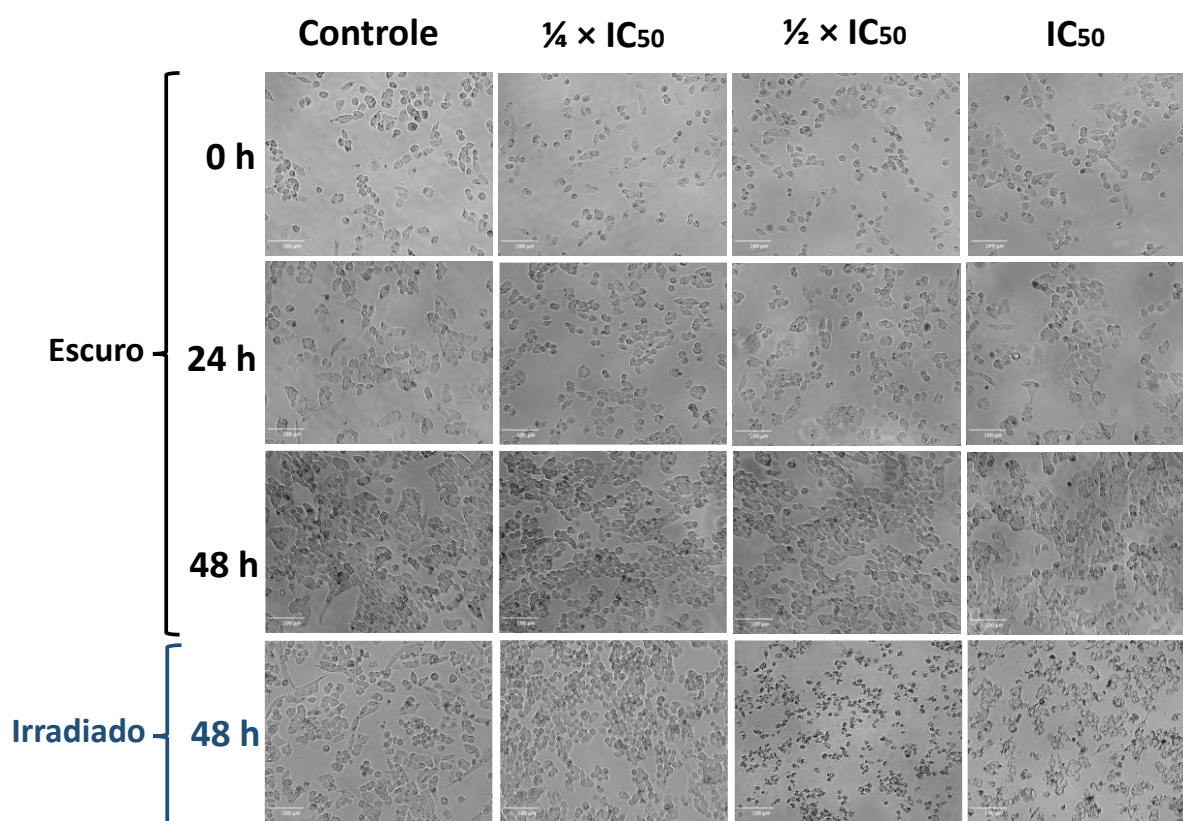


FIGURA A35 - Ensaio morfológico para a linhagem A2780 do controle (sem o composto H₂P) e após o tratamento com o composto H₂P nas concentrações do $\text{IC}_{50} = 0,06 \mu\text{M}$; $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50} = 0,03 \mu\text{M}$; $\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50} = 0,015 \mu\text{M}$ e irradiação ($\lambda_{\text{irrad}} = 415 \text{ nm}$, 30 mW cm^{-2} , 9 J cm^{-2}). As imagens foram adquiridas em 0, 24 e 48 h horas após a irradiação, em campo claro, fluorescência e suas respectivas sobreposições, utilizando o equipamento CELENA[®] S.

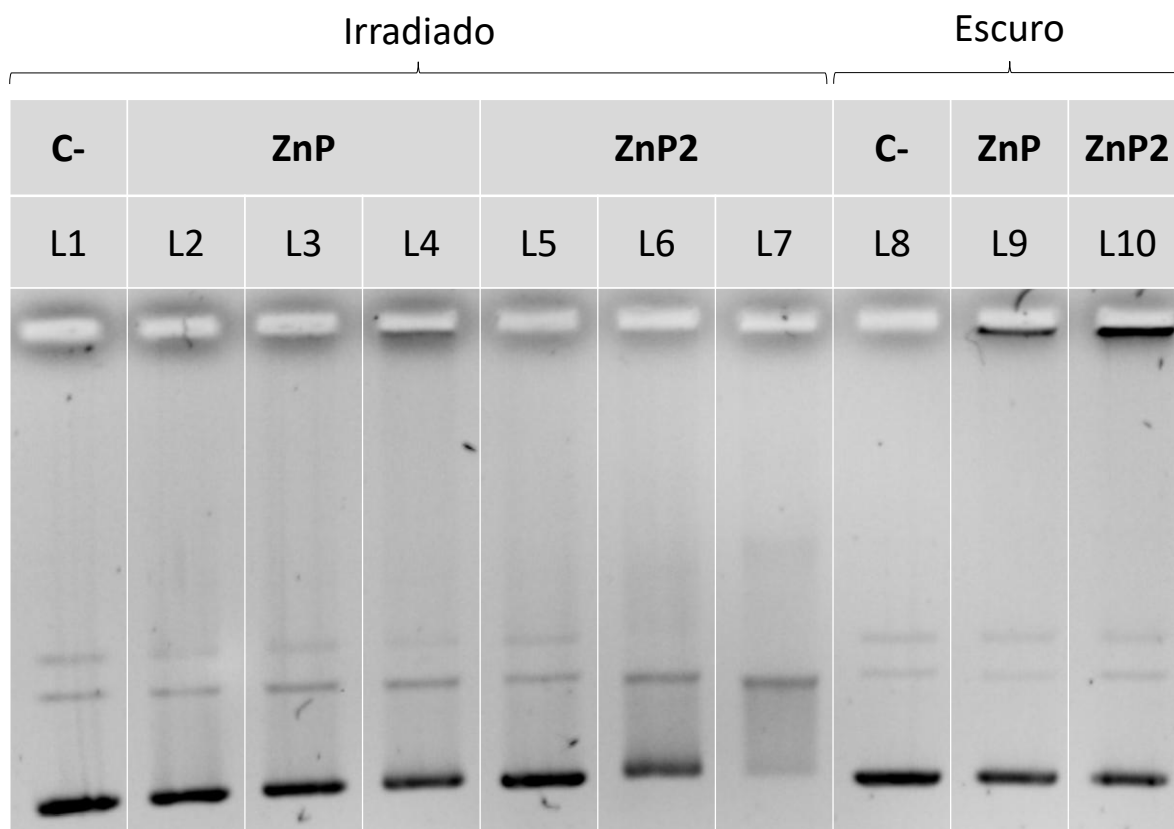


FIGURA A36 - Mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC19 irradiado durante 10 minutos usando luz de LED 415 nm e 10 % de DMF. Sendo que L1 ou C- é o controle negativo contendo plasmídeo (0,25 µg) e DMF. Para o complexo ZnP (L2 = 0,1; L3 = 0,5; L4 = 1,0 µM) e H₂P2 (L5 = 0,1; L6 = 0,5; L7 = 1,0 µM). Sem irradiação ou no escuro tem L8 ou C- é o controle negativo (plasmídeo e DMF), L9 = ZnP (1,0 µM) e L10 = ZnP2 (1,0 µM).